



Igor Rapp Ferreira da Silva

“PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE  
UMA METALOPROTEASE DA PEÇONHA DA  
SERPENTE *Bothrops jararaca*”

Campinas

2014





**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS**

**FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS**

**IGOR RAPP FERREIRA DA SILVA**

**“PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE UMA  
METALOPROTEASE DA PEÇONHA DA SERPENTE *Bothrops  
jararaca*”**

**Orientador: Prof. Dr. Stephen Hyslop**

Dissertação de Mestrado apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade de Campinas – UNICAMP para a obtenção de título de Mestre em Farmacologia.

**ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL  
DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELO ALUNO IGOR  
RAPP FERREIRA DA SILVA E ORIENTADO PELO  
PROF. DR. STEPHEN HYSLOP.**

-----  
Assinatura do Orientador

Campinas

2014

Ficha catalográfica  
Universidade Estadual de Campinas  
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas  
Maristella Soares dos Santos - CRB 8/8402

Si38p Silva, Igor Rapp Ferreira da, 1981-  
Purificação e caracterização de uma metaloprotease da peçonha da serpente  
*Bothrops jararaca* / Igor Rapp Ferreira da Silva. – Campinas, SP : [s.n.], 2014.

Orientador: Stephen Hyslop.  
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. *Bothrops jararaca*. 2. Metaloproteases. 3. Cromatografia. 4. Peçonha de serpentes. I. Hyslop, Stephen, 1964-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

**Título em outro idioma:** Purification and characterization of a metalloproteinase from *Bothrops jararaca* snake venom

**Palavras-chave em inglês:**

*Bothrops jararaca*

Metalloproteinase

Chromatography

Snake venom

**Área de concentração:** Farmacologia

**Titulação:** Mestre em Farmacologia

**Banca examinadora:**

Stephen Hyslop [Orientador]

Elen Cristina Teizem Landucci

Ana Maria Moura da Silva

**Data de defesa:** 28-02-2014

**Programa de Pós-Graduação:** Farmacologia

---

# BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE MESTRADO

IGOR RAPP FERREIRA DA SILVA

---

Orientador (a) PROF(A). DR(A). STEPHEN HYSLOP

---

---

## MEMBROS:

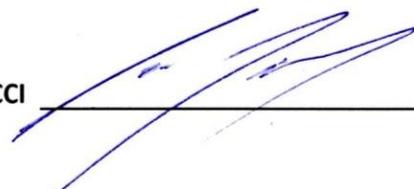
---

1. PROF(A). DR(A). STEPHEN HYSLOP



---

2. PROF(A). DR(A). ELEN CRISTINA TEIZEM LANDUCCI



---

3. PROF(A). DR(A). ANA MARIA MOURA DA SILVA



---

---

Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas da  
Universidade Estadual de Campinas

---

Data: 28 de fevereiro de 2014

---



# ***DEDICATÓRIA***



*Dedico esse trabalho à minha família: Leonardo, Maria Cristina, Gabriela e Leonardo que me deram esclarecimento necessário para discernir qual é o meu caminho. Dedico também aos meus avós Lourdes, Yolanda e Carlos que com amor, esmero e força tornaram-se norteadores de minhas ações e me iniciaram no caminho dos estudos, mas infelizmente já não estão, fisicamente, entre nós e, por isso, não podem presenciar a realização de um sonho em comum. Dedico esse trabalho especialmente à pessoa que sempre esteve ao meu lado, não importando o quão rude, insensível, distante e alheio eu fosse. Quantas tempestades aplacadas somente com um olhar! Quantos momentos de exaspero aliviados com um abraço!*

*Simone, esse trabalho também é fruto de seu esforço pessoal.*



# ***AGRADECIMENTOS***



***Ao Prof. Dr. Stephen Hyslop***

*por ter me aceitado no Laboratório de Farmacologia Bioquímica, pela orientação e principalmente pelo auxílio nos momentos de real necessidade.*

***A Todos do Laboratório de Farmacologia Bioquímica***

*que, com certeza, pelos momentos de conversa e risos, muito me auxiliaram no meu percurso.*

***Ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas, bem como aos coordenadores Profs. Drs. Edson Antunes e Gabriel Forato Anhô, pelas condições oferecidas para a realização deste trabalho.***

***ÀCAPES***

*pela bolsa que tornou possível a realização desta dissertação.*



***AGRADEÇO ESPECIALMENTE,***



Aos grandes amigos, **Rafael Sutti, André Lisboa Rennó**  
pelas horas de diversão e por todos os momentos de reflexão que tivemos.

À **Raquel Lorenzetti e Delano Aníbal da Silva**  
pelo grande suporte técnico, científico e principalmente filosófico.

À grande amiga **Erika Ferraresso dos Anjos** pelo  
auxílio na minha vida de laboratório bem como na minha apresentação.

À **Mariana Leite Tamascia**  
pelas conversas e principalmente pela grande disposição em fazer algo diferente  
sempre me forçando a pensar diferente.

À **Juliana Minardi Nascimento e José Ilton dos Santos** sem os quais eu não  
conseguiria iniciar o meu trabalho.

À **minha família.**  
Pela compreensão de todos esses difíceis anos nos quais me tornei uma figura  
ausente e aparentemente alheio ao que acontecia a vocês, pela minha formação  
moral e estrutura.

À minha amada esposa **Simone**  
que com uma determinação sobre-humana e um amor incondicional forneceu-me  
sustentação e condições para que eu prosseguisse sem esmorecer nesse caminho  
tortuoso.



## *EPÍGRAFE*



*“Esquecia quem era, onde estava para viver a vida dos elfos ou das sílides, habitantes imaginários da mitologia escandinava. A voluptuosidade das alturas embriagava-me, e nem mais pensava nos abismos para onde, dentro em pouco, seria levado pelo meu destino.”*

***Julio Verne- Viagem ao Centro da Terra.***

*“Filho, não importa qual será sua profissão, desde que você se empenhe para ser o melhor.”*

***Leonardo Ferreira da Silva***



## *SUMÁRIO*



# SUMÁRIO

<b>LISTA DE DROGAS E REAGENTES</b> .....	xxix
<b>LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS</b> .....	xxxiii
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	xxxvii
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	xli
<b>RESUMO</b> .....	xliv
<b>ABSTRACT</b> .....	xlix
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	53
1.1. O GÊNERO <i>BOTHROPS</i> E MANIFESTAÇÕES DE ENVENENAMENTO BOTRÓPICO.....	55
1.2. CLASSIFICAÇÃO E ESTRUTURA DAS METALOPROTEASES DE PEÇONHAS OFÍDICAS.....	56
1.3. AÇÃO DAS SVMPS.....	58
1.4. AS SVMPS DA PEÇONHA DE <i>BOTHROPS JARARACA</i> .....	61
<b>2. JUSTIFICATIVA E OBJETIVO</b> .....	63
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	67
3.1. PEÇONHA.....	69
3.2. PURIFICAÇÃO DA METALOPROTEASE.....	69
3.2.1. Gel filtração em Superdex 75.....	69
3.2.2. Cromatografia por troca aniônica em coluna HiTrap Q-Sepharose.....	69
3.2.3. Determinação de pureza por HPLC.....	70
3.3. SDS-PAGE.....	70
3.4. ELETROFORESE EM DUAS DIMENSÕES.....	71
3.5. CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNA.....	71
3.6. ESPECTROMETRIA DE MASSAS.....	72

3.6.1. Digestão tripsínica <i>in gel</i> .....	72
3.6.2. Análise de LC-MS/MS.....	73
3.6.3. Identificação de peptídeos/proteínas.....	74
3.7. ATIVIDADES ENZIMÁTICAS.....	75
3.7.1. Atividade caseinolítica.....	75
3.7.2. Atividade fibrinogenolítica.....	75
3.7.3. Atividade fibrinolítica.....	75
3.7.4. Atividade elastásica.....	76
3.7.5. Atividade esterásica.....	76
3.8. ATIVIDADES BIOLÓGICAS.....	77
3.8.1. Animais.....	77
3.8.2. Atividade trombina-símile.....	77
3.8.3. Tempo de coagulação.....	77
3.8.4. Tempo de recalcificação.....	78
3.8.5. Atividade hemorrágica.....	78
3.8.6. Miotoxicidade.....	79
3.8.7. Análise histológica.....	79
3.8.8. Permeabilidade vascular.....	80
3.9. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	80
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>81</b>
4.1. PURIFICAÇÃO DA PROTEINA.....	83
4.2. ANÁLISE BIOQUÍMICA DA PROTEÍNA.....	86
4.3. CARACTERIZAÇÃO ENZIMÁTICA DA BJ-PI2.....	87

4.4. ATIVIDADES BIOLÓGICAS DA BJ-PI2.....	90
4.4.1. Atividades fibrina(ogen)olítica e (anti)coagulante.....	90
4.4.2. Permeabilidade vascular e lesão local (hemorragia e necrose).....	92
<b>5. DISCUSSÃO.....</b>	<b>97</b>
<b>6. CONCLUSÃO.....</b>	<b>109</b>
<b>7. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>113</b>
<b>8. ANEXOS.....</b>	<b>123</b>



# ***LISTA DE DROGAS E REAGENTES***



# LISTA DE DROGAS E REAGENTES

REAGENTES	PROCEDÊNCIA
Acetonitrila	JT BAKER (EUA)
Ácido fosfórico	MALLINCKRODT-BAKER (EUA)
Ácido tricloroacético	MERCK (ALEMANHA)
Ácido trifluoroacético	MALLINCKRODT-BAKER (EUA)
Acrilamida	SIGMA CHEMICAL CO. (EUA)
Agarose de baixo ponto de fusão	USB (EUA)
Álcool etílico	SYNTH (SP, BRASIL)
Álcool metílico	SYNTH (SP, BRASIL)
Azul de bromofenol	SIGMA CHEMICAL CO. (EUA)
Azul de Coomassie	SIGMA CHEMICAL CO. (EUA)
Carbonato de cálcio	JT BAKER (EUA)
Caseína	SIGMA CHEMICAL CO. (EUA)
3-[(3-colamidopropil) dimetilamônio]-1-propanossulfonato (CHAPS)	GE LIFESCIENCES (EUA)
Citrato de sódio	ECIBRA (SP, BRASIL)
Cloreto de cálcio	JT BAKER (EUA)
Cloreto de sódio	JT BAKER (EUA)
Ditiotreitol (DTT)	GE LIFESCIENCES (EUA)
Dodecil sulfato de sódio	USB (EUA)
Elastina-Congo red	SIGMA CHEMICAL CO. (EUA)
Fenantrolina	SIGMA CHEMICAL CO. (EUA)
Fenilmetilsulfonil fluoreto (PMSF)	CALBIOCHEM (EUA)
Fibrinogênio bovino livre de plasminogênio	SIGMA CHEMICAL CO. (EUA)

Formol	CHEMCO (BRASIL)
Glicerol	SYNTH (SP, BRASIL)
Isoflurano	CRSITÁLIA (SP, BRASIL)
Marcador de massa molecular para SDS-PAGE	GE LIFESCIENCES (EUA)
$\beta$ -Mercaptoetanol	SIGMA CHEMICAL CO. (EUA)
Metil-bis-acrilamida	GE LIFESCIENCES (EUA)
Nitrato de prata	SYNTH (SP, BRASIL)
N-t-boc-L-Alanina <i>p</i> -nitrofenol éster	SIGMA CHEMICAL CO. (EUA)
Peçonha	CETA (SP, BRASIL)
Persulfato de amônio	SIGMA CHEMICAL CO. (EUA)
Reagente Folin-Ciocalteu	DINÂMICA (SP, BRASIL)
Q-Sepharose	GE LIFESCIENCES (EUA)
Sulfato de cobre II	SIGMA CHEMICAL CO. (EUA)
Superdex 75	GE LIFESCIENCES (EUA)
N $\alpha$ - <i>p</i> -Tosil-L-arginina metil-éster (TAME)	SIGMA CHEMICAL (EUA)
N,N,N',N'-Tetrametiletilenediamina (TEMED)	SIGMA CHEMICAL (EUA)
Tiosulfato de sódio	SYNTH (SP, BRASIL)
Tiouréia	GE LIFESCIENCES (EUA)
Tris	USB (EUA)
Triton X-100	VETEC (RJ, BRASIL)
Uréia	GE LIFESCIENCES (EUA)

## ***LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS***



## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ACN	Acetonitrila
ADAM	<i>ADisintegrin and Metalloproteinase</i>
ANOVA	Análise de variância
Arg	Arginina
Asp	Aspartato
ATP	Adenosina 5'-trifosfato
BAME	Benzil-L-arginina metil éster
CHAPS	3-[(3-colamidopropil) dimetilamónio]-1-propanossulfonato
CK	Creatina quinase
DHM	Dose hemorrágica mínima
Dis	Domínio desintegrina
Dis-like	Domínio desintegrina-símile
DP	Desvio padrão
DRC	Domínio rico em cisteína
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ESI	Espectrometria de massas por ionização em eletrospray
Gly	Glicina
HUVEC	Células endoteliais de cordão umbilical humano
I-CAM	Molécula de adesão celular I
IL-1 $\beta$	Interleucina 1 $\beta$
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
IPG	Gradiente de pH imobilizado
LC-MS/MS	Cromatografia líquida e espectrometria de massas ligadas em <i>tandem</i>
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógeno
MEC	Matriz extracelular
PBS	Solução de salina tamponada com fosfato
PLA <sub>2</sub>	Fosfolipase do tipo A <sub>2</sub>

PMSF	Fluoreto de fenilmetilsulfonilo
PPP	Plasma pobre em plaquetas
Q-TOF	Espectrômetro de massas quadrupólo por tempo de voo
RP-HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa
SBTI	Inibidor de tripsina de soja
SDS	Docecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	Gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio
SVMP	Metaloprotease de peçonha ofídica ( <i>Snake venom metalloprotease</i> )
TAME	N $\alpha$ -p-Tosil-L-arginina metil-éster
TEMED	N,N,N',N'-Tetrametiletilenodiamina
TFA	Ácido trifluoracético
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral alpha
Tris	Tris(hidroximetil)aminometano
UV	Luz ultravioleta
V-CAM	Molécula de adesão celular V

## ***LISTA DE FIGURAS***



## LISTA DE FIGURAS

		<b>Pág.</b>
<b>Figura 1</b>	Principais classes de proteínas contidas nas peçonhas botrópicas e suas ações.....	56
<b>Figura 2</b>	Classificação das SVMPS segundo seus domínios.....	57
<b>Figura 3</b>	Principais ações das SVMPS.....	60
<b>Figura 4</b>	Processo cromatográfico do isolamento de BJ-PI2.....	84
<b>Figura 5</b>	Determinação da massa molecular de BJ-PI2 por espectrometria de massas.....	85
<b>Figura 6</b>	SDS-PAGE bidimensional.....	86
<b>Figura 7</b>	Atividade fibrinogenolítica de BJ-PI2.....	91
<b>Figura 8</b>	Influência de BJ-PI2 sobre o tempo de recalcificação em plasma citratado murino.....	92
<b>Figura 9</b>	Extravasamento plasmático causado por BJ-PI2.....	93
<b>Figura 10</b>	Avaliação dos níveis de CK plasmático.....	94
<b>Figura 11</b>	Avaliação do dano tecidual causado por BJ-PI2.....	94



## ***LISTA DE TABELAS***



## LISTA DE TABELAS

	<b>Pág.</b>
<b>Tabela 1</b> Tabela de purificação da BJ-PI2.....	85
<b>Tabela 2</b> Dados da espectrometria de massas para os peptídeos trípticos da BJ-PI2.....	87
<b>Tabela 3</b> Alinhamento da sequência obtida com outras metaloproteases da classe PI.....	88
<b>Tabela 4</b> Atividades enzimáticas da BJ-PI2.....	89
<b>Tabela 5</b> Comparação das propriedades de BJ-PI2 e outras metaloproteases PIisoladas de peçonhas de <i>B. jararaca</i> e outras espécies botrópicas.....	95



## ***RESUMO***



## RESUMO

O envenenamento causado por *Bothrops jararaca* pode resultar em dor local, edema, hemorragia e mionecrose, parcialmente causados por SVMPs. Neste trabalho, descrevemos a caracterização da BJ-PI2, uma metaloprotease da classe P-I da peçonha de *B. jararaca*, e suas ações em tecidos locais. BJ-PI2 foi purificada por uma combinação cromatográfica de gel-filtração, troca aniônica e fase reversa em HPLC, e identificada por espectrometria de massas. As atividades coagulante e fibrin(ogen)olítica foram medidas por métodos convencionais. A atividade hemorrágica e as alterações na permeabilidade vascular foram examinadas em pele dorsal de ratos. A mionecrose e a atividade inflamatória foram avaliadas em músculo gastrocnêmio de camundongos. BJ-PI2 é uma proteína de cadeia única com massa molecular de 23,08 kDa. Fragmentos trípticos da BJ-PI2 mostraram alta homologia com a SVMP insularinase A oriunda de *Bothrops insularis*, mas também com a bothrojaractivase, uma SVMP oriunda de *B. jararaca*; foi observada similaridade menor com a BJ-PI e jararafibrases II e IV isoladas de *B. jararaca*. A BJ-PI2 não coagulou fibrinogênio nem plasma citratado de rato porém teve atividade  $\alpha$ - e  $\beta$ -fibrinogenase (inibidas por EDTA e 1,10-fenantrolina mas não por PMSF) e atenuou a coagulação de plasma induzida pela recalcificação. BJ-PI2 tem atividade fibrinolítica. BJ-PI2 aumentou a permeabilidade vascular em pele dorsal de rato (atividade inibida por 1,10-fenantrolina). BJ-PI2 não provocou hemorragia ou mionecrose, contudo causou migração de células inflamatórias. Em contrapartida, a peçonha foi fortemente hemorrágica e mionecrótica, porém causou pouca infiltração de células inflamatórias. Estes resultados indicam que a BJ-PI2 é uma SVMP não hemorrágica, não mionecrótica e não coagulante da classe PI que pode aumentar a permeabilidade vascular e a migração de células inflamatórias *in vivo*, mas não contribui com a hemorragia e a necrose induzidas pela peçonha.



## ***ABSTRACT***



## ABSTRACT

Envenoming by *Bothrops jararaca* can result in local pain, edema, hemorrhage and necrosis, partially mediated by snake venom metalloproteinases (SVMPs). In this work, we describe the characterization of BJ-PI2, a P-I class SVMP from *B. jararaca* venom, and its local tissue actions. BJ-PI2 was purified by a combination of gel filtration, anion-exchange chromatography and reverse phase HPLC, and identified by mass spectrometry. Clotting and fibrin(ogen)olytic activities were assayed using conventional methods. Hemorrhagic activity and changes in vascular permeability were examined in rat dorsal skin. Myonecrosis and inflammatory activity were examined in mouse gastrocnemius muscle. BJ-PI2 was a 23.08 kDa single-chain polypeptide. Tryptic fragments showed highest homology with SVMP insularinase A from *Bothrops insularis*, but also with *B. jararaca* SVMP bothrojaractivase; less similarity was observed with *B. jararaca* SVMPs BJ-PI and jararafibrases II and IV. BJ-PI2 did not clot fibrinogen or rat citrated plasma but had  $\alpha$ - and  $\beta$ -fibrinogenolytic activity (inhibited by EDTA and 1,10-phenanthroline but not by PMSF) and attenuated coagulation after plasma recalcification. BJ-PI2 had fibrinolytic activity. BJ-PI2 increased the vascular permeability of rat dorsal skin (inhibited by 1,10-phenanthroline). BJ-PI2 was not hemorrhagic or myonecrotic but caused migration of inflammatory cells. In contrast, venom was strongly hemorrhagic and myonecrotic but caused less infiltration of inflammatory cells. These results indicate that BJ-PI2 is a non-hemorrhagic, non-myonecrotic, non-coagulant P-I class SVMP that may enhance vascular permeability and inflammatory cell migration *in vivo*, but is not a major contributor to venom-induced hemorrhage and necrosis.



## ***INTRODUÇÃO***



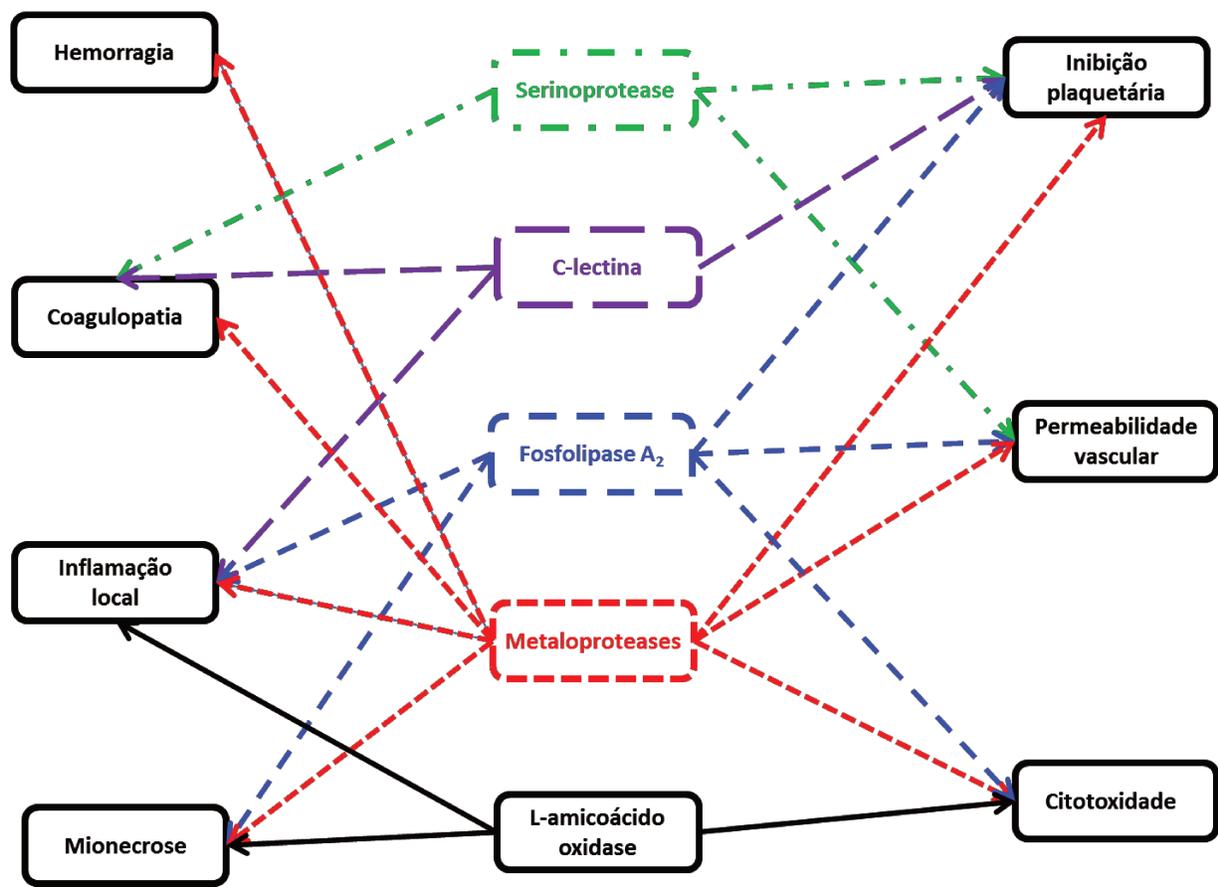
# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. Gênero *Bothrops* e manifestações de envenenamento botrópico

O gênero *Bothrops* contém mais de 30 espécies que distribuem-se do sul do México à Argentina, incluindo algumas ilhas do Caribe (1,2). Alguns membros deste gênero são importantes causas de envenenamento humano devido à sua abundância e contato com humanos em áreas rurais. Dentre estas espécies, destacam-se pela importância a *Bothrops asper* na América Central, *Bothrops atrox* na região amazônica e *Bothrops jararaca* no sudeste da América do Sul (3,4).

No Brasil, o ofidismo é um importante problema de saúde pública. Anualmente, são notificados ao Ministério da Saúde aproximadamente 20.000 casos de acidentes causados por serpentes peçonhentas. Desses, serpentes do gênero *Bothrops* são responsáveis por cerca de 90% dos casos, sendo letal em apenas 0,31% dos casos (5,6). Esse gênero é encontrado em todo o território nacional e compreende cerca de 18 espécies, sendo que a *B. jararaca* predomina no sudeste do Brasil onde é a principal causa de acidentes ofídicos (1,3).

O envenenamento botrópico caracteriza-se por manifestações locais e sistêmicas. As manifestações locais incluem a inflamação, dor, edema, equimose, bolhas e necrose no local da picada enquanto as sistêmicas incluem distúrbios de coagulação, hemorragia sistêmica, alterações hemodinâmicas e insuficiência renal aguda (3,4,7). Os principais componentes da peçonha relacionados às manifestações locais e sistêmicas são as metaloproteases (8,9), fosfolipases A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) (10,11) e serinoproteases (12-14), embora outros componentes tais como lectinas (15,16) e L-aminoácido oxidase (17,18) também possam contribuir para estes efeitos. A Figura 1 mostra as ações das principais moléculas encontradas em peçonha botrópica.

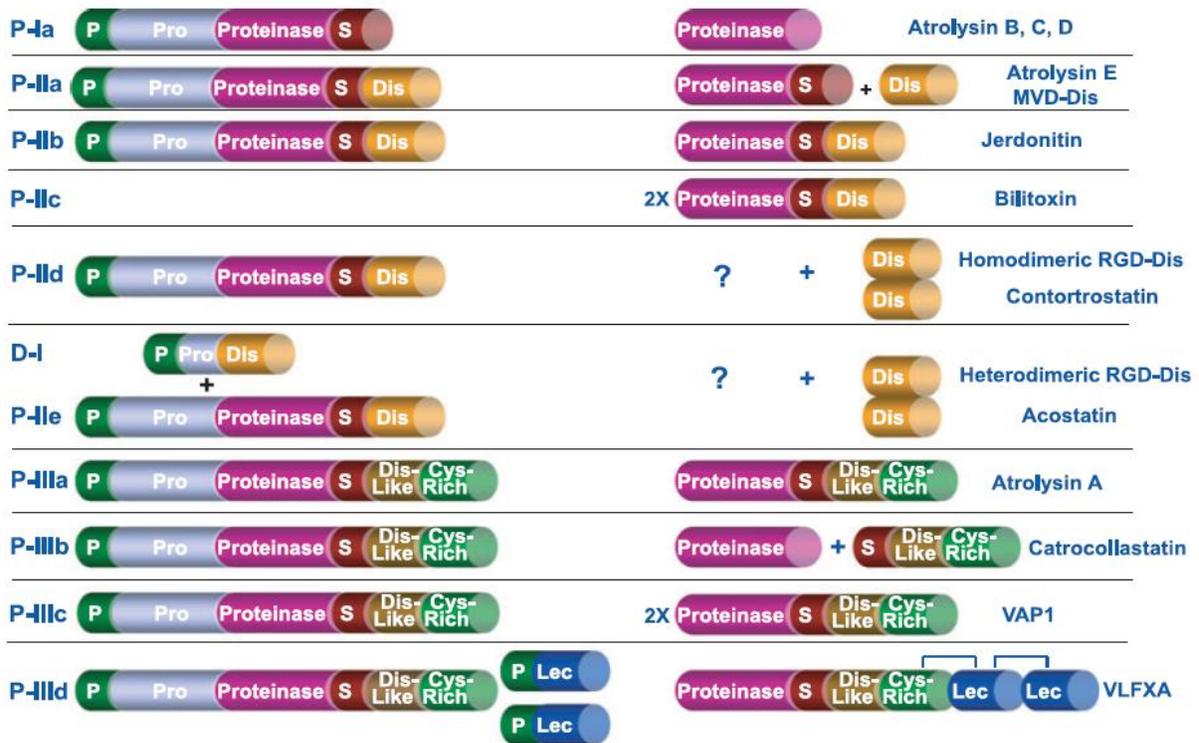


**Figura 1.** As principais classes de proteína (baseado em estudos transcriptômicos) (19, 20) e suas contribuições para as manifestações do envenenamento botrópico (9,21,22).

## 1.2. Classificação e estrutura das SVMPs

As metaloproteases de peçonhas ofídicas ou SVMPs (*snake venom metalloproteinases*) pertencem à subfamília M12 de metaloproteases denominadas reprotinas. As SVMPs são enzimas dependentes de zinco com massa molecular variável (21-100 kDa); são as principais toxinas responsáveis pela ação hemorrágica de peçonhas botrópicas (8,9). Atualmente, as SVMPs são classificadas em três classes principais, baseado na sua estrutura (23): (1) **Classe PI**: possuem somente o domínio de metaloprotease, [2] **Classe PII (cinco subclasses)**: possuem um domínio metaloprotease seguido por um domínio semelhante a desintegrina, e [3] **Classe PIII (quatro subclasses)**: possuem um domínio metaloprotease, um domínio semelhante a desintegrina e um

domínio rico em cisteína (DRC); algumas das SVMPs desta classe também apresentam um domínio C-lectina ligado à estrutura principal por pontes dissulfeto (Fig. 2).



**Figura 2.** Classificação das SVMPs segundo seus domínios constituintes. A coluna da esquerda refere-se a como essas enzimas são expressas e a coluna da direita às resultantes após modificações pós-traducionais. **Cys-Rich** – domínio rico em cisteína (DRC), **Dis/Dis-like** – domínio de desintegrina ou desintegrina-símile; **Lec** – domínio lectina; **P** – sequência pré; **Pro** – sequência pró; **Proteinase** – domínio com atividade proteolítica (metaloprotease); **S** – pontes dissulfeto [Fonte: (23)].

As SVMPs são sintetizadas nas glândulas veneníferas na forma de zimogênios contendo uma sequência sinal ou pré-sequência (P na Fig. 2) e uma pró-sequência (Pro na Fig. 2) situadas na extremidade N-terminal da proteína. A remoção destas sequências por autocatálise ou pela ação de outras metaloproteases resulta na ativação das SVMPs (24,25).

O domínio de metaloprotease é formado por aproximadamente 190 aminoácidos e sua ação é dependente de zinco (26,25). Este domínio possui uma sequência conservada (HEXXHGXXH) entre as três classes de SVMPs (26) que forma uma região hidrofóbica

relacionada à afinidade da enzima para o zinco e, conseqüentemente, à atividade da enzima (25,27).

Além do domínio de metaloprotease, as SVMPS das classes PII e PIII possuem domínios semelhantes à desintegrina. Uma das características desta região é a presença de vários resíduos de cisteína. Entretanto a estrutura mais interessante encontrada nas desintegrinas é a sequência formada por três aminoácidos (Arg-Gly-Asp) que se liga especificamente às integrinas na superfície de diversos tipos celulares. Essa ligação leva ao bloqueio das integrinas e perda de função, como por exemplo, a inibição da agregação plaquetária por bloqueio da integrina  $\alpha_2\beta_3$  (receptor de fibrinogênio) pela desintegrina.

As SVMPS da classe PIII possuem um terceiro domínio, que é o domínio rico em cisteína (DRC). Esse domínio segue um padrão de ordem nos resíduos da forma:  $CX_6CX_4CX_6CX_4CX_{4/6/10}CX_{15/18/18}CX_5CX_4CX_{7/9/16}$ , onde C é um resíduo de cisteína, X é outro aminoácido qualquer e o número é a quantidade de outros aminoácidos entre uma cisteína e outra. Sugere-se que este domínio tem a função de estabilizar o domínio desintegrina, uma vez que o DRC está na extremidade carboxi da desintegrina, além de poder auxiliar na interação entre SVMPS proteínas (25). Embora se conheça a estrutura de várias SVMPS, o conhecimento detalhado acerca de suas propriedades biológicas se restringem a apenas algumas destas proteínas, como por exemplo, a jararagina.

### 1.3. Ação das SVMPS

A atividade proteolítica das peçonhas botrópicas é conhecida desde os trabalhos do Dr. Vital Brazil no final do século XIX e início do século XX (28). Em meados do século passado, Hamberg e Rocha e Silva (29) relataram a existência de duas frações proteolíticas na peçonha de *B. jararaca*: uma dessas frações era termoestável e clivava benzoilarginina metil éster e a outra

possuía alta atividade caseinolítica na presença de  $\text{Ca}^{2+}$  e era termosensível. Em estudos paralelos, Holtz e Raudonat (30) e Henriques e Evseeva (31) também relataram a existência nessa mesma peçonha de duas frações proteolíticas, uma com forte atividade sobre caseína mas baixa atividade coagulante e fraca na hidrólise de benzoilarginina, e a outra com forte atividade coagulante e sobre a benzoilarginina porém com baixa atividade caseinolítica, concluindo assim que na peçonha de *B. jararaca* essas atividades refletiam a existência de dois grupos de proteases. Hoje, sabe-se que essas atividades correspondem às metaloproteases (forte atividade caseinolítica, fraca na coagulação e na degradação da benzoilarginina) e serinoproteases (fraca atividade caseinolítica, mas forte na coagulação e consumo de benzoilarginina). Sabe-se ainda que enzimas de ambos estes grupos podem agir na hemostase (32,33).

É amplamente aceito o papel preponderante de SVMPs na hemorragia, porém ainda não há um conhecimento preciso de como essas proteínas agem (8,9). Essa imprecisão se dá por dois fatos principais: (a) pela diversidade nas estruturas dessas proteínas e a multiplicidade de substratos degradados por elas, e (b) pela contradição entre resultados de ensaios *in vitro* e *in vivo*. A hemorragia envolve dois mecanismos principais (8): (a) a degradação e consumo de fatores de coagulação, acarretando a incoagulabilidade do sangue, e (b) uma ação direta nos elementos dos vasos sanguíneos (principalmente componentes da membrana basal) levando à ruptura desses e ao conseqüente extravasamento sanguíneo. De modo geral, as SVMPs da classe PIII são mais hemorrágicas do que as dos demais grupos uma vez que interagem fortemente com proteínas da lâmina basal através de sítios não catalíticos anexos ao sítio metaloprotease (34). Por outro lado, algumas SVMPs da classe PI são mais eficientes em degradar fatores de coagulação do que SVMPs da classe PIII. Oliveira *et al.* (35) demonstraram que a laminina, uma das principais proteínas da lâmina basal (estrutura responsável pela estabilidade do endotélio), é igualmente degradada por bothropasina, HF3 (PIII) e BJ-PI (PI) (todas de *B. jararaca*) de modo

que estas três proteínas poderiam causar a ruptura da parede dos vasos sanguíneos.

Além de um papel na hemóstase e na hemorragia, as SVMPs também possuem outras ações. Por exemplo, a jararagina, uma SVMP da classe PIII da peçonha de *B. jararaca*, pode desencadear uma resposta inflamatória através da conversão do pró-TNF- $\alpha$  em TNF- $\alpha$ , uma citocina pró-inflamatória (36), e pode causar a morte de células endoteliais (37). De modo semelhante, a BaP1, uma SVMP de 22,7 kDa da classe PI de *B. asper* causa migração leucocitária para a cavidade peritoneal e estimula a secreção de citocinas pró-inflamatórias tais como TNF- $\alpha$  e interleucina (IL)-1 $\beta$  (38). A Figure 3 resume as principais ações das SVMPs.

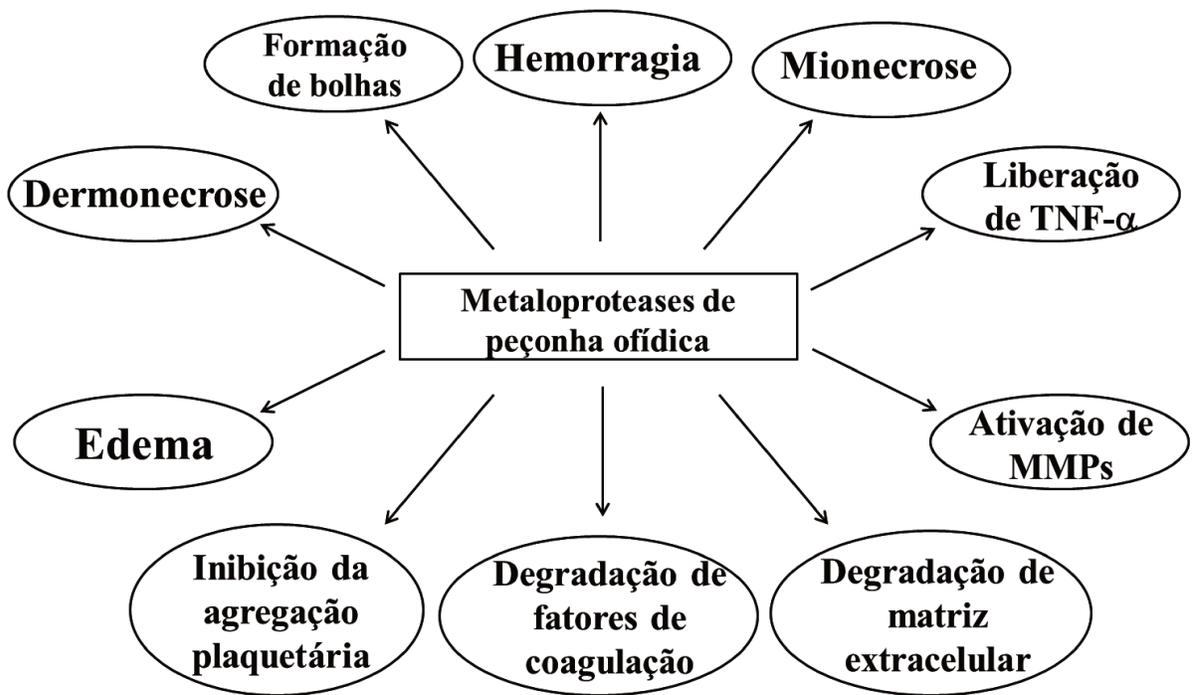


Figura 3.Principais ações das SVMPs. [Fonte: (26).]

#### **1.4. As SVMPs da peçonha de *Bothrops jararaca***

A *B. jararaca* é a principal espécie responsável por acidentes ofídicas no sudeste do Brasil e sua peçonha é uma das mais bem estudadas deste gênero. O envenenamento por *B. jararaca* resulta em intensa hemorragia em animais experimentais (39) e humanos (40,41). A atividade proteolítica da peçonha de *B. jararaca* vem sendo estudada há mais de 100 anos, e nas últimas décadas várias SVMPs foram isoladas e caracterizadas dela. Uma das primeiras SVMPs desta peçonha a ser estudada em detalhe foi a bothropasina, uma SVMP PIII não hemorrágica de 48 kDa (42). Atualmente, a mais extensivamente estudada é a jararagina, uma SVMP de 52 kDa da classe PIII inicialmente purificada e clonada por Paine *et al.* (43) e que desde então tem sido amplamente investigada (44-47). A jararagina apresenta importante atividade na degradação de algumas proteínas da matriz extracelular (MEC) tais como a laminina, vitronectina e fibronectina (45). A peçonha de *B. jararaca* também contém várias SVMPs da classe PI, tais como as jararafibrases II (43), e III e IV (48) que degradam fibrinogênio e proteínas da MEC (laminina, colágeno tipo-IV, e fibronectina), mas causam pouca hemorragia em pele dorsal de rato. Mais recentemente, foram caracterizadas a bothrojaractivase, que tem ação fibrino(geno)lítica e coagula plasma de ratos (49), e a BJ-PI, com forte atividade caseinolítica mas fraca atividade hemorrágica (50).



## ***JUSTIFICATIVA E OBJETIVO***



## 2. JUSTIFICATIVA E OBJETIVO

Durante experimentos para isolar jararafibrases da peçonha de *B. jararaca* para outro projeto, após uma etapa de troca iônica obtivemos um pico que se mostrou homogêneo por SDS-PAGE e RP-HPLC. Diante de algumas evidências de que se tratava de uma nova metaloprotease, resolvemos, neste projeto investigar esta proteína em mais detalhes. Assim, o objetivo principal desta investigação foi isolar e caracterizar esta nova metaloprotease e compará-la com outras SVMPs já caracterizadas da peçonha de *B. jararaca*.



## ***MATERIAIS E MÉTODOS***



### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1. PEÇONHA**

A peçonha liofilizada de *B. jararaca* foi obtida do Centro de Estudos de Toxinas Animais (CETA, Morungaba, SP) e estocada a -20 °C. A peçonha foi extraída de espécimes adultos de ambos os sexos.

#### **3.2. PURIFICAÇÃO DA METALOPROTEASE**

##### **3.2.1. Gel filtração em Superdex 75**

A peçonha liofilizada (100 mg) foi solubilizada em 2 mL de Tris-HCl pH 8,0 10 mM contendo 10 mM CaCl<sub>2</sub> e 150 mM NaCl. A solução foi aplicada em coluna (16 x 60 cm) preenchida com Superdex 75 (GE Lifesciences, Piscataway, NJ, EUA) equilibrada com o mesmo tampão. As proteínas foram eluídas usando um fluxo de 0,5 mL/min e o perfil de eluição foi determinado monitorando-se a absorvância em 280 nm. Frações de 1 mL foram coletadas usando um cromatógrafo ÄKTAprime (GE Lifesciences). As frações foram testadas para atividade caseinolítica e o segundo pico com esta atividade foi concentrado por centrifugação em filtro Amicon (Millipore) (3000 x g, 30 min, 4 °C) usando tampão Tris-HCl 10 mM, pH 8,0, contendo 10 mM de CaCl<sub>2</sub> e estocada a 4 °C.

##### **3.2.2. Cromatografia por troca aniônica em coluna HiTrap Q-Sepharose**

O pico 2 de atividade caseinolítica da etapa anterior foi aplicada a uma coluna HiTrap Q-Sepharose de 5 mL (GE Lifesciences) equilibrada com Tris-HCl 10 mM, pH 8,0, contendo 10 mM de CaCl<sub>2</sub>. As proteínas foram eluídas a um fluxo de 0,5 mL/min com o mesmo tampão contendo um gradiente linear de sal (0-0,5 M). Foram coletados 0,5 mL por fração e o perfil de

eluição foi monitorado em 280 nm. Novamente, os picos foram testados quanto à sua atividade caseinolítica.

### **3.2.3. Determinação de pureza por HPLC**

Para verificar a pureza, 10 µg da proteína obtida na etapa anterior foram injetados em sistema de HPLC Shimadzu constituído de bombas LC-10AD-VP e leitor de UV-VIS SPD-10AD-VP (Shimadzu Co., Tóquio, Japão) com coluna Júpiter C18 (5 µm 300A; Phenomenex) acoplada ao sistema. Foi usado um gradiente de 0 a 100% de acetonitrila (90% em água; tampão B) em ácido trifluoroacético 0,1% (tampão A) a um fluxo de 1 mL/min. O perfil de eluição das proteínas foi monitorado em 280 nm.

### **3.3. SDS-PAGE**

A eletroforese em SDS-PAGE foi feita com Laemmli (51) em sistema descontínuo com gel de empacotamento de 4% preparado em Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8 contendo 0,4% de SDS e gel de migração de 15% preparado em Tris-HCl 1,5 M, pH 8,8 contendo 0,4% de SDS (50). Vinte microlitros de amostra (contendo 10 µg de peçonha, frações ou 50 µg de proteína purificada) foram completados com 20 µL de tampão de amostra [4% (p/v) azul de bromofenol, Tris-HCl 0,06 M, SDS 2%, glicerol 10%] e então as amostras foram fervidas por 5 minutos e aplicadas no gel de empacotamento. Para a redução das amostras e quebra das pontes dissulfeto das proteínas foi adicionado 0,1% de DTT ou β-mercaptoetanol. Os géis (10 x 12,5 cm) foram montados em cuba vertical mini SE 260 (GE Lifesciences), acoplada à fonte elétrica EPS 600 (GE Lifesciences), imersos em tampão contendo SDS 10%, Tris-HCl 0,625 M, pH 6,8 e glicina 1,2 M (GE Lifesciences), e então submetidos a um campo elétrico constante de 100 V sendo aplicada

por gel uma corrente elétrica, também constante, de 25 mA. Após a corrida, os géis foram corados por prata. Foram incluídas em cada corrida proteínas marcadoras de massa molecular (GE Lifesciences) e a massa molecular da proteína purificada foi determinada conforme recomendada pelo fabricante.

### **3.4. ELETROFORESE EM DUAS DIMENSÕES**

Peçonha bruta (300 µg) ou BJ-PI2 (50 µg) foi dissolvida em solução de reidratação [uréia 7 M, tiouréia 2 M, CHAPS 2%, 0,5% de tampão IPG (*immobilized pH gradient*), azul de bromofenol 1%] e pré-carregada em fitas IPG de focalização isoeletrica (13 cm, gradiente linear de pH 3-10). Essas fitas foram transferidas para o sistema Multiphor II (GE Lifesciences) para a primeira dimensão. A focalização isoeletrica foi feita segundo instruções do fabricante, corrida a 6 °C em três fases: 300 V por 1 minuto, 3500 V por 1,5 h e 3500 V por 3,5 h. Após a focalização, as tiras foram transferidas para tubos de vidro e as proteínas nelas imobilizadas foram reduzidas e alquiladas por incubações seqüenciais de 15 min em: a) tampão de equilíbrio (Tris-HCl 0,05 M, pH 8,8, SDS 2%, glicerol 30%, uréia 6 M e azul de bromofenol 0,002%) + DTT (10 mg/mL de tampão de equilíbrio) e b) tampão de equilíbrio + iodocetamida (25 mg/mL de tampão de equilíbrio). Então as fitas foram aplicadas diretamente a um gel (14 x 16 cm) de acrilamida de 15% e as proteínas foram separadas por SDS-PAGE onde uma tensão de 300 V com corrente elétrica de 25 mA foi aplicada ao gel por 6 h e resfriado a 6 °C.

### **3.5. CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNA**

A concentração de proteínas nas amostras foi determinada pelo método de Lowry *et al.* (52), usando albumina bovina como padrão.

### 3.6. ESPECTROMETRIA DE MASSAS

#### 3.6.1. Digestão tripsínica *in gel*

A banda de proteína de interesse foi recortada do gel de poliacrilamida e digerida *in gel* segundo o protocolo descrito por Hanna *et al.* (53), com algumas modificações. Todos os reagentes utilizados foram preparados no momento do uso. Inicialmente, os fragmentos de gel recortados foram incubados em 500  $\mu\text{L}$  de uma solução de metanol 50% em água MilliQ<sup>®</sup> contendo ácido acético 5% por 2 h. Em seguida, essa solução foi removida por aspiração com pipeta e 500  $\mu\text{L}$  de solução foram adicionados aos fragmentos de gel, que permaneceram por mais uma hora nesta solução. Os fragmentos de gel foram então desidratados pela incubação por 10 min (duas vezes por 5 min cada) em 200  $\mu\text{L}$  de acetonitrila (100%). A solução de acetonitrila foi aspirada com pipeta e o restante foi evaporado em um sistema de concentração a vácuo (Speedvac). Após esta etapa, os pedaços de gel foram reidratados por 30 min em 30  $\mu\text{L}$  (por fragmento de gel) da solução redutora (ditiotreitól 10 mM em bicarbonato de amônio 100 mM). Decorrido o tempo de reidratação com DTT, a solução foi aspirada com pipeta e os fragmentos de gel foram incubados por 30 min em 30  $\mu\text{L}$  (por fragmento de gel) da solução alquilante (iodoacetamida 50 mM em bicarbonato de amônio 100 mM). Em seguida, a solução alquilante foi removida por aspiração com pipeta e os fragmentos de gel foram incubados por 10 min em 100  $\mu\text{L}$  (por fragmento de gel) de uma solução de bicarbonato de amônio 100 mM. Após esta etapa, a solução de bicarbonato de amônio foi retirada e 200  $\mu\text{L}$  (por fragmento de gel) de acetonitrila 100% foram adicionados e os fragmentos de gel incubados nesta solução por 5 min. A solução de acetonitrila foi retirada e, novamente, os fragmentos de gel foram incubados, por 10 min, em 200  $\mu\text{L}$  (por fragmento de gel) da solução de bicarbonato de amônio 100 mM. Na última etapa de desidratação, a solução de bicarbonato de amônio foi retirada e os fragmentos de gel foram incubados por 10 min (duas vezes por 5 min cada) em 200  $\mu\text{L}$  de acetonitrila 100%. A

solução de acetonitrila foi retirada por aspiração com pipeta e o restante foi evaporado num sistema Speedvac. Os fragmentos de gel foram reidratados em 16 µL de uma solução fresca de tripsina (50 ng/µL em bicarbonato de amônio 50 mM; Sigma), em banho de gelo, por 30 min. Em seguida, a solução de tripsina foi retirada e uma solução de bicarbonato de amônio 50 mM foi adicionada (em um volume suficiente para cobrir os fragmentos de gel) e os tubos contendo os fragmentos de gel foram incubados em banho termostaticado (37 °C) por 18 h.

A extração dos peptídeos do gel se deu com a adição de 30 µL (por fragmento de gel) da **solução 1** - ácido fórmico 5% (em água MilliQ) - e incubação dos pedaços de gel por 10 min nesta solução, a temperatura ambiente. Em seguida, a solução contendo os peptídeos foi transferida para um novo tubo e, ao pedaço de gel do tubo anterior, foram adicionados 12 µL (por fragmento de gel) da **solução 2** - ácido fórmico 5% em acetonitrila 50%. Os fragmentos de gel foram incubados por 20 min (duas vezes por 10 min cada) nesta solução, e a solução transferida para o tubo que continha os peptídeos extraídos com a **solução 1**. A solução foi concentrada em Speedvac e os peptídeos resultantes foram ressuspensos em 15 µL (por amostra) de ácido acético 3% nas análises com o espectrômetro LTQ-XL ou, alternativamente, ácido fórmico 0,1%, nas análises com o espectrômetro Q-ToF.

### 3.6.2. Análise de LC-MS/MS

Foi utilizado um espectrômetro do tipo Quadrupolo-Tempo de Voo com fonte de ionização *nanospray* (Q-ToF Ultima, Waters). A voltagem e a temperatura da fonte de ionização foram ajustadas para 4.0 kV e 100 °C, respectivamente. O espectrômetro também foi operado no modo DDA, utilizando uma varredura de massas na região de  $m/z$  de 200 a 2000, seguida da dissociação induzida por colisão dos três íons mais intensos. Para esta análise, 4,5 µL de uma mistura de peptídeos extraídos de bandas ou *spots* de géis de SDS-poliacrilamida foram

submetidos à dessalinização *online*, utilizando uma coluna C18 (180 µm x 20 mm, diâmetro interno e comprimento, respectivamente; Waters), com fluxo de 15 nl/min, ajustado diretamente no programa do cromatógrafo nanoAcquity (Waters). Em seguida, a mistura de peptídeos foi submetida à cromatografia líquida de fluxo nanométrico, utilizando coluna C18 capilar de 100 µm x 100 mm (Waters), num fluxo de 400 nL/min com um gradiente de 0 a 80% de acetonitrila (solvente B) em ácido fórmico 0,1% (solvente A) durante 45 min (0 a 20% de B em 20 min; 20 a 40% B em 15 min; 40 a 80% de B em 5 min; 80 a 0% de B em 5 min).

### **3.6.3. Identificação de peptídeos/proteínas**

Os arquivos provenientes das corridas de LC-MS/MS foram processados utilizando-se a plataforma ProteinLynx<sup>TM</sup> versão 2.3 (Waters). Os arquivos resultantes do processamento dos espectros (extensão \*.PKL) foram utilizados para buscas em banco de dados utilizando o programa Mascot (Matrix Science), acessado através de um servidor (*Mascot Server* versão 2.2) instalado no Laboratório Especial de Toxinologia Aplicada do Instituto Butantan em São Paulo/SP. Para identificação de proteínas/peptídeos em banco de dados, foi utilizado o banco não redundante de proteínas do SwissProt versão 2011\_04 ([www.uniprot.org](http://www.uniprot.org)) com o universo de busca restringido a “vertebrados ósseos” (*Bony vertebrates*). Como parâmetros de busca foram usados uma clivagem perdida pela tripsina, resíduos de cisteína carbamidometilados e resíduos de metionina oxidados (ambas destas modificações foram selecionadas como “modificação variável”). A tolerância de massa para íons precursores foi ajustada para  $\pm 0,6$  tanto para os íons precursores quanto para os íons-filho.

### **3.7. ATIVIDADES ENZIMÁTICAS**

#### **3.7.1. Atividade caseinolítica**

A atividade sobre caseína foi analisada pelo método de Kunitz (54). Para o ensaio, 1,9 mL de solução de caseína (1% em Tris-HCl 0,1 M, pH 7,8) foram incubados com 0,1 mL de cada amostra por 20 min, a 37 °C. Após esse tempo, a reação foi interrompida com 2 mL de solução de ácido tricloroacético 5% e mantida em gelo por 30 min. Terminada a incubação, as amostras foram centrifugadas (2500 x g, 15 min, temperatura ambiente). A absorbância do sobrenadante foi determinada em 280 nm em espectrofotômetro Beckman DU800. Uma unidade de atividade foi definida como o aumento de 0,001 unidades na absorbância ( $A_{280\text{ nm}}$ )/min.

#### **3.7.2. Atividade fibrinogenolítica**

Foi utilizada uma solução de fibrinogênio bovino (5 mg/mL) livre de plasminogênio (Sigma) solubilizado em Tris-HCl 0,1 M, pH 7,5, contendo NaCl 0,1 M. Para o ensaio, 100 µL (10 µg) de amostra foram incubados com 100 µL da solução de fibrinogênio a 37 °C e 20 µL dessa mistura foram transferidos para tubos tipo Eppendorf contendo 20 µL de uma solução contendo 2% β-mercaptoetanol e 2% SDS nos tempos 0 min, 5 min, 10 min, 30 min, 1 h, 2 h, 4 h e 6 h. As amostras foram corridas por SDS-PAGE (48) em géis de 12,5% de acrilamida.

#### **3.7.3. Atividade fibrinolítica**

A atividade fibrinolítica foi determinada conforme descrito por Maruyama *et al.* (45), com algumas modificações. A atividade foi medida utilizando-se placas de Petri contendo solução de 1% de agarose (USB) e fibrinogênio livre de plasminogênio (0,5%) incubado com 30 µL de trombina (1000 U/mL) preparada em Tris-HCl 0,1 M, pH 7,5, contendo NaCl 0,1 M. A amostra (10 µg) ou tampão sozinho (no caso do branco) foram incubados na placa por 18 h a 37 °C. Após

esta incubação, os halos de lise foram medidos. Uma unidade fibrinolítica correspondia a um halo de lise de um centímetro de diâmetro.

#### **3.7.4. Atividade elastásica**

A atividade elastásica foi determinada usando dois substratos: elastina acoplada ao Congo red e o substrato sintético n-t-boc-L-alanina *p*-nitrofenil éster. Para o ensaio com elastina-Congo red, o substrato foi suspenso (1 mg/mL) em fosfato de sódio 50 mM, pH 7,2 e então 100 µL dessa suspensão foram incubados com 100 µL (10 µg) de amostra (ou tampão, no caso do branco) por 18 h a 37 °C. Após esse período, as amostras foram centrifugadas (10.000 x *g*, 15 min, 8 °C) e a absorbância do sobrenadante foi lida em 490 nm. Uma unidade de atividade corresponde ao aumento de 0,001 na absorbância por hora de incubação (55). O ensaio com n-t-boc-L-alanina *p*-nitrofenil éster foi feito segundo Berlov *et al.* (56). O substrato foi dissolvido em tampão fosfato 50 mM, pH 7,2. O ensaio foi realizado em placas de 96 poços, sendo que 150 µL de substrato (0,2 mM) foram colocados em cada poço juntamente com 50 µL de amostra (10 µg) ou tampão (no caso do branco). A placa foi incubada a 37 °C por 30 min e a absorbância foi lida a 348 nm. Construiu-se então uma curva de concentração de *p*-nitrofenol vs.  $A_{348\text{nm}}$  onde uma unidade de atividade correspondia à liberação de 1 µmole de *p*-nitrofenol/min.

#### **3.7.5. Atividade esterásica**

A atividade esterásica foi avaliada usando o substrato N $\alpha$ -*p*-tosil-L-arginina éster (TAME), segundo o método de Schwert e Takenaka (57). Uma solução mãe de TAME (1 mM) foi preparada em Tris-HCl 0,1 M, pH 7,8. A um volume de 0,47 mL de substrato foi adicionado 0,5 mL de tampão e 0,03 mL de amostra (10 ou 40 µg de peçonha ou proteína purificada). A mistura foi incubada por 10 min a temperatura ambiente e o aumento na absorbância foi

monitorado continuamente a 253 nm. Uma unidade de atividade foi definida como um aumento de 0,001 na absorbância  $A_{253\text{nm}}/\text{min}$ .

### **3.8. ATIVIDADES BIOLÓGICAS**

#### **3.8.1. Animais**

Camundongos Swiss machos (25-30 g) e ratos Wistar machos (300-350 g) foram obtidos do Centro Multidisciplinar de Investigação Biológica (CEMIB/UNICAMP) e foram mantidos no Biotério do Departamento de Farmacologia da FCM/UNICAMP. Os animais foram alojados 5 (ratos) ou 10 (camundongos) por gaiola a 23 °C sob ciclo de luz/escuro de 12 h, com livre acesso à água e ração. Os protocolos experimentais usando animais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UNICAMP (CEUA/UNICAMP, protocolo no. 2253-1).

#### **3.8.2. Atividade trombina-símile**

Uma solução de 5 mM de fibrinogênio bovino livre de plasminogênio foi preparada em tampão Tris-HCl 50 mM, pH 7,5 com 0,1 M de NaCl. Cento e oitenta microlitros dessa solução foram incubados por 10 min em 37 °C e então 20 µL de amostra (10 µg de peçonha ou proteína purificada) no mesmo tampão foram adicionados à solução e o tempo de coagulação foi tomado. A atividade trombina-símile das amostras foi determinada usando uma curva-padrão construída com diferentes concentrações de trombina bovina (0,1-10 U/mL).

#### **3.8.3. Tempo de coagulação**

Ratos Wistar foram anestesiados com isoflurano (Cristália, Itapira, SP, Brasil) e exsanguinados via a aorta com escalpes citratados (3,8%). O sangue foi coletado em tubos de polipropileno contendo citrato 3,8% e centrifugado em temperatura ambiente a 800 x g por 12

min. O pellet formado foi centrifugado novamente a 2500 x g por 15 min para obter plasma pobre em plaquetas (PPP). Cento e oitenta microlitros de PPP foram adicionados a 20 µL de tampão Tris-HCl, pH 8,0, 50 mM contendo 40 µg de peçonha ou proteína purificada e o tempo decorrido para a formação das primeiras fibras do coágulo foi tomado.

#### **3.8.4. Tempo de recalcificação**

O tempo de recalcificação de plasma citratado foi avaliado conforme descrito por Berger *et al.* (48). Ratos foram anestesiados com isoflurano e o ramo descendente da aorta foi exposto para a coleta de sangue em tubos Falcon contendo 1mL de citrato de sódio a 3,8%. Em seguida, o sangue foi centrifugado (2000 x g, 12 min, temperatura ambiente) para a obtenção do plasma pobre em plaquetas (PPP). O PPP foi transferido para um placa de 96 poços (50 µL/poço) e incubado com 10 µL de amostra (Tris-HCl, pH 8,0, como controle, e 5, 10 e 40 µg de proteína purificada) por 5 min a 37 °C. Após esse tempo foi adicionado a cada poço 10 µL de CaCl<sub>2</sub> 250 mM e o aumento na turbidez em 650 nm foi monitorado em intervalos de 1 min durante 30 min.

#### **3.8.5. Atividade hemorrágica**

A atividade hemorrágica foi avaliada conforme descrito por Theakston e Reid (58). Ratos foram anestesiados com tiopental (30 mg/kg, i.p.; Cristália) e, após tricotomia do dorso, foram injetados intradermicamente (i.d., 100 µL) com 4,5, 13,5 e 45,0 µg de peçonha ou 10 e 40 µg de proteína purificada diluídos em tampão Tris-HCl 10 mM, pH 8,0, mais 10 mM de CaCl<sub>2</sub>. O tampão sozinho foi usado como controle. Após 24 h, os ratos foram sacrificados com isoflurano e a pele dorsal foi removida e o diâmetro do halo hemorrágico da face interna foi medida. Uma unidade de atividade hemorrágica correspondia a um halo hemorrágico de 1 cm de diâmetro.

### **3.8.6. Miotoxicidade**

Para determinação da miotoxicidade, camundongos foram injetados no músculo gastrocnêmio direito com peçonha (40 µg), proteína purificada (40 µg) ou Tris-HCl 10 mM, pH 8,0, contendo CaCl<sub>2</sub> 10 mM (controle). Aos 3, 6, 12 e 24 h pós-peçonha, os camundongos foram mortos com isoflurano e amostras de sangue foram obtidas para a quantificação da atividade plasmática da creatinoquinase (CK), utilizando kits comerciais (Laborlab, Guarulhos, SP, Brasil). O músculo gastrocnêmio também foi removido nestes mesmos intervalos para análise histológica.

### **3.8.7. Análise histológica**

O músculo gastrocnêmio dissecado foi imediatamente lavado em PBS e transferido para cassetes plásticos e fixados em solução paraformaldeído 10% (Synth) preparado em tampão fosfato 0,1 M pH 7,4 durante 12 h. Uma vez fixado, o material passou por processo de desidratação em gradiente decrescente de álcool e após diafanização com xilol o tecido foi embebido e incluído em parafina (Histotec, Merck). Os blocos de parafina foram seccionados em micrótomo (Leica RM 2245, Alemanha) com espessura de 5 µm. As secções foram coradas com hematoxilina-eosina e analisadas em microscopia de luz utilizando um microcópio Leica DM 5000 B. As imagens foram capturadas e analisadas usando câmera CCD LEICA CTR 5000 e software LEICA QWIN Plus v. 3.2.0, respectivamente.

### **3.8.8. Permeabilidade vascular**

Ratos foram anestesiados com tiopental sódico (50 mg/kg, i.p.) e doses de manutenção foram administradas quando necessário. O extravasamento de proteínas plasmáticas em resposta à injeção intradérmica de peçonha (3-30 µg/sítio), proteína purificada (1-30 µg/sítio) ou solução

de Tyrode (100  $\mu$ L; controle) foi medido na pele dorsal raspada dos animais (59). As substâncias teste foram injetadas em uma ordem aleatória. O extravasamento de proteínas plasmáticas foi medido pelo acúmulo de  $^{125}$ I-albumina sérica humana (2,5  $\mu$ Ci/rato, i.v.); o corante azul de Evans (20 mg/kg, i.v.) foi usado como marcador visual para identificar os sítios de injeção. Trinta minutos após a injeção das substâncias uma amostra de sangue (1 mL) foi obtida por punção cardíaco e transferido para tubos de polipropileno contendo 100  $\mu$ L de heparina antes de ser centrifugado (8.000 x g, 10 min, temperatura ambiente) para obtenção do plasma. Em seguida, os ratos foram mortos com overdose de anestésico (isoflurano) e a pele dorsal foi removida. Os sítios injetados foram recortados e contados para a radioatividade, juntamente com amostras de plasma, em um contador gama. O extravasamento de plasma foi expresso como o volume ( $\mu$ L) de plasma acumulado em cada local da pele em comparação com a contagem total em 1 mL de plasma. Em alguns experimentos, a proteína purificada foi pré-incubada com 5 mM de fenantrolina por 10 min a 37 °C antes da injeção na pele.

### **3.9. ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Os dados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão. As comparações estatísticas foram feitas utilizando o test *t* de Student ou ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni. Valores de  $p < 0,05$  indicaram significância.

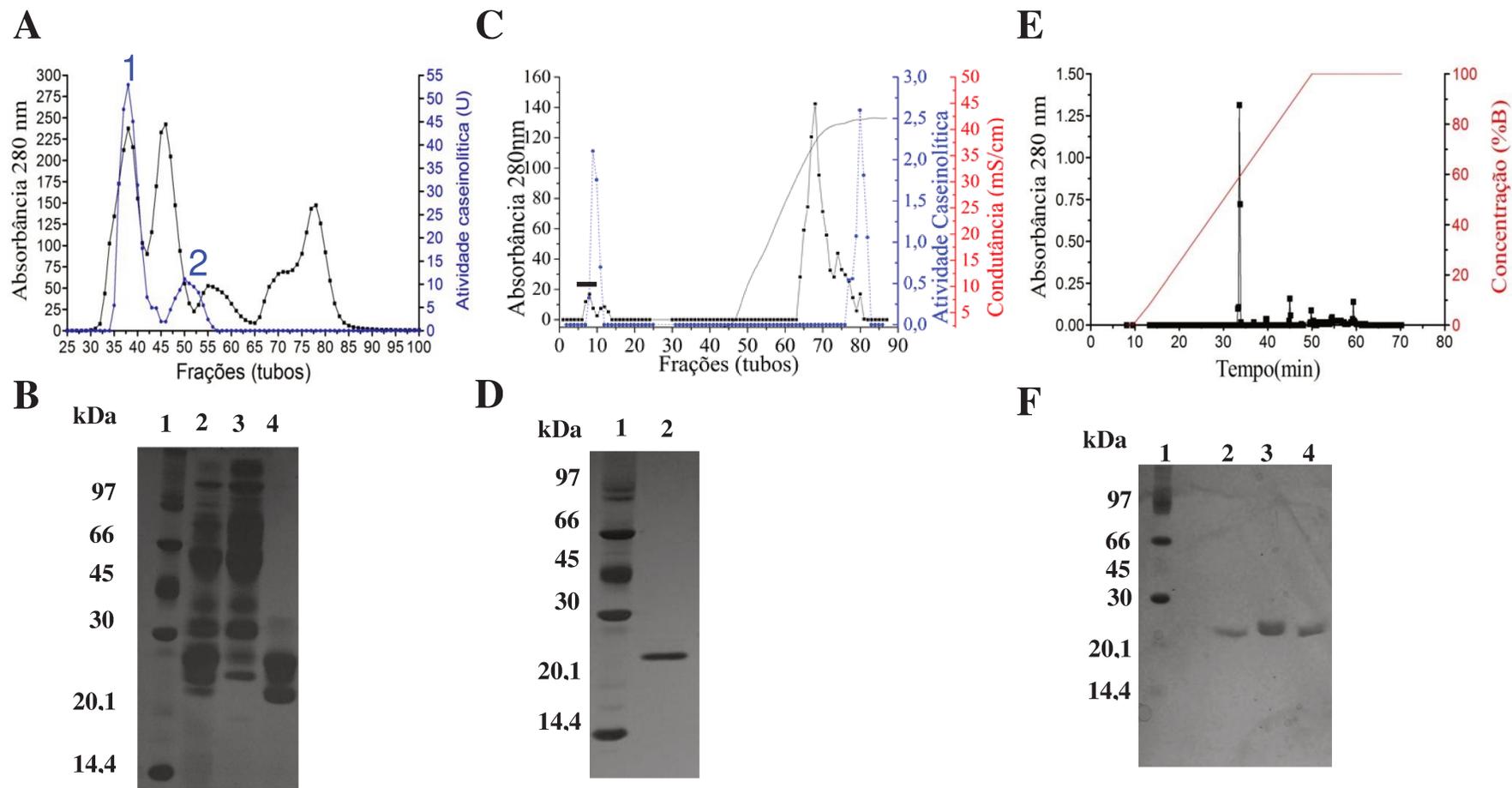
## ***RESULTADOS***



## 4. RESULTADOS

### 4.1. PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA

A Fig. 4A mostra o perfil de eluição da peçonha de *B. jararaca* e da atividade caseinolítica após gel filtração em Superdex 75; foram obtidos dois picos de atividade caseinolítica, sendo o segundo menor que o primeiro. O perfil eletroforético destes picos indicou que o primeiro pico continha bandas espalhadas num intervalo de 20 a 120 kDa, enquanto o segundo possuía bandas num intervalo mais restrito, de 20 a 35 kDa (Fig. 4B). Após concentração do segundo pico proteolítico por centrifugação em tubo Amicon (limite de filtração: 10 kDa) uma alíquota deste pico (~1,5 mg de proteína) foi aplicada em coluna Hitrap Sepharose-Q pré-equilibrada no mesmo tampão e as proteínas foram eluídas usando um gradiente linear (0-0,5 M) de NaCl; as frações foram testadas para atividade caseinolítica. A Fig. 4C mostra a eluição de um pico com atividade caseinolítica antes do início do gradiente de sal. A análise deste pico por SDS-PAGE indicou a presença de apenas uma banda de 25,2 kDa (Fig. 4D). A pureza do pico foi comprovada por RP-HPLC, que mostrou um pico principal (Fig. 4E). A incubação com agentes redutores como o  $\beta$ -mercaptoetanol e ditioneitol não alterou a massa molecular da proteína indicando que se tratava de uma proteína monomérica, ou seja, sem subunidades (Fig. 4F). A Tabela 1 resume a purificação e rendimento da proteína, denominada de BJ-PI2.



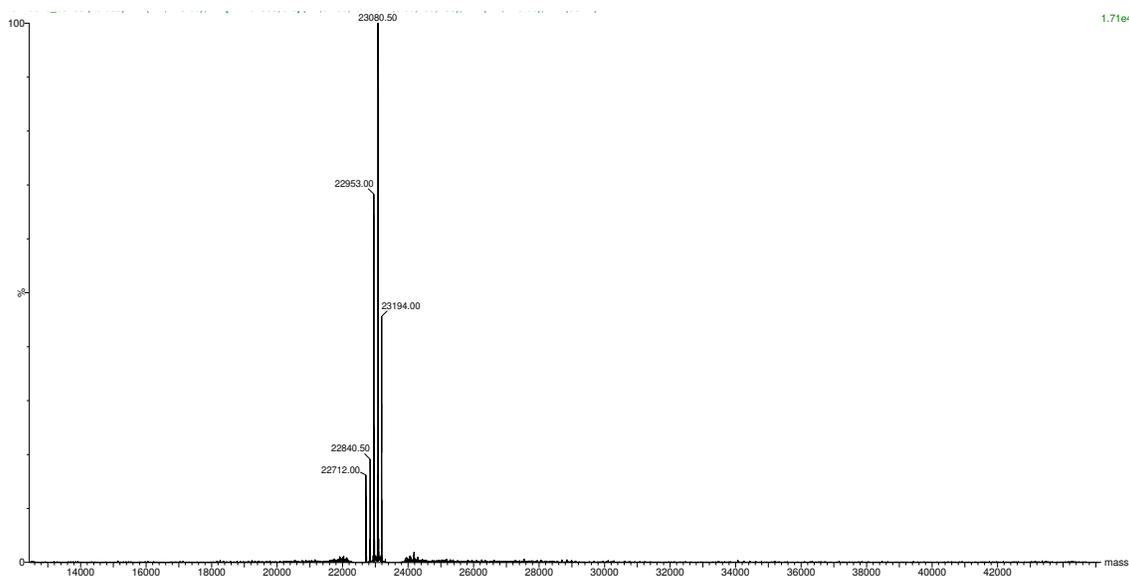
**Figura 4.** Purificação da metaloprotease BJ-PI2. (A) O perfil de eluição da gel filtração (Superdex 75) mostra dois picos (1 e 2) de atividade caseinolítica. A coluna foi pré-equilibrada e eluída com Tris-HCl 0,01 M, pH 8,0, contendo  $\text{CaCl}_2$  0,01 M e NaCl 0,15 M a um fluxo de 0,5 mL/min. O perfil cromatográfico foi monitorado em 280 nm. (■)  $A_{280}$  nm, (●) atividade caseinolítica. (B) Perfil eletroforético (SDS-PAGE) das proteínas da peçonha (faixa 2), do pico 1 (faixa 3), do pico 2 (faixa 4) e dos marcadores de massa molecular (M) em gel de poliacrilamida de 15%, corado com prata. (C) Troca iônica do segundo pico de atividade caseinolítica obtido na primeira etapa. A amostra foi aplicada a coluna Hitrap Q-Sepharose 5 mL equilibrada com tampão Tris-HCl 0,01 M, pH 8,0 contendo  $\text{CaCl}_2$  0,01 M e foi eluída em um gradiente linear (0-0,5 M) de NaCl a um fluxo de 0,5 mL/min e foram coletados 0,5 ml por fração. A eluição foi monitorada em 280 nm. (■)  $A_{280}$  nm, (●) atividade caseinolítica. A barra representa o primeiro pico de atividade caseinolítica contendo BJ-PI2. (D) SDS-PAGE da BJ-PI2 purificada, em gel de 15% corado com prata. Faixa 1 - marcador molecular; faixa 2 - BJ-PI2. (E) RP-HPLC da BJ-PI2. As proteínas foram eluídas com gradiente linear (0-100%) de acetonitrila 67% em 0,1% de TFA e a eluição foi monitorada em 280 nm. (F) Massa molecular de BJ-PI2 em condições não redutoras (faixa 1), na presença de DTT 0,1 M (faixa 2), e na presença de  $\beta$ -mercaptoetanol 0,1% (faixa 3). A massa molecular da BJ-PI2 não foi afetada por agentes redutores, indicando que a proteína é um monômero. M, marcadores moleculares (em kDa): 97 – fosforilase b, 66 – albumina, 45 – ovalbumina, 30 – anidrase carbônica, 20,1 – inibidor de tripsina de soja e 14,4 –  $\alpha$ -lactalbumina.

**Tabela 1.** Tabela de purificação da BJ-PI2.

Etapas de purificação	Proteína (mg)	Atividade total (unidades)*	Atividade específica (units/mg)	Fator de purificação	Rendimento (%)
Peçonha	103,8±3,1	1302±333	12,6±3,6	1,0	100
Gel filtração (Superdex 75)	11,4±0,4	629±124	54,6±8,9	4,3±0,7	11,8±0,3
Troca iônica (Sephrose Q)	0,469±0,21	93,9±4,9	200,2±10,6	15,9±0,8	0,45±0,18

\*Atividade proteolítica com caseína como substrato. Os valores representam a média±DP (n=3 purificações).

A análise da proteína por espectrometria de massas resultou em um pico (sinal) predominante com massa de 23,08 kDa, bastante próximo ao valor de ~25 kDa determinado por SDS-PAGE (Fig. 5). O espectro de massas também mostrou alguns picos adicionais que possivelmente representavam isoformas da proteína majoritária. Baseado nestes achados (SDS-PAGE, RP-HPLC e MS) consideramos que a proteína foi obtida com alto grau de pureza.

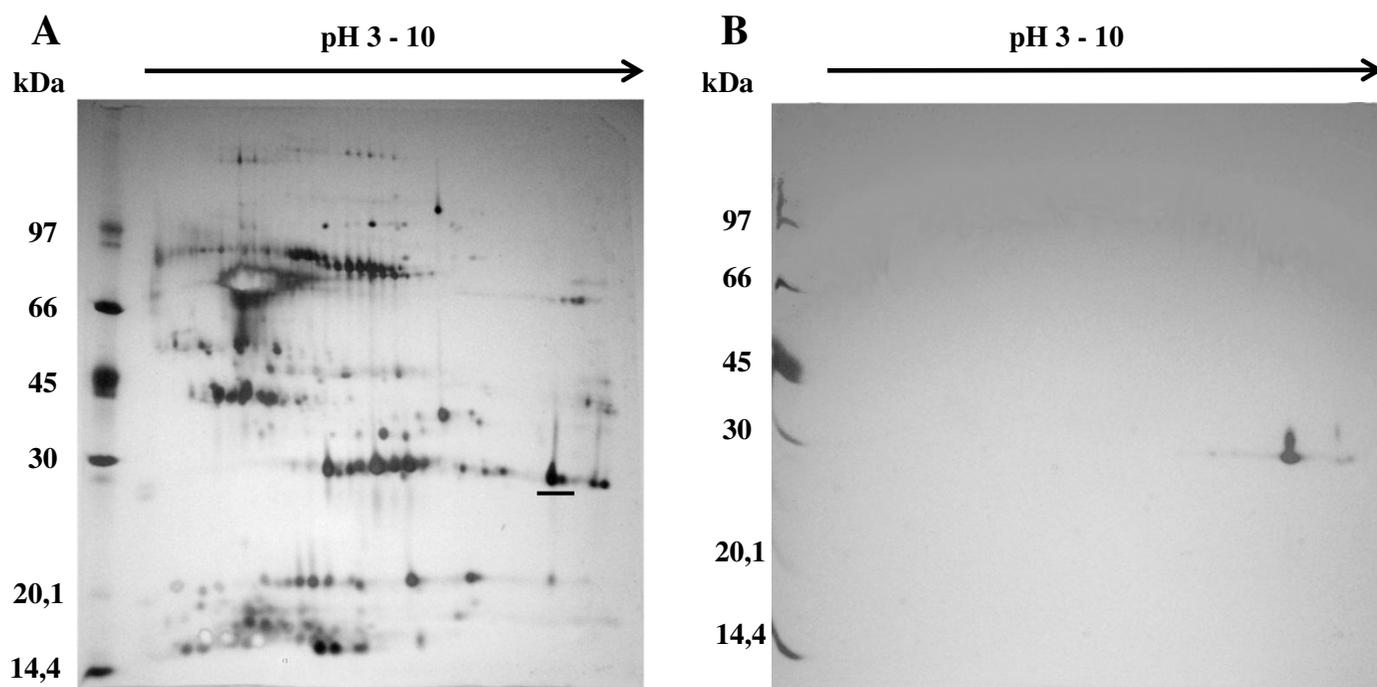


**Figura 5.** Determinação da massa molecular de BJ-PI2 (amostra não reduzida) por espectrometria de massas com ionização em eletrospray (ESI). O espectro foi obtido com um espectrômetro quadrupolo por tempo de voo (Q-TOF Ultima, Waters). A deconvolução do espectro forneceu um isótopo com massa molecular média de 23080,5 Da para o sinal mais intenso.

## 4.2. ANÁLISE BIOQUÍMICA DA PROTEÍNA

A análise da proteína por eletroforese 2D mostrou que possuía um ponto isoelétrico ( $pI$ ) de 8,1 e que ela correspondia a um *spot* bem definido no mapa 2D da peçonha de *B. jararaca* (Fig. 6).

A digestão da proteína com tripsina e subsequente análise dos fragmentos por espectrometria de massas em conjunto com buscas em bancos de dados resultou na identificação de vários peptídeos, conforme mostrado na Tabela 2.



**Figura 6.** Electroforese 2D da peçonha de *B. jararaca* (300 µg) (**A**) e BJ-PI2 (50 µg) (**B**). Géis em tira para focalização isoelétrica (13 cm; pH 3-10 linear) foram imersos em solução de re-hidratação (250 µL) contendo ureia 7 M, tioureia 2 M, CHAPS 2%, tampão de IPG 0,5%, azul de bromofenol 1% e amostra antes de usar. A primeira dimensão (focalização isoelétrica) foi feita em três passos (300 V durante 1 min, 3500 V durante 1,5 h e 3500 V durante 3,5 h). A segunda dimensão foi realizada por SDS-PAGE em géis de 15% (14 cm × 16 cm) a 300 V durante 6 h. Os géis foram corados com prata. A barra em (**A**) corresponde à posição de BJ-PI2 no perfil da peçonha

**Tabela 2.** Dados da espectrometria de massas para os peptídeos trípticos de BJ-PI2.

<i>m/z</i> observado (íon precursor)	<i>z</i>	Sequências peptídicas	Ion score**	Delta†
422,74	+2	DXXBVEK	44	-0.0185
449,75	+2	ERDXXPR	50	-0.0129
547,73	+2	YNSNXNTR	63	-0.0193
782,36	+2	VHEMVNTXNGFFR	62	-0.0601
847,40	+2	YXEXAVVADHGMFTK	85	-0.0531
691,33	+2	TXTSFGEWRR	53	-0.0330
548,75	+2	TXTSFGEW	57	-0.0315
448,89	+3	BSVAVVMDHSXK	18	-0.0242

\*X indica Leu/Ile, B indica Gln/Lys and M indica Met oxidada. \*\*Mascot ion score.

†Diferenças entre a sequência teórica e as sequências observadas.

A análise dessas sequências por meio do software BLAST revelou alta homologia com proteínas pertencentes à classe PI de SVMPs (Tabela 3), com maior homologia para a insularinase A (número de acesso UniProtKB/Swiss-Prot: Q5XUW8.1), uma SVMP PI da peçonha de *B. insularis* (60), mas também com a bothrojaractivase de *B. jararaca* (número de acesso: P0C7A9.1) (49). Além disso, houve alguma homologia com outras SVMPs da classe PI, como a BJ-PI de *B. jararaca* (50), jararafibrases II e IV (números de acesso: Q98SP2.1 e P0C6S6.1, respectivamente; 61) e BaP1 de *B. asper* (número de acesso: P83512.2; 62). Baseado nestes achados, concluímos que a proteína isolada era uma nova SVMP da classe PI, e foi nomeada de BJ-PI2, para evitar confusão com a BJ-PI caracterizada anteriormente por Oliveira *et al.* (50).

#### 4.3. CARACTERIZAÇÃO ENZIMÁTICA DA BJ-PI2

As SVMPs têm amplo envolvimento nos efeitos locais (edema, inflamação, hemorragia e mionecrose) e sistêmicos (coagulopatia e alteração na agregação plaquetária) (8,25,26). Assim, investigamos o possível papel da BJ-PI2 nestas respostas, começando com uma análise das suas atividades enzimáticas.

	1-----10-----20-----30-----40-----50-----60
BJ-PI2	----- <b>YXEXAVVADHGMFTKYNSNXNTR</b> TRVHEMVNTXNGFFR-----AS
Insularinase A	QSNLTPEQQKFSRPIELAVVADHGMFTKYNSNLNTRVHEMVNTLNNGFFRSVNVNDAS
BaP1	QSNLTPEQQRFSRPIELAVVADHGIFTKYNSNLNTRVHEMLNTVNGFYRSVDVHAP
Bj-PI	----TPEHQ----R-----RIHQMVNIMK-----
Bothrojaractivase	-----RYIELAVVADHGMFTKY-----RVHELVNTVNGFFR-----
Jararafibrase II	----TPEHQ----RYIELFIVVDHGMFMKYNGNSDKIRRRIHQMVNIMKXAYRYLYI---
Jararafibrase IV	----TPEHQ----RYIELFLVVDHGMFMKYNGNSDKIYYYIHQMVNIMKXAYXYL-----
	61-----70-----80-----90-----100-----110-----120
BJ-PI2	XANXEVWSBK <b>DXXKVEK</b> ----- <b>TXTSFGEWRE</b> R <b>DXXPR</b> -----
Insularinase A	LANLEVWSK <b>DLIKVEK</b> DSSK <b>TLTSFGEWRE</b> RDLLPRI <b>SHDHAQLLTTIVFDQQTIGLAY</b>
BaP1	LANLEVWSK <b>DLIKVQK</b> DSSK <b>TLTSFGEWRE</b> RDLLPRI <b>SHDHAQLLTA</b> VFDGNTIGRAY
Bj-PI	-----DMINVQPAAPQ <b>TLDSFGWRK</b> TDLLNRK-----
Bothrojaractivase	-----SK <b>DLIKVQK</b> D-- <b>KTLSFGEWRE</b> RDLLPRI-----
Jararafibrase II	-----
Jararafibrase IV	-----
	121-----130-----140-----150-----160-----170-----180
BJ-PI2	----- <b>BSVAVVMDHSXK</b> ----- <b>SCXMASTXSE</b>
Insularinase A	TAGMCDPR <b>QSVAVVMDHSK</b> KNLRVAVTMAHELGHNLGMDHDD-TCTCGAKSCIMASTISK
BaP1	TGGMCDPRHSVGVVRDHSKNNLWVAVTMAHELGHNLGIHHD <b>TGSCSCGAKSCIMASVLSK</b>
Bj-PI	-----
Bothrojaractivase	-----
Jararafibrase II	-----
Jararafibrase IV	-----
	181-----190-----200-----210-----220-----230-----240
BJ-PI2	-----
Insularinase A	GLSFEFKCSQ <b>QYQTYLTDHNPQCILNKPLTT</b> -----VSGNELLEAGEECDCGAPENP
BaP1	VLSYEFSDCSQ <b>QYETYLTNHN</b> PQCILNKPL <b>LT</b> -----VSGNELLEAGE-----
Bj-PI	-----YIQ <b>WDFIMKENPQCILNK</b> -----
Bothrojaractivase	-----
Jararafibrase II	-----
Jararafibrase IV	-----

**Tabela 3.** Sequências dos fragmentos de BJ-PI2 identificados por espectrometria de massa e buscas em bases de dados: comparação com outras SVMPs botrópicas da classe PI. Em cinza, fragmentos de BJ-PI2 identificados neste trabalho com homologia à insularinase A e bothrojaractivase. Aminoácidos com um sublinhado simples - fragmentos trípticos identificados por Zelanis *et al.* (63) em peçonhas de *B. jararaca* jovens e adultas, aminoácidos em negrito - fragmentos trípticos identificados por Zelanis *et al.* (64), e aminoácidos em negrito com um duplo sublinhado - aminoácidos em bothrojaractivase que diferem de BJ-PI2. Os números de acesso UniProtKB/Swiss-Prot para as proteínas nesta tabela são: P83512.2 para BaP1 (62), Q5XUW8.1 para insularinase A (60), P0C7A9.1 para bothrojaractivase (49), Q98SP2.1 para jararafibrase II (61) e P0C6S6.1 para jararafibrase IV (61). Note que a sequência de jararafibrase II é do domínio contido no sítio metaloprotease do gene que codifica para a desintegrina bothrostatina (65). As sequências dos fragmentos para BJ-PI são de Oliveira *et al.* (50) e não estão disponíveis no banco de dados UniProtKB/Swiss-Prot.

Conforme demonstrado durante as etapas de purificação, a BJ-PI2 possui atividade proteolítica sobre a caseína. Atividade proteolítica também foi observada contra a elastina, um dos principais componentes da parede arterial. A atividade contra o substrato elastina-Congo red foi consideravelmente maior que a atividade sobre o substrato sintético n-t-boc-L-alanine *p*-nitrofenil éster, que é mais específico para atividade elastásica (Tabela 4). Este achado sugere que a atividade sobre a elastina-Congo red talvez seja uma ação proteolítica inespecífica ou ‘pseudoelastásica’ devido à pouca atividade sobre o substrato sintético.

As principais elastases encontradas em vertebrados são, em sua maioria, serinoproteases que possuem atividade esterásica. Entretanto a BJ-PI2 não foi capaz de degradar o substrato sintético N $\alpha$ -*p*-tosil-L-arginina metil éster, que é amplamente usado para avaliar a atividade esterásica. Este dado corrobora a conclusão a respeito da ação ‘pseudoelastásica’ da BJ-PI2 sobre a elastina-Congo red.

**Tabela 4.** Atividades enzimáticas da BJ-PI2.

<b>Atividade (U/mg)</b>	<b>Peçonha de <i>B. jararaca</i></b>	<b>BJ-PI2</b>
Elastase		
n-t-boc-L-alanine <i>p</i> -nitrofenil éster	132 $\pm$ 28	11 $\pm$ 8
Elastina-Congo red	414 $\pm$ 34	129 $\pm$ 5
Fibrinolítica	6,3 $\pm$ 0,9	3,2 $\pm$ 1,0
Esterase	282 $\pm$ 23	n.d.

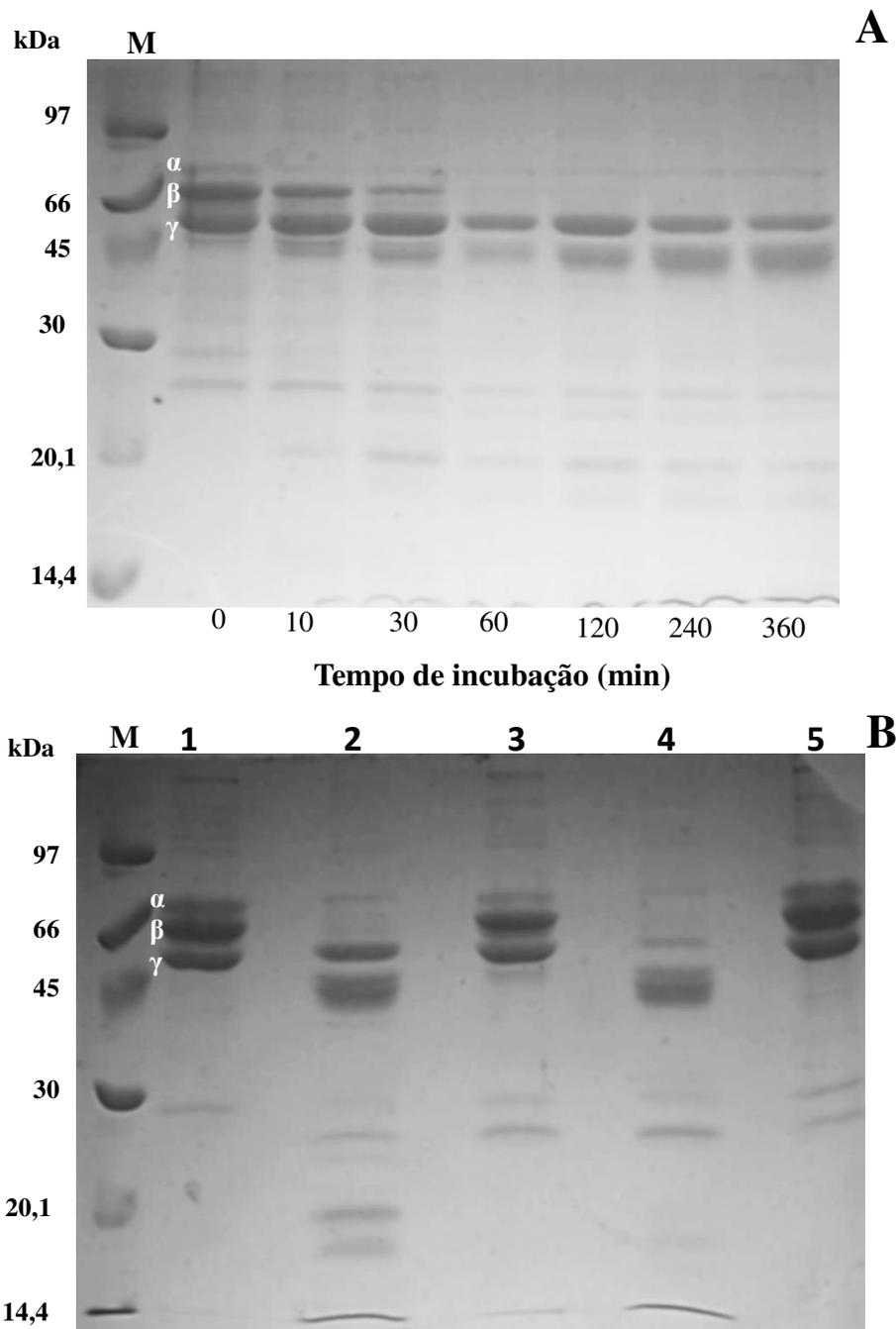
Os valores são a média  $\pm$  DP (n=3 determinações). n.d. – não detectada

#### 4.4. ATIVIDADES BIOLÓGICAS DA BJ-PI2

##### 4.4.1. Atividade fibrin(ogen)olítica e (anti)coagulante

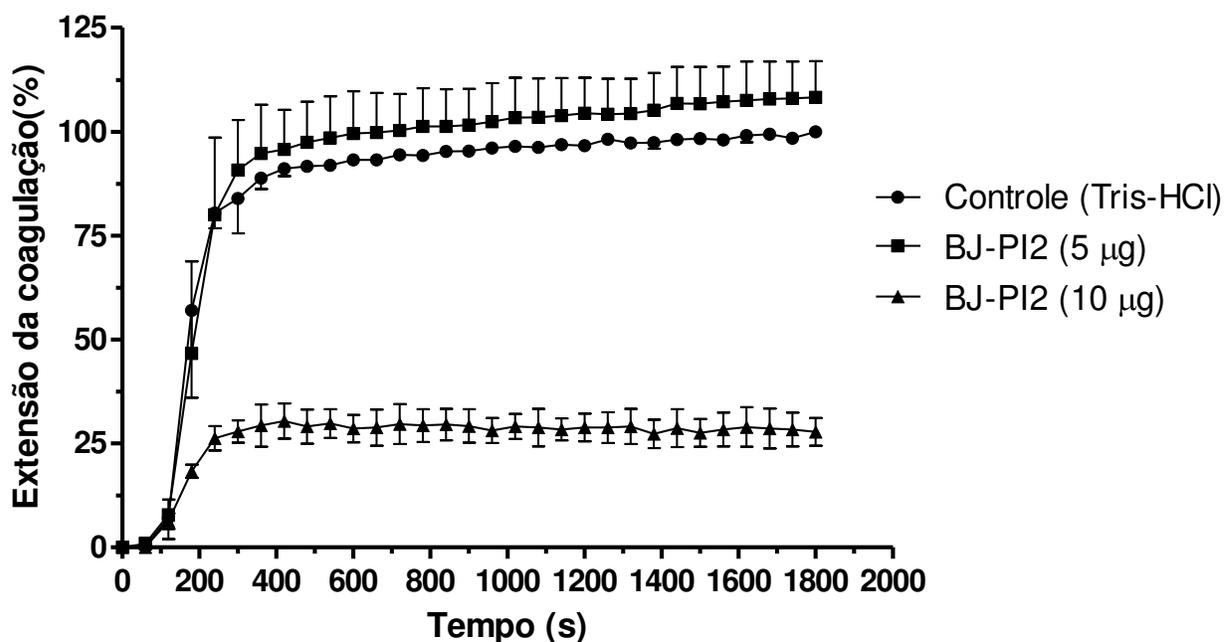
Várias SVMPs exercem ação sobre a cascata de coagulação (8,9), degradando preferencialmente as cadeias  $\alpha$  das moléculas de fibrinogênio enquanto serinoproteases degradam preferencialmente cadeias  $\beta$  (66). Neste contexto, investigamos a atividade da BJ-PI2 sobre a fibrina e o fibrinogênio e avaliamos sua suscetibilidade à inibição por 1,10-fenantrolina (inibidor de metaloproteases) e PMSF (inibidor de serinoproteases). A Tabela 4 mostra que a BJ-PI2 possui atividade fibrinolítica, a qual foi comparável à da BthMP de *B. moojeni* (67), porém superior à da neuwiedase de *B. neuwiedi* (68) e inferior à da atrolisina de *B. atrox* (69). Já a Fig. 7A mostra o perfil de degradação de fibrinogênio durante incubação de até 360 min. Houve rápida degradação da cadeia  $\alpha$  (já nos primeiros 10 min) enquanto a cadeia  $\beta$  foi bem menos sensível (degradação mais lenta, ao longo de 60 min); não houve degradação da cadeia  $\gamma$ . Este achado identificou a BJ-PI2 como sendo uma  $\alpha$  hidrolase. A Fig. 7B mostra a degradação do fibrinogênio na presença de alguns inibidores (EDTA, fenantrolina e PMSF). A pré-incubação com PMSF não aboliu a atividade fibrinogenolítica da BJ-PI2, enquanto esta atividade foi completamente abolida pela fenantrolina ou EDTA, indicando que se tratava de uma metaloprotease. A ausência de efeito do PMSF estava de acordo com a ausência de atividade esterásica mencionada anteriormente.

Tendo em vista a atividade da BJ-PI2 sobre o fibrinogênio e a fibrina, examinamos a ação coagulante desta proteína sobre fibrinogênio e plasma *in vitro*. A BJ-PI2 (40  $\mu$ g) não mostrou nenhuma atividade coagulante sobre o fibrinogênio bovino, apesar da sua capacidade de degradar este substrato (vide supra). Por outro lado, a peçonha (40  $\mu$ g) e a trombina (20 U) coagularam o fibrinogênio em  $12 \pm 1$  s e  $20 \pm 1$  s (n=3), respectivamente.



**Figura 7.** Atividade fibrinogenolítica de BJ-PI2 sobre fibrinogênio bovino 5%. **(A)** BJ-PI2 (10  $\mu$ g) foi incubada com fibrinogênio a 37 °C e alíquotas de 20  $\mu$ L foram retirados nos tempos indicados e adicionados a 20  $\mu$ L de  $\beta$ -mercapetanol 2% e DTT 2%. Após aquecimento (37 °C), as amostras foram corridas em eletroforese. **(B)** BJ-PI2 (10  $\mu$ g) foi pré-incubada a 37 °C por 10 min com diversos inibidores (1-10 fenantrolina 5 mM, PMSF 5 mM ou EDTA 10 mM) e em seguida foi incubada com fibrinogênio 5% por 30 min. Depois, 20  $\mu$ L de cada amostra foi misturada a 20  $\mu$ L de  $\beta$ -mercaptoetanol 2% e DTT 2% seguido por eletroforese. Faixa 1: fibrinogênio *in natura*, faixa 2: fibrinogênio + BJ-PI2, faixa 3: fibrinogênio + BJ-PI2 incubada com 1-10 fenantrolina, faixa 4: fibrinogênio + BJ-PI2 incubada com PMSF e faixa 5: fibrinogênio + BJ-PI2 incubada com EDTA. As amostras foram corridas por SDS-PAGE em géis de poliacrilamida de 12,5% e corados com azul de Coomassie.

BJ-PI2 (40  $\mu\text{g}$ ) também não coagulou plasma citratado de rato enquanto 40  $\mu\text{g}$  de peçonha ou 0,3 U de trombina produziram coágulo em  $42\pm 11$  s e  $281\pm 38$  s ( $n=5$ ), respectivamente. Contudo a BJ-PI2 (40  $\mu\text{g}$ ) foi capaz de diminuir a extensão da coagulação sem afetar marcadamente o tempo de recalcificação de plasma citratado (Fig. 8).

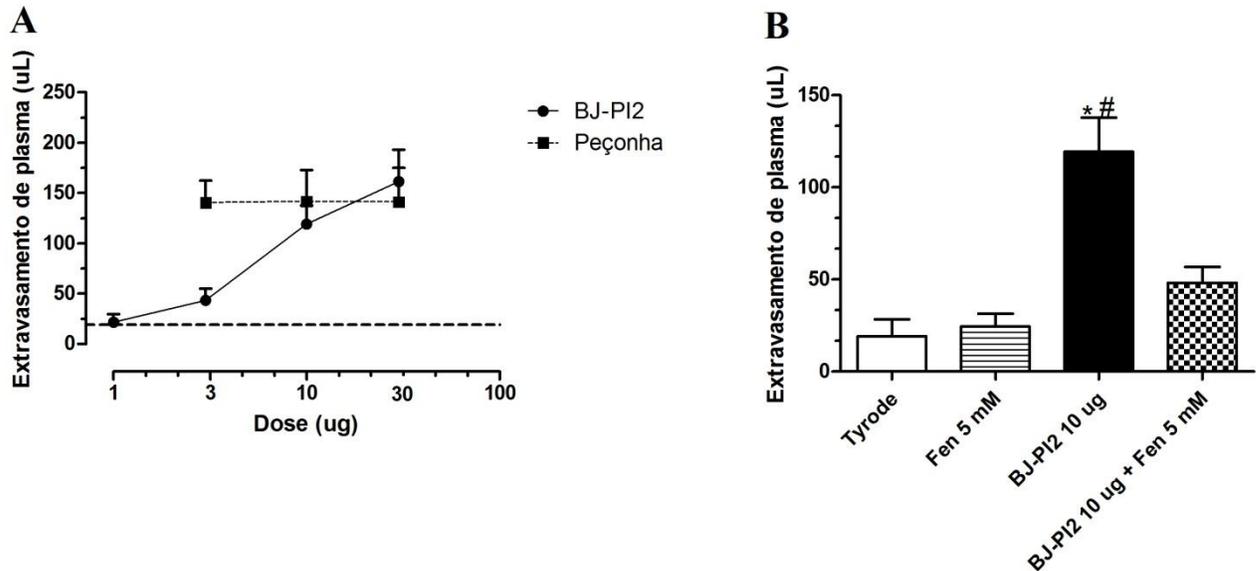


**Figura 8.** Influência de BJ-PI2 (10  $\mu\text{g}$ ) sobre o tempo de recalcificação de plasma citratado. As amostras de plasma (50  $\mu\text{L}$ ) foram pré-incubadas com Tris-HCl 50 mM, pH 7,4 (controle) ou BJ-PI2 (5  $\mu\text{g}$  ou 10  $\mu\text{g}$  em tampão Tris-HCl), em uma microplaca de 96 poços a 37 °C durante 5 min antes da adição de 10  $\mu\text{L}$  de  $\text{CaCl}_2$  250 mM a cada poço. A formação de coágulos foi monitorada durante 30 min a 650 nm em um leitor de microplacas. Os resultados são expressos como uma porcentagem do máximo de coagulação observado após recalcificação em amostras de controle de plasma tratado com tampão Tris-HCl sozinho. Os pontos são a média  $\pm$  SD ( $n = 3$  experiências independentes, utilizando plasma de três ratos).

#### 4.4.2. Permeabilidade vascular e lesão local (hemorragia e necrose)

A Fig. 9A mostra que a BJ-PI2 foi capaz de aumentar a permeabilidade em pele dorsal de ratos de forma dependente da dose. Esta atividade foi significativamente atenuada pela pré-incubação com 1,10-fenantrolina, um inibidor de metaloproteases (Fig. 9B). Quando injetada em músculo gastrocnêmio de camundongos, a peçonha de *B. jararaca* causou aumento nos níveis

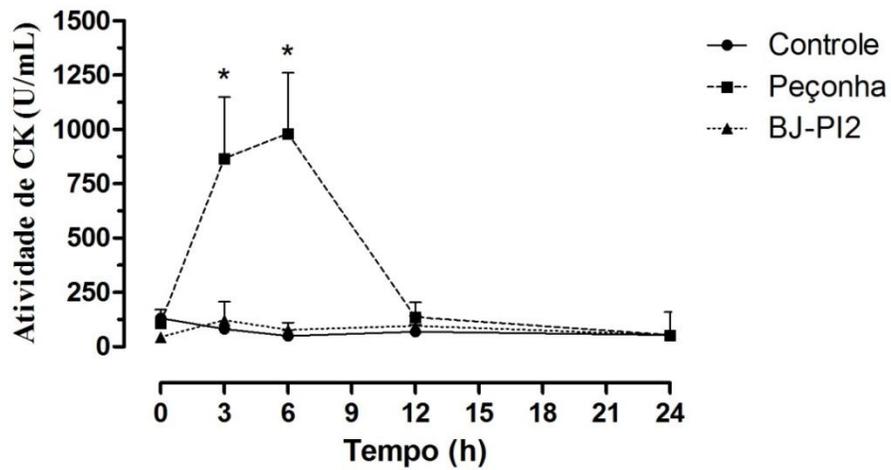
circulantes de CK após 3-6 h, indicando lesão muscular; tal resposta não foi observada com BJ-PI2, indicando que a toxina não causa lesão tecidual (Fig. 10).



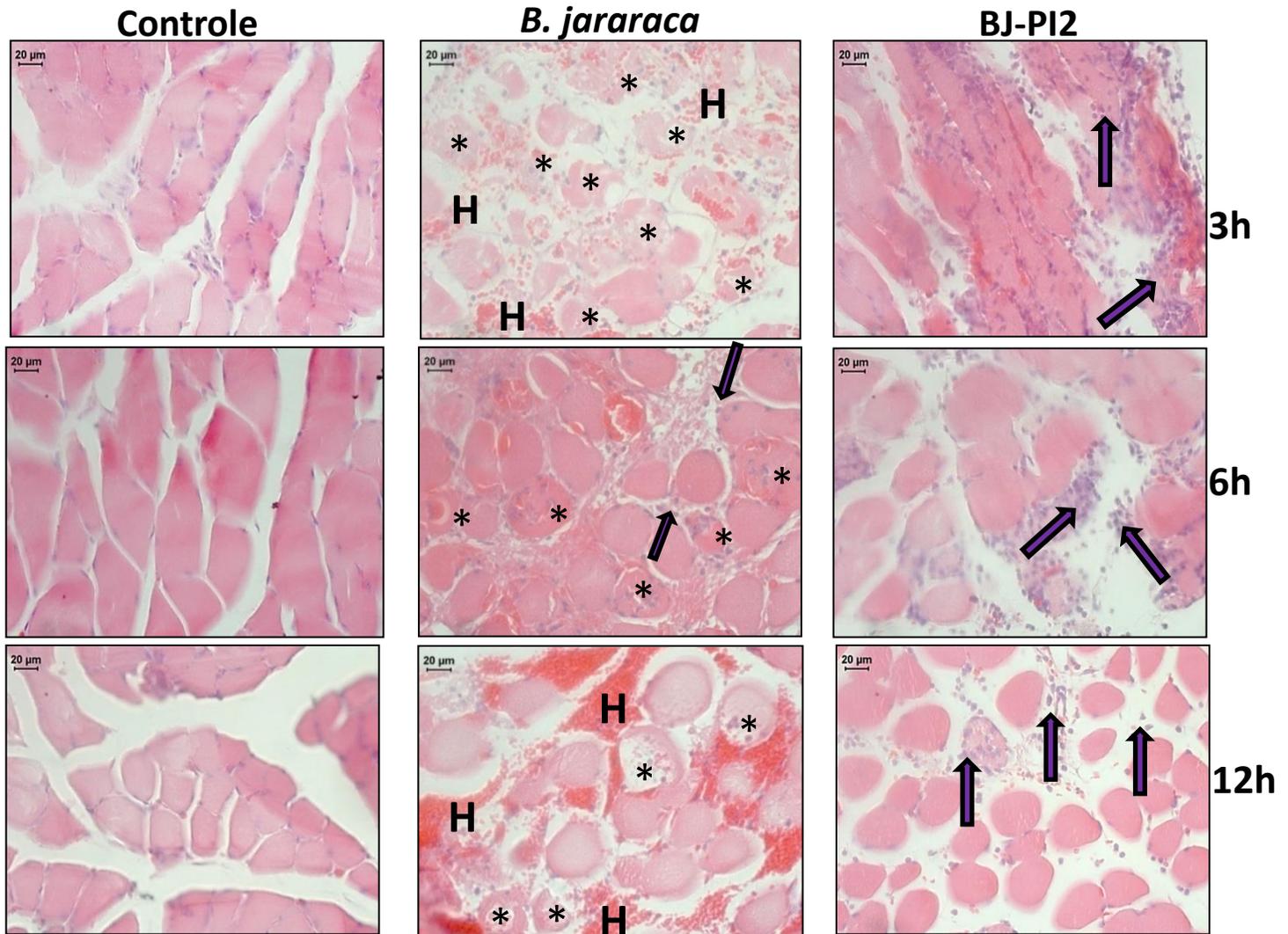
**Figura 9.** Aumento da permeabilidade vascular causado por BJ-PI2. **(A)** Curva dose-resposta para BJ-PI2. **(B)** Inibição do aumento da permeabilidade vascular por 1,10-fenantrolina. Neste caso, a BJ-PI2 (10  $\mu$ g) foi pré-incubado com 1,10-fenantrolina 5 mM durante 10 min a 37 °C antes de injetar na pele dorsal do rato. A pré-incubação com 1,10-fenantrolina atenuou o aumento da permeabilidade vascular. Em **(A)** e **(B)**, o pontos ou colunas são a média  $\pm$  DP (n = 5). \*p<0,05 comparado com solução Tyrode sozinho e 1,10-fenantrolina (Fen) sozinho. #p<0,05 comparado com BJ-PI2 + Fen.

Este achado foi confirmado pela análise histológica em que se observou hemorragia e necrose (lesão delta, fibras endemaciadas e células *ghost*) com a peçonha, mas não com a toxina. A ausência de hemorragia após injeção i.m. da BJ-PI2 foi corroborada pelo ensaio de atividade hemorrágica em pele dorsal de rato, onde a peçonha (40  $\mu$ g) produziu um halo hemorrágico de  $1,2 \pm 0,2$  cm (dose mínima hemorrágica – DMH = 20,7  $\mu$ g) enquanto a BJ-PI2 (40  $\mu$ g) produziu um halo hemorrágico <0,1 cm (semelhante à salina). Por outro lado, a BJ-PI2 induziu forte migração de células inflamatórias que foi mais marcante do que com a peçonha (Fig. 10B-J).

A Tabela 5 resume as atividades biológicas da BJ-PI2 descritas acima e apresenta uma comparação com outras metaloproteases da classe PI encontradas em outras espécies botrópicas.



**Figura 10.** Avaliação dos níveis plasmáticos circulantes de CK em camundongos injetados por via intramuscular com peçonha de *B. jararaca* (40 µg), BJ-PI2 (40 µg) ou Tris-HCl 10 mM, pH 7,5 (volume injetado: 20 µL). Os camundongos foram inoculados no músculo gastrocnêmio e amostras de sangue foram obtidas nos tempos 0, 3, 6, 12 e 24 h para a quantificação dos níveis plasmáticos de CK. Os pontos são a média ± SD (n=4).



**Figura 11.** As alterações histológicas em músculo gastrocnêmio injetado com solução salina (controle), peçonha ou BJ-PI2 (40 µL). Nos momentos indicados à esquerda, o músculo foi removido, fixado em formol tamponado a 10% e processado para análise histológica. Seções de 5 µm de espessura foram coradas com hematoxilina-eosina (HE). H – hemorragia; \* – fibras necróticas; setas – células inflamatórias.

**Tabela 5.** Comparação das propriedades de BJ-PI2 and outras metaloproteases PI isoladas de peçonhas de *B. jararaca* e outras espécies botrópicas.

Espécie	Enzima	Fibrinólise	Fibrinogenólise	Hemorragia <sup>#</sup>	Edema	Mionecrose	Rendimento (%)	Mr (kDa)	Referências
<i>B. jararaca</i>	BJ-PI2	Sim	Sim (cadeias $\alpha/\beta$ )	Não	Sim	Não	0,45	25,2	Este trabalho
	BJ-PI	*	Sim(cadeia $\alpha$ )	Não	*	*	1,4	22,0	[50]
	Bothrojaractivase	Sim	Sim (cadeias $\alpha/\beta$ )	*	*	*	0,19	22,8	[49]
	Jararafibrase II	Sim	Sim (cadeias $\alpha/\beta$ )	Sim	*	*	0,35	21,4	[44]
	Jararafibrase III	Sim	*	Sim	*	*	*	20,4	[48]
	Jararafibrase IV	Sim	*	Sim	*	*	*	21,2	[49]
<i>B. asper</i>	BaP1	*	Sim (cadeias $\alpha/\beta$ )	Sim	Sim	Sim	*	24,0	[70,72]
	BH2	*	*	Sim	*	*	*	26,0	[72]
<i>B. atrox</i>	Atroxlysin-I	Sim	Sim (cadeia $\alpha$ )	Sim	*	*	5,1	23,0	[69]
	Batx-1	*	Sim (cadeias $\alpha/\beta$ )	Sim	*	Sim	35	23,3	[73]
<i>B. insularis</i>	Insularinase A	Sim	Sim (cadeias $\alpha/\beta$ )	Não	*	*	*	22,6	[60]
<i>B. jararacussu</i>	BjussuMP-II	Sim	Sim (cadeias $\alpha/\beta$ )	Não	Sim	Não	*	24,0	[74]
<i>B. leucurus</i>	Leucurolysin-a	Sim	Sim (cadeias $\alpha/\beta$ )	Não	Sim	*	5,4	23,0	[75,76]
<i>B. marajoensis</i>	BmHF-1	*	Sim (cadeia $\alpha$ )	Sim	Sim	Não	*	27,2	[77]
<i>B. moojeni</i>	BthMP	Sim	Sim (cadeias $\alpha/\beta$ )	Sim	Sim	Sim	*	23,5	[78]
	BmooMP $\alpha$ -I	Sim	Sim (cadeias $\alpha/\beta$ )	Não	*	*	8,7	23,1	[79]
	Moojeni protease A	Sim	Sim (cadeias $\alpha/\beta$ )	Não	*	*	2,4	20,4	[80,81]
<i>B. neuwiedi</i>	BnP1	Sim	Sim (cadeias $\alpha/\beta$ )	Não	*	Não	*	24,0	[82]
	Neuwiedase	Sim	Sim (cadeias $\alpha/\beta$ )	Não <sup>+</sup>	Sim	Sim	4,0	22,4	[83,84]

\*Não determinado/não divulgado. <sup>#</sup>Toxinas com baixa atividade hemorrágica. <sup>+</sup>Sem hemorragia em pele dorsal de camundongos ou em gastrocnêmio, mas sangramentos observados por microscopia intravital após a aplicação local em músculo cremaster de camundongo ou hemorragia em pulmões após administração i.v. [70].



## ***DISCUSSÃO***



## 5. DISCUSSÃO

As SVMPs desempenham um papel importante no envenenamento, com diversas ações locais e sistêmicas. De fato, estudos transcriptômicos (19,20) e proteômicos (63,64,85) têm demonstrado que estas toxinas representam a maior família de proteínas em peçonhas botrópicas. As SVMPs são classificadas em três classes (PI, PII e PIII), sendo as pertencentes à classe PIII as mais hemorrágicas e as PI as menos hemorrágicas. Várias metaloproteases da classe PI já foram isoladas da peçonha de *B. jararaca*, tais como as jararafibrases II, III e IV (44,48), a bothrojaractivase (49) e a BJ-PI (50). Estas proteínas apresentam similaridades em seu tamanho molecular (de 20 a 27 kDa) e na sua atividade fibrin(ogen)olítica, mas possuem atividades hemorrágica e miotóxica variáveis (ver Tabela 5).

Os resultados descritos acima em comparação aos dados da literatura indicam que isolamos uma nova metaloprotease PI não hemorrágica (BJ-PI2; ~25 kDa em SDS-PAGE e 23 kDa por espectometria de massas) da peçonha de *B. jararaca*. A proteína foi purificada em duas etapas cromatográficas (gel-filtração em Superdex75 seguida de troca iônica em Q-Sepharose). Na SDS-PAGE a BJ-PI2 apresentou uma única banda e um pico simétrico em HPLC. A primeira etapa de purificação usada nesse trabalho foi uma cromatografia de exclusão molecular na qual as moléculas são separadas segundo o seu tamanho molecular, com moléculas maiores sendo eluídas antes de moléculas menores. A primeira etapa apresentou quatro picos principais de proteínas, dos quais os dois primeiros apresentaram atividade proteolítica. A SDS-PAGE dos picos obtidos na primeira etapa de purificação indicou uma massa molecular entre 20 e 30 kDa para a BJ-PI2. Na segunda etapa foi feita uma cromatografia de troca aniônica na qual a separação se dá pela quantidade de cargas negativas das proteínas que, por sua vez, é determinada pelo pH do tampão onde a amostra está diluída, de modo que as proteínas

abaixo do seu ponto isoelétrico (pI) estarão protonadas e serão repelidas pela resina, sendo eluídas antes do gradiente de sal; as que estão no seu pI também serão eluídas, somente ficando retidas as proteínas acima do seu pI, isto é, as proteínas carregadas negativamente. A BJ-PI2 foi eluída antes do gradiente em pH 8,0 (pH do tampão utilizado), indicando que a proteína ou estava abaixo do seu pI ou no pI.

A divergência entre as massas moleculares encontradas por SDS-PAGE e espectrometria de massas pode ser explicada com base na perda da conformação natural da BJ-PI2 pela adição de SDS (detergente que tem a propriedade de entrar na estrutura da proteína fornecendo a essa última cargas negativas), tornando a proteína mais filamentosa e dificultando sua migração, de modo que a proteína tem sua massa molecular relativa aumentada. Contudo, quando adicionamos DTT e  $\beta$ -mercaptoetanol, dois agentes redutores que promovem a quebra das pontes dissulfeto, nenhum incremento na massa relativa da BJ-PI2 foi observado em SDS-PAGE, indicando que a BJ-PI2 apresenta cadeia polipeptídica única. A análise espectrométrica da proteína intacta mostrou uma série de picos que diferiam em massa por 482 Da, o que poderia revelar a existência de isoformas ou ainda de diferentes estados pós-traducionais. Por sua vez, a análise dos fragmentos trípticos indicou que a BJ-PI2 compartilhou maior homologia com a insularinase-A, uma metaloprotease PI, isolada da peçonha de *B. insularis*(60). Análises transcriptômicas (19) e proteômicas (63,64) anteriores da peçonha de neonatos e adultos de *B. jararaca* já identificaram uma proteína relacionada à insularinase A, contudo esta ainda não tinha sido isolada. A análise das Tabelas 2 e 3 mostra que sete dos oito fragmentos foram identificados anteriormente por Zelanis *et al.* (63,64); o oitavo fragmento (BSVAVVMDHSBB) identificado aqui é novo. Fragmentos não detectados aqui, mas identificados em estudos anteriores incluem ASXANXEVWSB, SCXMASTXSB, ABCAEGXCCDBCR, CTGBSADCPR e

GDNPDDRCTGBSADCPR (Tabela 3). Juntas, essas sequências indicam que a BJ-PI2 é relacionada à insularinase A.

Uma das características mais marcantes do envenenamento botrópico é a hemorragia (84). As principais toxinas responsáveis por esta ação são as SVMPs na peçonha dessas serpentes (24). Essa manifestação é resultado da interação do sítio catalítico dessas proteínas (9) com as proteínas da matriz extracelular (MEC) e da lâmina basal dos vasos sanguíneos, além do consumo de alguns dos fatores de coagulação, principalmente fibrinogênio (8).

Estudos experimentais com SVMPs isoladas de peçonhas botrópicas revelaram diferenças no nível de hemorragia causada por estas proteínas. Mandelbaum *et al.* (42) isolaram a botropasina da peçonha de *B. jararaca*, mostrando sua moderada ação hemorrágica, enquanto que a HF3 isolada da mesma peçonha é uma das metaloproteases mais hemorrágicas conhecidas, com a dose mínima hemorrágica em nanogramas (35); a jararagina também possui atividade hemorrágica (43,44). Todas essas proteínas são metaloproteases da classe PIII. Entre serpentes desse gênero há algumas metaloproteases PI com capacidade hemorrágica baixa, como a BaP1 isolada de *B. asper* (70), BmHF-1 isolada de *B. marajoensis* (77), BthMP de *B. moojeni* (78) e as jararafibrases III e IV (48), ou ainda capacidades hemorrágicas comparáveis às encontradas entre as SVMPs P-III, como é o caso da jararafibrase II isolada de *B. jararaca* (44). Há, entretanto, SVMPs PI botrópicas aparentemente destituídas de atividade hemorrágica (50,79-81,83,84).

Além da importância do sítio catalítico, parece haver o envolvimento de outros mecanismos que expliquem essa diferença na atividade hemorrágica, tais como a interação com componentes da MEC, sendo o mais importante deles: (a) o colágeno, ao qual metaloproteases PIII possuem afinidade a despeito da existência do sítio

desintegrina (34), (b) a ligação com algumas proteínas plasmáticas tais como a  $\alpha_2$ -macroglobulina que inibem a ação dessas proteases [as PIII possuem baixa afinidade para tal proteína] (69) e (c) o nível de glicosilação das moléculas que interferiria na interação metaloprotease-substrato (35). Embora tais eventos possam explicar, em parte, a diferença entre as atividades hemorrágicas, o mecanismo exato que leva a essa manifestação ainda precisa ser elucidado (9). É possível que nenhum desses eventos aja de maneira independente e que a hemorragia provocada por metaloproteases seja resultado de uma combinação destas interações protéicas.

As metaloproteases hemorrágicas (hemorraginas) de peçonha ofídicas, por guardar similaridades estruturais com as MMPs (*matrix metalloproteinases*), podem degradar proteínas de membrana basal e da MEC (87). Os principais alvos de ataque são o colágeno IV (45), perlecan, fibronectina, vitronectina e laminina (9,45). Uma das proteínas importantes da MEC é a elastina, uma proteína estrutural insolúvel que confere elasticidade a tecidos e vasos sanguíneos e é degradada em condições fisiológicas pela elastase de neutrófilos que possui uma afinidade para aminoácidos hidrofóbicos ou com cadeias laterais aromáticas tais como alanina ou triptofano (88). O ataque a essas proteínas é um dos fatores determinantes para a manifestação da hemorragia no envenenamento botrópico (9).

Quando testada a capacidade da BJ-PI2 de degradar a elastina observamos que a degradação ocorreu de maneira diferente da qual é vista para a elastase de neutrófilo uma vez que BJ-PI2 degradou a elastina-Congo red porém mostrou pouca atividade sobre o substrato sintético Ala-*p*-nitrofenil, sugerindo uma degradação inespecífica e ineficiente. Em pele dorsal de rato, a BJ-PI2 (10 e 40  $\mu$ g) não provocou hemorragia. A ausência de hemorragia pode ser explicada por dois fatos: [1] pode-se ter utilizado uma quantidade muito menor do que necessária para provocar hemorragia uma vez que, por

exemplo, foram utilizadas as quantidades de 50 e 200 µg para detectar uma DHM baixa para a BnP-1 e neuwiedase, respectivamente, ambas isoladas de *B. neuwiedii* (68,82), e [2] a BJ-PI2 pode realmente não ser capaz de degradar de forma específica o colágeno, (como observado em zimografia; dado não mostrado) ou a elastina (como visto nesse trabalho). Neste caso, a BJ-PI2 não seria capaz de interagir com as proteínas que circundam os vasos sanguíneos, impossibilitando a lesão dos mesmos.

As propriedades proteolíticas das peçonhas botrópicas são conhecidas desde o séc. XIX, e desde os primeiros estudos com essas peçonhas, na metade do séc. XX, são conhecidas duas frações proteolíticas distintas (88). Uma dessas frações tem ação sobre caseína e é sensível a aquecimento e a outra cliva benzoil arginina metil éster (BAME, um substrato similar ao TAME) com atividade tripsínica e é resistente a aquecimento (29), sendo que essa última seria responsável pelo efeito coagulante da peçonha (31).

Essas duas frações referem-se às duas classes de proteases presentes nas peçonhas botrópicas, ou seja, [1] metaloproteases hemorrágicas e anticoagulantes, em sua maioria e [2] serinoproteases com baixa atividade proteolítica e procoagulantes, essa última com afinidade para argininas e substratos sintéticos contendo esse aminoácido. Conforme observado nesse estudo, a BJ-PI2 não mostrou atividade sobre o substrato sintético TAME, indicando a ausência de contaminação por serinoproteases, o que também foi comprovado pela falta de inibição da atividade edematogênica por PMSF. Estes resultados mostraram que a ação fibrino(geno)lítica era devida somente à BJ-PI2.

Segundo Markland (66), as peçonhas ofídicas contêm componentes que podem interferir na hemostasia da presa. Estes componentes podem ser agrupados em quatro grupos com diferentes ações, a saber: [1] Fatores procoagulantes que podem ativar fatores V, IX e X e protrombina, formando coágulos de fibrinogênio, [2] Fatores anticoagulantes que ativam a proteína C ou podem ligar-se aos fatores IX e X, inibindo-

os, além de inibir a trombina, [3] fatores fibrino(geno)líticos que degradam fibrinogênio e fibrina de forma direta ou que podem converter plasminogênio em plasmina levando, indiretamente, à degradação aqueles dois fatores, e [4] Fatores que ativam ou inibem a agregação plaquetária.

As metaloproteases PI de diferentes peçonhas mostram algumas similaridades quando comparadas suas propriedades enzimáticas. Fox e Serrano (23,89), Koh *et al.* (90) e Oliveira *et al.* (35) afirmam que estas proteínas desempenham um papel central no consumo de fatores de coagulação e assim, por consequência, estão relacionadas à coagulopatia manifestada por pessoas envenenadas por viperídeos. Assim como outras metaloproteases PI encontradas na peçonha de *B. jararaca* (44,49), a BJ-PI2 possui atividade fibrino(geno)lítica.

As SVMPS degradam as cadeias  $\alpha$  e  $\beta$  do fibrinogênio, deixando quase incólume a cadeia  $\gamma$  (66). A BJ-PI2 mostrou esse mesmo perfil de degradação no qual, ao menos *in vitro*, a BJ-PI2 degradou preferencialmente a cadeia  $A\alpha$  do fibrinogênio, porém em tempos prolongados (>10 min), a cadeia  $B\beta$  também foi degradada. Esta atividade foi prontamente abolida na presença de EDTA e fenantrolina, dois inibidores conhecidos de metaloproteases. Baseado nessa preferência, podemos classificar a BJ-PI2 como uma  $\alpha$ -fibrinogenase. Entretanto, quando analisamos o tempo de coagulação, BJ-PI2 mostrou-se incapaz de coagular tanto uma solução de fibrinogênio *in vitro* quanto o plasma murino pobre em plaquetas. Dessa forma concluiu-se que a BJ-PI2 não possui atividade trombina-símile, atividade mais comum entre as serinoproteases componentes das peçonhas viperídicas (66).

A ação de ativadores de protrombina de peçonha converte a protrombina em meizotrombina que leva à coagulação do plasma. Vários ativadores de protrombina já foram isolados das peçonhas botrópicas, porém duas delas mostram similaridades na

cadeia proteica com a BJ-PI2, a saber, a insularinase A (60) isolada de *B. insularis* e a bothrojaractivase (49) isolada de *B. jararaca*. Além disso, estas três metaloproteases guardam similaridades nos padrões de atividade: todas apresentam atividade fibrino(gen)olítica, são  $\alpha$ -fibrinogenases não hemorrágicas e possuem massas moleculares semelhantes (entre 20 e 25 kDa). Contudo, como ativadores de protrombina, a bothrojaractivase e a insularinase A possuem atividade pró-coagulante em plasma de modo que as duas diminuem o tempo de recalcificação do plasma. Embora a BJ-PI2 não tivera atividade coagulante ela poderia estar agindo em outros fatores de coagulação além do fibrinogênio, interferindo no tempo de recalcificação. Por isso examinamos o tempo de recalcificação do plasma de ratos na presença de BJ-PI2. Os resultados mostraram que embora a coagulação do plasma se torne menos eficiente devido ao consumo de fibrinogênio, evidenciado pela menor absorbância em 650 nm da solução de plasma, a proteína BJ-PI2 não interferiu no tempo de recalcificação, o que sugere que esta proteína não degrada/ativa outros fatores de coagulação.

É sabido que as peçonhas botrópicas podem provocar edema no local da mordida por dois principais mecanismos: [1] por ação direta de componentes dessas peçonhas ou [2] pela liberação de mediadores endógenos como histamina, proteínas do sistema complemento, prostaglandinas e algumas citocinas pró-inflamatórias (91,92). Os principais componentes protéicos responsáveis por essa manifestação são as PLA<sub>2</sub> e as SVMPs (93). No caso das SVMPs, o mecanismo principal envolvido no extravasamento plasmático é a liberação de citocinas pró-inflamatórias (94). Moura-da-Silva *et al.* (36) mostraram que a metaloprotease jararagina isolada da peçonha de *B. jararaca* foi capaz de provocar a liberação de TNF- $\alpha$  *in vitro*. Além disso, Rucavado *et al.* (70) encontraram níveis aumentados de IL-1 $\beta$  e IL-6 em homogenatos musculares (músculo gastrocnêmio de camundongos) injetados com BaP1, uma metaloprotease da

peçonha de *B. atrox*. Conforme mostrado aqui, a BJPI-2, quando injetada em pele dorsal de rato provocou o extravasamento plasmático (edema) compatível com o observado na mesma dose (40 µg) de peçonha de *B. jararaca*. Adicionalmente a isso, quando injetada em músculo gastrocnêmio de camundongos, a proteína não demonstrou ação mionecrótica, porém as imagens histológicas mostram infiltrado inflamatório nos tempos de 3 e 6 horas, indicando que esta proteína é capaz de estimular a migração de células inflamatórias para o local de injeção, talvez através da liberação local de citocinas pró-inflamatórias.

O envenenamento botrópico frequentemente resulta em dano local, com o aparecimento de dermonecrose e mionecrose (95,96), sendo que as SVMPs desempenham papel importante na mionecrose (94,96). O mecanismo proposto para a ação mionecrótica das metaloproteases seria indireto, isto é, essas moléculas provocariam hemorragia local e conseqüente isquemia com morte de células locais (26). Gutiérrez *et al.* (97) estudaram a ação da BaH1, metaloprotease hemorrágica isolada de *B. asper*, e mostraram que a mionecrose causada por essa proteína estava localizada próximo a porções do músculo com hemorragia abundante; esta mionecrose aparecia tardiamente em relação a hemorragia e não era desencadeada em músculo mantido *in vitro* com suprimento adequado de oxigênio, indicando uma possível relação entre a mionecrose e isquemia local.

Em alguns casos, parece haver uma relação entre a hemorragia e a mionecrose causadas por SVMP. Rodrigues *et al.* (84) mostraram que a neuwiedase isolada de *B. neuwiedii* é capaz de produzir hemorragia na dose de 40 µg (quando analisado o músculo cremaster de camundongos em microscopia intravital) e um pequeno aumento nos níveis de CK plasmático e infiltrado inflamatório quando é injetado (200 µg) diretamente em músculo gastrocnêmio de camundongos. Em outro estudo (83), essa

mesma proteína, numa dose de 50 µg, causou o aumento significativo de citocinas pró-inflamatórias (TNF- $\alpha$ , KC e IL-1 $\beta$ ) e foram observadas fibras mionecróticas em músculo gastrocnêmio. Adicionalmente, a BaP1 e a BthMP, duas SVMPs PI hemorrágicas isoladas de *B. asper* e *B. moojeni*, respectivamente, induziram mionecrose *in vivo* em gastrocnêmio de camundongos (78,97). Entretanto, Baldo *et al.* (82) mostraram que tanto a jararagina (PIII hemorrágica de *B. jararaca*) quanto a BnP1 (PI fracamente hemorrágica de *B. neuwiedii*) não provocaram a liberação de CK quando injetadas em músculo gastrocnêmio de camundongo. Além disso, não interferiram diretamente na viabilidade celular de mioblastos da linhagem C2C12, demonstrando que tais proteínas podem provocar hemorragia, porém não causam a morte de células musculares nem diretamente nem indiretamente (por extravasamento sanguíneo e consequente isquemia). Em concordância com esses achados Torres-Huaco *et al.* (77) relataram o isolamento da SVMP PI BmHF-1 da peçonha de *B. marajoensis* que suscitou hemorragia em pele dorsal de camundongos (DMH = 41.4 µg) porém não causou mionecrose quando injetada em gastrocnêmio de camundongo. Embora a isquemia possa explicar o surgimento de mionecrose relacionada à injeção de algumas SVMPs hemorrágicas, é provável que existam outros mecanismos que também podem explicar a relação entre mionecrose e hemorragia provocadas por metaloproteases.



## ***CONCLUSÃO***



## 6. CONCLUSÃO

Os resultados deste estudo mostram que a BJ-PI-2 é uma nova metaloprotease da classe P-I isolada da peçonha de *B. jararaca*. As características bioquímicas e farmacológicas desta toxina se assemelham bastante a outras SVMPS desta classe isoladas de peçonhas botrópicas. A observação de que a BJ-PI2 é capaz de afetar a extensão da coagulação durante a recalcificação bem como sua capacidade de aumentar a permeabilidade vascular e induzir uma resposta inflamatória sugerem a participação desta toxina nos efeitos locais induzidas pela peçonha de *B. jararaca*.



## ***REFERÊNCIAS***



## 7. REFERÊNCIAS

1. Melgarejo AR. Serpentes peçonhentas do Brasil. In: Cardoso JLC, França FOS, Wen FH, Málaque CMS, Haddad Jr, V. (Eds.), Animais Peçonhentos no Brasil: Biologia, Clínica e Terapêutica dos Acidentes. São Paulo: Sarvier/FAPESP. 2003, pp. 33-61.
2. Campbell JA, Lamar WW. Venomous Reptiles of the Western Hemisphere. Ithaca: Comstock Publishing Associates/Cornell University Press. 2004, vol. 2.
3. França FOS, Málaque CMS. Acidente botrópico. In: Cardoso JLC, França FOS, Wen FH, Málaque CMS, Haddad Jr. V. (Eds.), Animais Peçonhentos no Brasil: Biologia, Clínica e Terapêutica dos Acidentes, São Paulo: Sarvier/FAPESP. 2003, pp. 72-86.
4. Warrell DA. Snakebites in Central and South America: epidemiology, clinical features and clinical management. In: Campbell JA, Lamar WW. Venomous Reptiles of the Western Hemisphere. Ithaca: Comstock Publishing Associates/Cornell University Press. 2004, pp. 709-61, vol. 2.
5. Brasil, Ministério da Saúde. Manual de Diagnóstico e Tratamento de Acidentes por Animais Peçonhentos. Ministério da Saúde/Vigilância Sanitária, Brasília, DF. 2005.
6. Ribeiro LA, Gadia R, Jorge MT. Comparison between the epidemiology of accidents and the clinical features of envenoming by snakes of the genus *Bothrops*, among elderly and non-elderly adults. Rev Bras Med Trop 2008;41(1):46-9.
7. Rodrigues SL, Florido Mendes GE, Carlos CP, Burdmann EA. Acute kidney injury caused by *Bothrops* snake venom. Nephron Clin Pract 2011;119(2):c131-6.
8. Gutiérrez JM, Rucavado A, Escalante T, Díaz C. Hemorrhage induced by snake venom metalloproteinases: biochemical and biophysical mechanisms involved in microvessel damage. Toxicon 2005;45(8):997-1011.
9. Escalante T, Rucavado A, Fox JW, Gutiérrez JM. Key events in microvascular damage induced by snake venom hemorrhagic metalloproteinases. J Proteomics 2011;74(9):1781-94.
10. Gutiérrez JM, Ownby C. Skeletal muscle degeneration induced by venom phospholipase A<sub>2</sub>: insights into the mechanisms of local and systemic myotoxicity. Toxicon 2003;42(8):915-31.
11. Teixeira CFP, Fernandes CM, Zuliani JP, Zamuner SF. Inflammatory effects of snake venom metalloproteinases. Mem Inst Oswaldo Cruz 2005;100(1):181-4.
12. Aird SD. Ophidian envenomation strategies and the roles of the purines. Toxicon 2002;40(4):335-93.
13. Paes Leme AF, Prezoto BZ, Yamashiro ET, Bertholim L, Tashima AK, Klitzke CF. *Bothrops* protease A, a unique highly glycosylated serine proteinase, is a potent, specific fibrinolytic agent. J Thromb Haemost 2008;6(8):1363-72.

14. Costa JO, Fonseca KC, Mamede CCN, Beletti ME, Santos-Filho NA, Soares AM *et al.* Bhalternin: functional and structural characterization of a new thrombin-like enzyme from *Bothrops alternatus* snake venom. *Toxicon* 2010;55(7):1365-77.
15. Panunto PC, da Silva MA, Linardi A, Buzin MP, Melo SE, Mello SM *et al.* Biological activities of a lectin from *Bothrops jararacussu* snake venom. *Toxicon* 2006;47(1):21-31.
16. Mendonça-Franqueiro EP, Alves-Paiva RM, Sartim MA, Callejon DR, Paiva HH, Antonucci GA. Isolation, functional, and partial biochemical characterization of galatrox, an acidic lectin from *Bothrops atrox* snake venom. *Acta Biochim Biophys Sin* 2011;43(3):181-92.
17. Naumann GB, Silva LF, Silva L, Faria G, Richardson M, Evangelista K, *et al.* Cytotoxicity and inhibition of platelet aggregation caused by an L-amino acid oxidase from *Bothrops leucrus* venom. *Biochim Biophys Acta* 2011;1810(7):683-94.
18. Rodrigues RS, da Silva JF, Boldrini França J, Fonseca FP, Otaviano AR, Henrique Silva F, *et al.* Structural and functional properties of Bp-LAAO a new L-amino acid oxidase isolated from *Bothrops pauloensis* snake venom. *Biochimie* 2009;91(4):490-501.
19. Cidade DAP, Simão TA, Dávila AMR, Wagner G, Junqueira-de-Azevedo ILM, Ho PL, *et al.* *Bothrops jararaca* venom gland transcriptome: analysis of the gene expression pattern. *Toxicon* 2006;48(4):437-61.
20. Cardoso KC, Da Silva MJ, Costa GGL, Torres TT, Del Bem LEV, Vidal RO *et al.* A transcriptomic analysis of gene expression in the venom gland of *Bothrops alternatus* (urutu). *BMC Genetics* 2010;11:605.
21. Mackessy SP (Ed.). *Handbook Venoms and Toxins of Reptiles*. Boca Raton:Taylor & Francis. 2009, p. 491.
22. Torii S, Yamane K, Mashima T, Haga N, Yamamoto K, Fox JW *et al.* Molecular cloning and functional analysis of apoxin I, a snake venom-derived apoptosis-inducing factor with L-amino acid oxidase activity. *Biochemistry* 2000;39(12):3197-205.
23. Fox JW, Serrano SMT. Insights into and speculations about snake venom metalloproteinase (SVMP) synthesis, folding and disulfide bond formation and their contribution to venom complexity. *FEBS J* 2008;275(12):3016-30.
24. Fox JW, Serrano SMT. Structural considerations of the snake venom metalloproteinases, key members of the M12 reprotolysin family of metalloproteinases. *Toxicon* 2005;45(8):969-85.
25. Hati R, Mitra P, Sarker S, Bhattacharyya KK. Snake venom hemorrhagins. *Crit Rev Toxicol* 1999;29(1):1-19.
26. Gutiérrez JM, Rucavado A. Snake venom metalloproteinases: their role in the pathogenesis of local tissue damage. *Biochimie* 2000;82(9-10):841-50.
27. Massova I, Kotra LP, Fridman R, Mobashery S. Matrix metalloproteinases:

- structures, evolution, and diversification. *FASEB J.* 1998;12(12):1075-95.
28. Brazil, V. *A Defesa Contra o Ophidismo*. São Paulo: Pócai e Weiss. 1911.
  29. Hamberg U, Rocha e Silva M. On the release of bradykinin by trypsin and snake venoms. *Arch Int Pharmacodyn Ther* 1957;110(2-3):222-38.
  30. Holtz P, Raudonat HW. Relationship between proteolytic and coagulative activity and bradykinin liberation by snake venoms. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Exp Pathol Pharmacol* 1956;229(2):113-22.
  31. Henriques OB, Evseeva L. Proteolytic, esterase and kinin-releasing activities of some Soviet snake venoms. *Toxicon* 1969;6(3):205-9.
  32. Serrano SM, Mentele R, Sampaio CA, Fink E. Purification, characterization, and amino acid sequence of a serine proteinase, PA-BJ, with platelet-aggregating activity from the venom of *Bothrops jararaca*. *Biochemistry* 1995;34(21):7186-93.
  33. Lu Q, Clemetson JM, Clemetson KJ. Snake venoms and hemostasis. *J Thromb Haemost* 2005;3(8):1791-9.
  34. Moura-da-Silva AM, Ramos OH, Baldo C, Niland S, Hansen U, Ventura JS *et al.* Collagen binding is a key factor for the hemorrhagic activity of snake venom metalloproteinases. *Biochimie* 2008;90(3):484-92.
  35. Oliveira AK, Paes Leme AF, Asega AF, Camargo AC, Fox JW, Serrano SM. New insights into the structural elements involved in the skin haemorrhage induced by snake venom metalloproteinases. *Thromb Haemost* 2010;104(3):485-97.
  36. Moura-da-Silva AM, Laing GD, Paine MJ, Dennison JM, Politi V, Crampton JM *et al.* Processing of pro-tumor necrosis factor- $\alpha$  by venom metalloproteinases: a hypothesis explaining local tissue damage following snake bite. *Eur J Immunol* 1996;26(9):2000-5.
  37. Tanjoni I, Weinlich R, Della-Casa MS, Clissa PB, Saldanha-Gama RF, de Freitas MS *et al.* Jararhagin, a snake venom metalloproteinase, induces a specialized form of apoptosis (anoikis) selective to endothelial cells. *Apoptosis* 2005;10(4):851-61.
  38. Fernandes CM, Zamuner SR, Zuliani JP, Rucavado A, Gutiérrez JM, Teixeira CFP. Inflammatory effects of BaP1 a metalloproteinase isolated from *Bothrops asper* snake venom: leucocyte recruitment and release of cytokines. *Toxicon* 2006;47(5):549-59.
  39. Kamiguti AS, Hay CR, Theakston RGD, Zuzel M. Insights into the mechanism of haemorrhage caused by snake venom metalloproteinases. *Toxicon* 1996;34(6):627-42.
  40. Kamiguti AS, Cardoso JL, Theakston RD, Sano-Martins IS, Hutton RA, Rugman FP *et al.* Coagulopathy and haemorrhage in human victims of *Bothrops jararaca* envenoming in Brazil. *Toxicon* 1991;29(8):961-72.
  41. Kamiguti AS, Rugman FP, Theakston RD, Franca FO, Ishii H, Hay CR. The role of venom haemorrhagin in spontaneous bleeding in *Bothrops jararaca*

- envenoming. Butantan Institute Antivenom Study Group. *Thromb Haemost* 1992;67(4):484-8.
42. Mandelbaum FR, Reichel AP, Assakura MT. Isolation and characterization of a proteolytic enzyme from the venom of the snake *Bothrops jararaca* (jararaca). *Toxicon* 1982;20(6):955-72.
  43. Paine MJ, Desmond HP, Theakston RD, Crampton JM. Purification, cloning and molecular characterization of a high molecular weight hemorrhagic metalloprotease, jararhagin, from *Bothrops jararaca* venom. Insights into the disintegrin gene family. *J Biol Chem* 1992;267(32):22869-76.
  44. Maruyama M, Sugiki M, Yoshida E, Mihara H, Nakajima N. Purification and characterization of two fibrinolytic enzymes from *Bothrops jararaca* (jararaca) venom. *Toxicon* 1992;30(8):853-64.
  45. Maruyama M, Sugiki M, Yoshida E, Shimaya K, Mihara H. Broad substrate specificity of snake venom fibrinolytic enzymes: possible role in haemorrhage. *Toxicon* 1992;30(11):1387-97.
  46. Moura-da-Silva AM, Baldo C. Jararhagin, a hemorrhagic snake venom metalloproteinase from *Bothrops jararaca*. *Toxicon* 2012;60(3):280-9.
  47. Laing GD, Moura-da-Silva AM. Jararhagin and its multiple effects on hemostasis. *Toxicon* 2005;45(8):987-96.
  48. Maruyama M, Tanigawa M, Sugiki M, Yoshida E, Mihara H. Purification and characterization of low molecular weight fibrinolytic/hemorrhagic enzymes from snake (*Bothrops jararaca*) venom. *Enzyme Protein* 1993;47(3):124-35.
  49. Berger M, Pinto AFM, Guimarães JA. Purification and functional characterization of bothrojaractivase, a prothrombin-activating metalloproteinase isolated from *Bothrops jararaca* snake venom. *Toxicon* 2008;51(4):488-501.
  50. Oliveira AK, Paes Leme AF, Assakura MT, Menezes MC, Zelanis A, Tashima AK *et al.* Simplified procedures for the isolation of HF3, bothropasin, disintegrin-like/cysteine-rich protein and a novel P-I metalloproteinase from *Bothrops jararaca* venom. *Toxicon* 2009;53(7-8):797-801.
  51. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970;227(5259):680-5.
  52. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951;193(1):265-75.
  53. Hanna SL, Sherman NE, Kinter MT, Goldberg JB. Comparison of proteins expressed by *Pseudomonas aeruginosa* strains representing initial and chronic isolates from a cystic fibrosis patient: an analysis by 2-D gel electrophoresis and capillary column liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Microbiology* 2000;146(10):2495-508.
  54. Kunitz M. Crystalline soybean trypsin inhibitor. *J Gen Physiol* 1946;29(3):149-54.
  55. Naughton MA, Sanger F. Purification and specificity of pancreatic elastase.

Biochem J 1961;78:156-63.

56. Berlov MN, Lodygin PA, Andreeva YV, Kokryakov VN. Isolation and some physical and chemical properties of elastase and cathepsin G from dog neutrophils. *Biochemistry* 2001;66(9):1008-13.
57. Schwert GW, Takenaka Y. A spectrophotometric determination of trypsin and chymotrypsin. *Biochim Biophys Acta* 1955;16(4):570-5.
58. Theakston RD, Reid HA. Development of simple standard assay procedures for the characterization of snake venom. *Bull World Health Org* 1983;61(6):949-56.
59. Brain SD, Williams TJ. Inflammatory oedema induced by synergism between calcitonin gene-related peptide (CGRP) and mediators of increased vascular permeability. *Br J Pharmacol* 1985;86(4):855-60.
60. Modesto JC, Junqueira-de-Azevedo IL, Neves-Ferreira AG, Fritzen M, Oliva ML, Ho PL *et al.* Insularinase A, a prothrombin activator from *Bothrops insularis* venom, is a metalloprotease derived from a gene encoding protease and disintegrin domains. *Biol Chem* 2005;386(6):589-600.
61. Maruyama M, Sugiki M, Anai K, Yoshida E. N-terminal amino acid sequences and some characteristics of fibrinolytic/hemorrhagic metalloproteinases purified from *Bothrops jararaca* venom. *Toxicon* 2002;40(8):1223-6.
62. Watanabe L, Shannon JD, Valente RH, Rucavado A, Alape-Girón A, Kamiguti AS *et al.* Amino acid sequence and crystal structure of BaP1, a metalloproteinase from *Bothrops asper* snake venom that exerts multiple tissue-damaging activities. *Protein Sci* 2003;12(10):2273-81.
63. Zelanis A, Tashima AK, Rocha MM, Furtado MF, Camargo AC, Ho PL *et al.* Analysis of the ontogenetic variation in the venom proteome/peptidome of *Bothrops jararaca* reveals different strategies to deal with prey. *J Proteome Res* 2010;9(5):2278-91.
64. Zelanis A, Tashima AK, Pinto AF, Leme AF, Stuginski DR, Furtado MF *et al.* *Bothrops jararaca* venom proteome rearrangement upon neonate to adult transition. *Proteomics* 2011;11(21):4218-28.
65. Fernandez JH, Silva CA, Assakura MT, Camargo AC, Serrano SM. Molecular cloning, functional expression, and molecular modeling of bothrostatin, a new highly active disintegrin from *Bothrops jararaca* venom. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;329(2):457-64.
66. Markland FS. Snake venoms and the hemostatic system. *Toxicon* 1998;36(12):1749-800.
67. Gomes MS, Mendes MM, de Oliveira F, de Andrade RM, Bernardes CP, Hamaguchi A, *et al.* BthMP: a new weakly hemorrhagic metalloproteinase from *Bothrops moojeni* snake venom. *Toxicon* 2009;53(1):24-32.
68. Rodrigues VM, Soares AM, Andrião-Escarso SH, Franceschi AM, Rucavado A, Gutiérrez JM, *et al.* Pathological alterations induced by neuwiedase, a metalloproteinase isolated from *Bothrops neuwiedi* snake venom. *Biochimie*

2001;83(6):471-9.

69. Sanchez EF, Schneider FS, Yarleque A, Borges MH, Richardson M, Figueiredo SG *et al.* The novel metalloproteinase atroxlysin-I from Peruvian *Bothrops atrox* (Jergón) snake venom acts both on blood vessel ECM and platelets. *Arch Biochem Biophys* 2010;496(1):9-20.
70. Rucavado A, Escalante T, Teixeira CF, Fernández CM, Diaz C, Gutiérrez JM. Increments in cytokines and matrix metalloproteinases in skeletal muscle after injection of tissue-damaging toxins from the venom of the snake *Bothrops asper*. *Mediators Inflamm* 2002;11(2):121-8.
71. Escalante T, Rucavado A, Kamiguti AS, Theakston RD, Gutiérrez JM. *Bothrops asper* metalloproteinase BaP1 is inhibited by  $\alpha_2$ -macroglobulin and mouse serum and does not induce systemic hemorrhage or coagulopathy. *Toxicon* 2004;43(2):213-7.
72. Borkow G, Gutiérrez JM, Ovadia M. Isolation and characterization of synergistic hemorrhagins from the venom of the snake *Bothrops asper*. *Toxicon* 1993;31(9):1137-50.
73. Patiño AC, Pereañez JA, Núñez V, Benjumea DM, Fernandez M, Rucavado A, *et al.* Isolation and biological characterization of Batx-I, a weak hemorrhagic and fibrinogenolytic PI metalloproteinase from Colombian *Bothrops atrox* venom. *Toxicon* 2010;56(6):936-43.
74. Marcussi S, Bernardes CP, Santos-Filho NA, Mazzi MV, Oliveira CZ, Izidoro LF *et al.* Molecular and functional characterization of a new non-hemorrhagic metalloprotease from *Bothrops jararacussu* snake venom with antiplatelet activity. *Peptides* 2007;28(12):2328-39.
75. Gremski LH, Chaim OM, Paludo KS, Sade YB, Otuki MF, Richardson M, *et al.* Cytotoxic, thrombolytic and edematogenic activities of leucurolysin-a, a metalloproteinase from *Bothrops leucurus* snake venom. *Toxicon* 2007;50(1):120-34.
76. Ferreira RN, Rates B, Richardson M, Guimarães BG, Sanchez EO, Pimenta AM, *et al.* Complete amino-acid sequence, crystallization and preliminary X-ray diffraction studies of leucurolysin-a, a nonhaemorrhagic metalloproteinase from *Bothrops leucurus* snake venom. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun* 2009;65(8):798-801.
77. Torres-Huaco FD, Ponce-Soto LA, Martins-de-Souza D, Marangoni S. Purification and characterization of a new weak hemorrhagic metalloproteinase BmHF-1 from *Bothrops marajoensis* snake venom. *Protein J* 2010;29(6):407-16.
78. Gomes MS, Mendes MM, de Oliveira F, de Andrade RM, Bernardes CP, Hamaguchi A, *et al.* BthMP: a new weakly hemorrhagic metalloproteinase from *Bothrops moojeni* snake venom. *Toxicon* 2009;53(1):24-32.
79. Bernardes CP, Santos-Filho NA, Costa TR, Gomes MS, Torres FS, Costa J, *et al.* Isolation and structural characterization of a new fibrin(ogen)olytic metalloproteinase from *Bothrops moojeni* snake venom. *Toxicon* 2008;51(4):574-

84.

80. Reichl AP, Mandelbaum FR. Proteolytic specificity of moojeni protease A isolated from the venom of *Bothrops moojeni*. *Toxicon* 1993;31(2):187-94.
81. Assakura MT, Reichl AP, Asperti MC, Mandelbaum FR. Isolation of the major proteolytic enzyme from the venom of the snake *Bothrops moojeni* (caissaca). *Toxicon* 1985;23(4):691-706.
82. Baldo C, Tanjoni I, León IR, Batista IF, Della-Casa MS, Clissa PB. BnP1, a novel P-I metalloproteinase from *Bothrops neuwiedi* venom: biological effects benchmarking relatively to jararhagin, a P-III SVMP. *Toxicon* 2008;51(1):54-65.
83. Lopes DS, Baldo C, Oliveira C de F, de Alcântara TM, Oliveira JD, Goulart LR, *et al.* Characterization of inflammatory reaction induced by neuwiedase, a P-I metalloproteinase isolated from *Bothrops neuwiedi* venom. *Toxicon* 2009;54(1):42-9.
84. Rodrigues VM, Soares AM, Andrião-Escarso SH, Franceschi AM, Rucavado A, Gutiérrez JM, *et al.* Pathological alterations induced by neuwiedase, a metalloproteinase isolated from *Bothrops neuwiedi* snake venom. *Biochimie* 2001;83(6):471-9.
85. Tashima AK, Zelanis A, Kitano ES, Ianzer D, Melo RL, Rioli V *et al.* Peptidomics of three *Bothrops* snake venoms: insights into the molecular diversification of proteomes and peptidomes. *Mol Cell Proteomics* 2012;11(11):1245-62.
86. Gutiérrez JM, Theakston RDG, Warrell DA. Confronting the neglected problem of snake bite envenoming: the need for a global partnership. *PLoS Med Negl* 2006;3(6):727-31.
87. Takeda S, Takeya H, Iwanaga S. Snake venom metalloproteinases: structure, function and relevance to the mammalian ADAM/ADAMTS family proteins. *Biochim Biophys Acta* 2012;1824(1):164-76.
88. Mecham RP, Levy BD, Morris SL, Madaras JG, Wrenn DS. Increased cyclic GMP levels lead to a stimulation of elastin production in ligament fibroblasts that is reversed by cyclic AMP. *J Biol Chem* 1985;260(6):3255-8.
89. Fox JW, Serrano SM. Timeline of key events in snake venom metalloproteinase research. *J Proteomics* 2009;72(2):200-9.
90. Koh DC, Armugam A, Jeyaseelan K. Snake venom components and their applications in biomedicine. *Cell Mol Life Sci* 2006;63(24):3030-41.
91. Gutiérrez JM, Lomonte B. Local tissue damage induced by *Bothrops* snake venom. *Mem Inst Butantan* 1989;51(4):211-23.
92. Lomonte B, Tarkowski A, Hanson LA. Host response to *Bothrops asper* snake venom. Analysis of edema formation, inflammatory cells, and cytokine release in a mouse model. *Inflammation* 1993;17(2):93-105.
93. Gutiérrez JM, Núñez J, Escalante T, Rucavado A. Blood flow is required for rapid endothelial cell damage induced by a snake venom hemorrhagic metalloproteinase.

Microvasc Res 2006;71(1):55-63.

94. Zychar BC, Dale CS, Demarchi DS, Gonçalves LR. Contribution of metalloproteases, serine proteases and phospholipases A<sub>2</sub> to the inflammatory reaction induced by *Bothrops jararaca* crude venom in mice. *Toxicon* 2010;55(2-3):227-34.
95. Laing GD, Clissa PB, Theakston RD, Moura-da-Silva AM, Taylor MJ. Inflammatory pathogenesis of snake venom metalloproteinase-induced skin necrosis. *Eur J Immunol* 2003;33(12):3458-63.
96. Baldo C, Jamora C, Yamanouye N, Zorn TM, Moura-da-Silva AM. Mechanisms of vascular damage by hemorrhagic snake venom metalloproteinases: tissue distribution and *in situ* hydrolysis. *PLoS Negl Trop Dis* 2010;4(6):e727.
97. Gutiérrez JM, Romero M, Núñez J, Chaves F, Borkow G, Ovadia M. Skeletal muscle necrosis and regeneration after injection of BaH1, a hemorrhagic metalloproteinase isolated from the venom of the snake *Bothrops asper* (Terciopelo). *Exp Mol Pathol* 1995;62(1):28-41.
98. Rucavado A, Borkow G, Ovadia M, Gutiérrez JM. Immunological studies on BaH1 and BaP1, two hemorrhagic metalloproteinases from the venom of the snake *Bothrops asper*. *Toxicon* 1995;33(8):1103-6.

***ANEXOS***



