

FRANK DENIS TORRES HUACO

**“Caracterização dos efeitos locais e sistêmicos da metaloprotease
BtaHF purificada a partir do veneno total de *Bothriopsis taeniata*.”**

**Campinas – SP
2013**



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA

Frank Denis Torres Huaco

“Caracterização dos efeitos locais e sistêmicos da metaloprotease

BtaHF purificada a partir do veneno total de *Bothriopsis taeniata*”

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
Frank Denis Torres Huaco
e aprovada pela Comissão Julgadora.

Sergio Marangoni

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

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

CAMPINAS,
2013

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

H86c Huaco, Frank Denis Torres, 1979-
Caracterização dos efeitos locais e sistêmicos da metaloprotease BtaHF purificada a partir do veneno total de *Bothriopsis taeniata* / Frank Denis Torres Huaco. – Campinas, SP: [s.n.], 2013.

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

1. *Bothriopsis taeniata*. 2. Metaloproteases. 3. Purificação. 4. Hemorragia. 5. Edema. 6. Histologia.
I. Marangoni, Sergio, 1951-. II. Ponce-Soto, Luis Alberto. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em Inglês: Characterization of local and systemic effects of the metaloproteinase BtaHF purified from *Bothriopsis taeniata* crude venom

Palavras-chave em Inglês:

Bothriopsis taeniata

Metalloproteases

Purification

Hemorrhage

Edema

Histology

Área de concentração: Bioquímica

Titulação: Doutor em Biologia Funcional e Molecular

Banca examinadora:

Sergio Marangoni [Orientador]

Cristina Pontes Vicente

Daniela Carla da Silva Damico

Celene Fernandes Bernardes

Priscilla Randazzo de Moura

Data da defesa: 25-03-2013

Programa de Pós Graduação: Biologia Funcional e Molecular

Campinas, 25 de Março de 2013

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Sergio Marangoni (Orientador)


Assinatura

Profa. Dra. Cristina Pontes Vicente


Assinatura

Dra. Daniela Carla da Silva Damico


Assinatura

Profa. Dra. Vera Lúcia Bonfim Tiburcio

Assinatura

Profa. Dra. Priscila Randazo de Moura


Assinatura

Profa. Dra. Daniele Ribeiro de Araujo

Assinatura

Dra. Luciana Maria de Hollanda

Assinatura

Profa. Dra. Celene Bernardes Fernandes


Assinatura

Dedico este trabalho:

Aos meus pais, Alfredo e Liliana, que me ensinaram a vencer qualquer obstáculo, iluminando sempre os meus caminhos. Sem seu amor eu não teria chegado tão longe.

A minha irma Angee por ser simplesmente a mais alta expressão de amizade incondicional em todo momento e companheira da minha vida toda e a pessoa que me escuta e compreende.

A Renato Alfredo, o motivo pelo qual luto pela minha superação pessoal e profissional.

Aos novos membros da família José Luis e a pequena Danica Luciana.

Para ti que con tu amor me mostraste un mundo nuevo y maraviloso, me enseñaste a ser mejor persona. Tu amor me dio e me dá las fuerzas para superar mis momentos de flaqueza. Mi corazón es y será tuyo, siempre.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Sergio Marangoni pela oportunidade de desenvolver a pesquisa. Obrigado pela paciência e por permitir o acesso ao seu laboratório.

A todos os professores do Instituto de Biologia por seus conselhos e amizade durante minha permanência.

À Dr^a Daniela Damico, pelo apoio, amizade, companherismo e os conselhos durante o desenvolvimento de meu doutorado. Muito obrigado Dani!!

A Prof^a Dr^a Laura Leiva do Departamento de Bioquímica, Faculdade de Ciências Exatas e Naturais e Agrimensura, UNNE-Argentina, pela colaboração, atenção e dedicação ao me receber em seu laboratório durante o desenvolvimento de meu estágio. Ao meu amigo Juan Pablo, Carolina, Silvina, Luciano e Soledad, à vocês meu agradecimento.

À Prof^a Dr^a Ofelia Acosta e Pamela Teibler e sua equipe: Silvana e Maria Emilia da Faculdade de Ciências Veterinárias, UNNE-Argentina, pela colaboração e acréscimo de sugestões ao meu trabalho.

Aos amigos do laboratório: meus camaradas Victor e Caio, Magaly, Desiree, Miriam, Petrus, Augusto, Salomon, Rafael, Leticia e Lays pela ajuda e companheirismo, sem contar também com os momentos de descontração e alegria proporcionados por eles. Muito obrigado!

Ao Paulo Baldasso (técnico do Laboratório) pelo apoio técnico e amizade e aos que saíram do Laboratorio (LAQUIP).

À Prof^a Dr^a Cristina Pontes Vicente, à Prof^a Dr^a Cintia Maria Saia Cereda e à Prof^a Dr^a Luciana Maria de Hollanda, pela participação no exame de qualificação, onde puderam apresentar valiosas sugestões para revisão deste trabalho.

Aos membros da banca examinadora, pelas sugestões e correções feitas na tese.

À UNICAMP, pela oportunidade de crescimento científico e profissional nesta conceituada instituição.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo auxílio financeiro, proporcionando a realização do meu trabalho.

Ao Laboratório Nacional de luz Sincrotron (LNLS), que disponibilizou uso de equipamento multiusuário para a realização deste trabalho.

Aos colegas de curso, pela amizade, companheirismo e disposição para dividir comigo, o conhecimento necessário para iniciar e concluir os estudos.

A todos os demais que contribuíram direta ou indiretamente para o bom andamento deste trabalho e que certamente foram indispensáveis.

“Pela persistência e fé respaldadas na sinceridade dos que creem na perfectibilidade humana, não tardará que o impossível mude-se no difícil e este no possível, a depender tão só do que tenhamos no íntimo. Não importam e nem se contam os tropeços da caminhada, o importante é caminhar na perseguição consciente da meta a atingir-se, mesmo que custosa e, por vezes aparentemente inalcançável”.
Walter Miguel

“A característica de um homem imaturo é que ele quer morrer nobremente por uma causa, enquanto a característica de um homem maturo é que ele quer viver humildemente por uma”.
J.D. Salinger

Índice

| | Página |
|--|--------|
| Índice de Figuras | x |
| Lista de Abreviações | xi |
| RESUMO | xii |
| ABSTRACT | xiv |
| I. INTRODUÇÃO | 1 |
| 1.1. Aspectos Gerais dos venenos de Serpentes | 1 |
| 1.1.1. Oxidoreductases | 2 |
| 1.1.2. Hidrolases | 2 |
| 1.1.3. Fosfolipases A ₂ | 3 |
| 1.1.4. Glicosidasas | 3 |
| 1.2. Proteases | 3 |
| 1.2.1. Serinoproteases (SVSP) | 3 |
| 1.3. Metaloproteases de Venenos de Serpente (SVMP's) | 4 |
| 1.3.1. Estrutura das metaloproteases de veneno de serpente | 4 |
| 1.3.1.1. Pré-Sequência | 5 |
| 1.3.1.2. Pró-Sequência | 5 |
| 1.3.1.3. Domínio Metaloprotease | 5 |
| 1.3.1.4. Peptídeo ou Segmento Espaçador | 6 |
| 1.3.1.5. Domínio Desintegrina e Desintegrina-símile | 7 |
| 1.3.1.6. Domínio Rico em cisteína | 8 |
| 1.3.1.7. Subunidade similar à Lectina tipo C | 8 |
| 1.3.2. Classificação das metaloproteases de veneno de serpente | 9 |
| 1.3.2.1. Classe P-I | 9 |
| 1.3.2.2. Classe P-II | 9 |
| 1.3.2.3. Classe P-III | 11 |
| 1.3.3. Aspectos funcionais das metaloproteases de veneno de serpente | 11 |
| 1.3.3.1. Mecanismo da atividade enzimática e ativação | 11 |
| 1.3.4. Efeitos biológicos das metaloproteases de veneno de serpente | 13 |
| 1.3.4.1. Efeito hemorrágico | 14 |
| 1.3.4.2. Efeitos na hemostasia sanguínea | 15 |
| 1.3.4.3. Efeitos pro-inflamatórios | 16 |
| 1.3.4.4. Efeitos miotóxicos e mionecróticos | 17 |
| 1.4. <i>Bothriopsis taeniata</i> | 18 |
| 1.5. Justificativa | 19 |
| II. OBJETIVOS | 21 |
| III. MATERIAIS E MÉTODOS | 22 |
| 3.1. Venenos e animais de experimentação | 22 |
| 3.2. Reativos | 22 |
| 3.3. Purificação da metaloprotease BtaHF a partir do veneno total de <i>Bothriopsis taeniata</i> | 22 |
| 3.3.1. Cromatografia convencional de exclusão molecular. | 22 |

| | | |
|---------|---|----|
| 3.3.2. | Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) de troca iônica | 23 |
| 3.3.3. | Cromatografia de alta eficiência de Fase Reversa | 23 |
| 3.4. | Eletroforese em SDS-PAGE | 23 |
| 3.5. | Determinação da concentração de proteína | 24 |
| 3.6 | Atividade caseinolítica | 24 |
| 3.7 | Cinética Enzimática | 25 |
| 3.7.1. | Efeito da temperatura na atividade caseinolítica | 25 |
| 3.7.2. | Efeito do pH na atividade caseinolítica | 25 |
| 3.7.3. | Efeito de inibidores | 25 |
| 3.7.4 | Efeito de Íons | 26 |
| 3.8. | Atividade fibrinogênolítica | 26 |
| 3.9. | Atividade fibrinolítica | 26 |
| 3.10. | Atividade arginina amidase | 27 |
| 3.11. | Análises Estruturais | 27 |
| 3.11.1 | Determinação da massa molecular da BtHF por Espectrometria de Massas (ESI-Q-TOF) | 27 |
| 3.11.2 | Análise de composição de aminoácidos | 28 |
| 3.11.3 | Determinação de peptídeos internos | 28 |
| 3.11.4. | Estudo de homologia sequencial | 29 |
| 3.12. | Caracterização biológica | 29 |
| 3.12.1 | Atividade hemorrágica (Método de pele) | 28 |
| 3.12.2. | Formação de Edema | 29 |
| 3.12.3. | Determinação dos níveis de CK plasmáticos em camundongos inoculados por via intramuscular (miotoxicidade local) | 30 |
| 3.12.4. | Análise histológica dos efeitos locais e sistêmicos da metaloprotease BtaHF | 31 |
| 3.12.5. | Efeito da BtaHF sobre o fibrinogênio plasmático | 32 |
| 3.12.6. | Efeito da BtaHF “ <i>ex vivo</i> ” sobre os índices de coagulação Tempo de Protrombina (PT) e de Tromboplastina Parcial Ativada | 32 |
| 3.12.7. | Diferenciação das células da linhagem C2C12 | 33 |
| 3.12.8. | Efeitos citotóxicos da metaloprotease BtaHF sobre mioblastos da linhagem celular C2C12 | 34 |
| 3.12.9. | Efeitos da metaloprotease BtaHF sobre a adesão celular de mioblastos. | 34 |
| 3.13. | Análise Estatística | 35 |
| IV. | RESULTADOS | 36 |
| 4.1 | Purificação da metaloprotease BtaHF isolada a partir do veneno total de <i>Bothriopsis taeniata</i> | 36 |
| 4.1.1. | Cromatografia convencional de exclusão molecular | 36 |
| 4.1.2. | Purificação da fração Bta II Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) de troca iônica | 37 |
| 4.1.3. | Atividade caseinolítica e inibição da fração Bta II (Sephadex G-75) e frações obtidas por troca iônica (DEAE 8HR AP-Minicolumn) | 38 |
| 4.2 | Controle do grau de pureza da fração BtaHF num sistema CLAE de Fase Reversa para a determinação do grau de pureza | 39 |
| 4.3 | Tabela de purificação da BtaHF | 40 |

| | | |
|----------|--|-----|
| 4.4 | Massa molecular da metaloprotease BtaHF | 41 |
| 4.5 | Atividade caseinolítica da metaloprotease BtaHF | 42 |
| 4.6 | Efeito da temperatura na atividade caseinolítica de BtaHF | 43 |
| 4.7 | Efeito do pH na atividade caseinolítica da BtaHF | 44 |
| 4.8 | Efeito de inibidores sobre a atividade proteolítica de BtaHF | 45 |
| 4.9 | Efeito de íons sobre a atividade caseinolítica de BtaHF | 46 |
| 4.10 | Efeito da concentração de BtaHF sobre a degradação de fibrinogênio | 47 |
| 4.11 | Efeito do tempo sobre a degradação de fibrinogênio | 48 |
| 4.12 | Atividade proteolítica sobre a fibrina da BtaHF | 49 |
| 4.13 | Atividade arginina amidase sobre o substrato BapNA | 50 |
| 4.14 | Análise de Composição de Aminoácidos | 51 |
| 4.15 | Espectro dos péptidos trípticos da metaloprotease BtaHF | 52 |
| 4.16. | Estudos de homologia sequencial dos peptídeos trípticos da metaloprotease BtaHF | 54 |
| 4.17. | Caracterização Biológica | 55 |
| 4.17.1 | Dose hemorrágica mínima do veneno total de <i>Bothriopsis taeniata</i> e a metaloprotease BtaHF | 55 |
| 4.17.2. | Inibição da atividade hemorrágica da metaloprotease BtaHF | 56 |
| 4.17.3. | Atividade Edematogênica da Fração BtaHF | 57 |
| 4.17.4. | Inibição da atividade edematogênica da metaloprotease BtaHF | 58 |
| 4.17.5. | Efeito miotóxico da metaloprotease BtaHF | 59 |
| 4.17.6. | Avaliação do efeito citotóxico da metaloprotease BtaII-4 sobre mioblastos e miotubos C2C12 | 60 |
| 4.17.7. | Quantificação da LDH das culturas celulares | 61 |
| 4.17.8. | Avaliação do efeito da metaloprotease BtaII-4 sobre a adesão de mioblastos C2C12 | 62 |
| 4.17.9. | Estudos histopatológicos dos efeitos da metaloprotease BtaHF sobre musculo gastrocnêmio de camundongo | 63 |
| 4.17.10. | Estudos histopatológicos dos efeitos da metaloprotease BtaHF em pulmão de camundongo | 65 |
| 4.17.11. | Estudos histopatológicos dos efeitos da metaloprotease BtaHF em rim de camundongo | 67 |
| 4.17.12. | Estudos histopatológicos dos efeitos da metaloprotease BtaHF em fígado de camundongo | 69 |
| 4.17.13. | Efeito da metaloprotease BtaHF sobre os níveis do fibrinogênio plasmático de camundongo | 70 |
| 4.17.14. | Efeitos “ <i>in vitro</i> ” da metaloprotease BtaHF sobre Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada (APTT) e Tempo de Protrombina (PT) | 71 |
| V. | DISCUSSÃO | 72 |
| VI. | CONCLUSÕES | 88 |
| VII. | REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS | 89 |
| VIII. | ANEXO | 104 |

Índice de Figuras

| | Página |
|---|---------------|
| Figura 1 Domínios presentes nas metaloproteases de veneno de serpente. | 9 |
| Figura 2 Classes e subclasses das metaloproteases de veneno de serpente. | 10 |
| Figura 3 Especificidade de substrato de e mecanismo catalítico das metaloproteases de veneno de serpente. | 12 |
| Figura 4 Resumo dos vários efeitos exercidos pelas metaloproteases de veneno de serpente. | 13 |
| Figura 5 Modelo proposto para a produção da hemorragia. | 15 |
| Figura 6 Esquema geral dos efeitos das metaloproteases de veneno de serpente sobre a hemóstase. | 16 |
| Figura 7 Cromatografia convencional de exclusão molecular numa coluna Sephadex G-75. | 36 |
| Figura 8 Perfil cromatográfico fração Bta II em um sistema de HPLC de troca iônica numa coluna DEAE 8HR AP-Minicolumn. | 37 |
| Figura 9 Monitoramento da atividade proteolítica, inibição e atividade hemorrágica de frações. | 38 |
| Figura 10 Avaliação da pureza e determinação da massa molecular relativa da metaloprotease BtaHF. | 39 |
| Figura 11 Determinação da massa molecular da metaloprotease BtaHF nativa por espectrometria de massa ESIQ-TOF MS. | 41 |
| Figura 12 Atividade caseinolítica de VT, fração Sephadex e BtaHF. | 42 |
| Figura 13 Efeito da temperatura na atividade caseinolítica da metaloprotease BtaHF. | 43 |
| Figura 14 Efeito do pH na atividade caseinolítica da metaloprotease BtaHF. | 44 |
| Figura 15 Efeito de inibidores sintéticos na atividade caseinolítica de BtaHF. | 45 |
| Figura 16 Efeito de íons divalentes na atividade caseinolítica de BtaHF. | 46 |
| Figura 17 Atividade fibrinogênolítica com diferentes concentrações da metaloprotease BtaHF. | 47 |
| Figura 18 Atividade fibrinogênolítica com diferentes tempos de incubação. | 48 |
| Figura 19 Atividade fibrinolítica da metaloprotease BtaHF. | 49 |
| Figura 20 Atividade proteolítica sobre o substrato sintético BapNA. | 50 |
| Figura 21 Espectro ESI-QTOF-MS/MS dos peptídeos trípticos. | 52 |
| Figura 22 Alinhamento dos segmentos trípticos da metaloprotease BtaHF com SVMP da classe P-I. | 54 |
| Figura 23 Determinação da Dose Hemorrágica Mínima (DHM). | 55 |
| Figura 24 Inibição da atividade hemorrágica da metaloprotease BtaHF. | 56 |
| Figura 25 Atividade edematogênica da metaloprotease BtaHF. | 57 |
| Figura 26 Inibição da atividade edematogênica da metaloprotease BtaHF. | 58 |
| Figura 27 Efeito miotóxico da metaloprotease BtaHF e veneno total de <i>B. taeniata</i> . | 59 |
| Figura 28 Atividade citotóxica de BtaHF sobre mioblastos C2C12. | 60 |
| Figura 29 Determinação dos níveis de LDH. | 61 |
| Figura 30 Efeitos sobre a Adesão celular de miotubulos C2C12. | 62 |
| Figura 31 Microfotografias de microscopia de luz de músculo de gastrocnêmio de camundongo da metaloprotease BtaHF. | 64 |
| Figura 32 Microfotografias de microscopia de luz de pulmão de camundongo. | 66 |
| Figura 33 Microfotografias de microscopia de luz de rim de camundongo. | 68 |
| Figura 34 Microfotografias de microscopia de luz de fígado de camundongo. | 69 |
| Figura 35 Níveis do fibrinogênio plasmático de camundongo após injeção i.v. da metaloprotease BtaHF. | 70 |
| Figura 36 Efeito "ex vivo" da metaloprotease BtaHF nos valores de APPT e PT. | 71 |
| Figura 37 Atividade proteolítica e especificidade de quebra das SVMP sobre o nidógeno. | 81 |

Lista de Abreviações

Lista de Abreviações – Cromatografias

| | |
|---------------|--|
| Sephadex G-75 | Coluna de exclusão molecular com matriz composta de dextrano |
| DEAE | Dietilaminoetil |
| CLAE-FR | Cromatografia Líquida de Alta Eficiência de Fase Reversa |

Lista de Abreviações - Reagentes, Sais e Tampões

| | |
|---------|--|
| AMBIC | Bicarbonato de Amônio |
| BapNA | N α -Benzoil-D,L-arginina 4-nitroanilida hydrochloride |
| BtaHF | <i>Bothriopsis taeniata</i> Hemorrhagic Factor |
| BaIII-4 | Serino proteinase purificada a partir do veneno de <i>Bothrops atrox</i> |
| DMSO | Dimetilsulfóxido |
| DTT | Ditiotreitol |
| EDTA | Ácido etilenodiamino tetracético |
| EGTA | Ácido etilenoglicol-bis(2-aminoetileter)-N,N,N',N'-tetracético |
| PBS | Tampão fosfato em salina |
| PITC | Fenilisotiocianato |
| PMSF | Fenilmetilsulfonidefluoreto |
| PTH | Feniltiohidantoína |
| SBTI | Inibidor de tripsina de soja |
| SDS | Dodecil Sulfato de Sódio, Lauril Sulfato de Sódio |
| SFB | Soro Fetal Bovino |
| TCA | Ácido Tricloroacético |
| TFA | Ácido trifluoroacético |
| Tris | Tris[Hidroximetil]aminometano |

Lista de Abreviações – Símbolos e siglas

| | |
|-----------|---|
| 280nm | Absorbância no comprimento de onda de 280nm |
| pmol | Picomol (10^{-12} moles) |
| μ g | Micrograma (10^{-6} gramas) |
| μ L | Microlitro (10^{-6} litros) |
| cm | Centímetro |
| Da | Dalton – unidade de massa – aproximadamente a massa molecular de um átomo de hidrogênio. |
| EC | Enzyme Comision/ Comité de Enzimas |
| g | Gravidade |
| mM | Milimolar (10^{-3} Molar) |
| ESI-Q-TOF | |
| PAGE | Eletroforese em Gel de poliacrilamida. |
| Pico-Tag | Sistema Geral de análise de aminoácidos composto por uma estação de trabalho para hidrólise e derivatização de aminoácidos e por um sistema cromatográfico HPLC de separação, detecção e análise dos aminoácidos derivatizados. |

Resumo

Neste trabalho descrevemos a purificação, caracterização estrutural e os efeitos locais e sistêmicos de uma nova metaloprotease de baixa massa molecular, denominada BtaHF (*Bothriopsis taeniata* Hemorrhagic Factor). A proteína foi purificada a partir do veneno total da serpente *Bothriopsis taeniata* usando cromatografia exclusão molecular convencional (Sephadex G-75), seguida de uma cromatografia de alta eficiência de troca iônica (coluna DEAE 8HR AP-Minicolumn). A nova metaloprotease BtaHF apresenta um alto grau de pureza e homogeneidade molecular e possui uma massa molecular de 25968,16 Da.

A BtaHF apresentou atividade caseinolítica com uma temperatura e pH ótimos de 37-40 °C e 8, respectivamente. A atividade caseinolítica da BtaHF foi inibida por EGTA, EDTA e DTT, mas os inibidores PMSF e SBTI não apresentaram efeito. O íon Ca^{+2} é importante para a estabilidade da metaloprotease BaHF, aumentando atividade caseinolítica da enzima, entretanto, os íons Zn^{+2} e Mn^{+2} inibem a atividade enzimática desta enzima.

A BtaHF é uma enzima α -fibrinogênolítica por degradar rapidamente a cadeia A α do fibrinogênio após 15 minutos de incubação, enquanto a cadeia B β é completamente degradada após 6 horas. Por outro lado, a BtaHF não possui atividade fibrinolítica ou arginine amidase.

A análise de composição de aminoácidos mostrou que a BtaHF possui caráter ácido e apresenta 6 resíduos de cisteína. No estudo de homologia a BtaHF apresentou maior identidade sequencial com metaloproteases com atividade hemorrágica da classe P-I como a BaP1 (*Bothrops asper*).

A metaloprotease BtaHF possui atividade hemorrágica fraca com uma dose hemorrágica mínima de 20,14 $\mu\text{g}/\text{animal}$. Esta metaloprotease mostrou atividade edematogênica que mostrou ser dose-dependente e teve um efeito permanente após 6 horas de injeção. Ambos efeitos estão relacionados à atividade proteolítica e ao correto enovelamento da BtaHF, uma vez que foram inibidas por agentes quelantes (EDTA e EGTA) e redutor (DTT). A metaloprotease BtaHF não possui atividade miotóxica, embora tenha atividade citotóxica em fibroblastos C2C12.

A análise histológica do músculo gastrocnêmio de camundongo confirmou a atividade hemorrágica e edematogênica da metaloprotease, assim como, a ausência de atividade miotóxica.

A metaloprotease BtaHF produz efeitos sistêmicos específicos quando injetado via endovenosa em camundongos. A nível do tecido pulmonar, a toxina produz alteração da estrutura alveolar com hemorragia significativa, engrossamento dos septos alveolares e inflamação. A

BtaHF não produz hemorragia no tecido renal, mas alterou a estrutura glomerular, além de alterações no citoplasma das células dos túbulos proximal e distal. Contrariamente, esta toxina não produz efeito nenhum a nível hepático. A BtaHF consome o fibrinogênio plasmático de modo dose e tempo-dependente, produzindo incoagulabilidade sanguínea após uma hora. Estudos *in vitro* revelaram atividade pro-coagulante dose-dependente, ao reduzir os índices PT e APPT.

A utilização de metodologias de purificação de alta eficiência permitam a purificação da metaloprotease BtaHF. Assim, esta abordagem pode ser aplicada nos estudos bioquímicos, estrutura-função, fisiológicos e farmacológicos, podendo deduzir o papel desenvolvido pela metaloprotease purificada nos efeitos biológicos produzidos pelo veneno total de *Botriopsis taeniata*. As informações produzidas no presente trabalho permitiram sugerir que as principais funções das metaloproteases de veneno de serpente da classe P-I são manter a hemorragia característica dos envenenamentos botrópicos e participar da imobilização da presa promovendo rápidos efeitos próinflamatórios.

Abstract

In this work we described the purification, structural characterization and the local and systemic effects of a new low molecular weight snake venom metalloproteinase, named BtaHF. This protein was purified from the *Bothriopsis taeniata* crude venom combining conventional molecular exclusion (Sephadex G-75 column) followed by an ion exchange (DEAE 8HR AP-Minicolumn) chromatography on a HPLC system. The new metalloproteinase BtaHF showed a high degree of purity and molecular homogeneity with a molecular mass of 25968.16 Da.

BtaHF showed caseinolytic activity with an optimum temperature and pH of 37-40 °C and 8, respectively. The caseinolytic activity was inhibited by EGTA, EDTA and DTT, but PMSF and SBT-I did not show inhibitory effect. The Ca^{+2} ion shown to be important for protein stability enhancing its caseinolytic activity, on the contrary, Z^{+2} and Mn^{+2} showed inhibitory effects upon the enzymatic activity of this protein.

The metalloproteinase BtaHF is an α -fibrinolytic enzyme, rapidly degraded fibrinogen A α chain within 15 minutes, while fibrinogen B β chain is degraded after 6 hours. This enzyme did not show fibrinolytic or arginine amidase activities

BtaHF is an acidic protein due the mayor proportion of acidic amino acid in its amino acid composition with 6 cysteinyl residues. By the homology study BtaHF share a high sequence identity other weakly hemorrhagic P-I class SVMP such BaP1 isolated from *Bothrops asper* snake venom

This new metalloproteinase, BtaHF, have a weak hemorrhagic with a minimum hemorrhagic dose of 20.14 μg . Also, this metalloproteinase showed dose-dependent paw edema-forming activity, this effect remain six hours after inoculation. Both hemorrhage and edema-forming activities were related to the enzymatic activity and correct fold of BtaHF, since chelating (EDTA and EGTA) and reducing (DTT) agents inhibited these activities. On the other hand, this enzyme did not show mitotoxic activity, although, showed citotoxic activity on C2C12 fibroblast.

Histological analysis of mice gastrocnemius muscle confirmed that the metalloproteinase produce local hemorrhage and pro-inflammatory effects, as well as, the absence of mitotoxic activity.

This metalloproteinase, BtaHF, produce specific systemic effects when injected endovenously in mice. On lung tissue level these toxin produce alteration of alveolus structure

with significant hemorrhage, thickness of alveolus septum and inflammation. On renal tissue BtaHF did not produce hemorrhage, but, was observe alteration of glomerulus structure, along with cytoplasmatic alterations of distal and proximal tubulus cells. On the other hand, were not observed any alterations on hepatic tissue. BtaHF deplete completely plasma fibrinogen levels in a time and dose-depended manner, reaching blood incoagulability after one hour. BtaHF shown dose-dependent pro-coagulant activity “ex vivo” reducing PT and APPT index.

The metalloproteinase BtaHF was purified using a high efficient system. Thus, this approach can be applied to biochemical, structure-function, physiologic and pharmacologyc studies which allow infer the role of this enzyme in the biological effects produce by *Bothriopsis taeniata* crude venom. The information here presented suggest that the mainly functions of P-I class snake venom metalloproteinases are the maintenance of the characteristic hemorrhagic effect of the botropic venoms and participate of prey immobilization by promoting rapid inflammatory effects.

I.- INTRODUÇÃO

1.1.- Aspectos Gerais dos venenos de Serpentes

Na história da civilização, as serpentes venenosa durante anos fizeram parte das peculiaridades culturais. As serpentes tiveram participação nas artes, ciência e religião como representações simbólicas de inúmeras crenças. No início do século 20 as investigações sobre a bioquímica e a farmacologia das peçonhas de serpentes introduzindo novos conhecimentos sobre os venenos demonstraram grande diversidade funcional e estrutural de seus componentes, que são capazes de realizar inúmeras funções biológicas correlacionadas em diferentes áreas da saúde como: hematologia, neurologia e cardiologia (Gutierrez, 2002; Koh *et al.*, 2006). Na atualidade são reconhecidas cerca de 3000 espécies de serpentes, sendo 500 espécies consideradas peçonhentas e destas somente 200 podem provocar envenenamentos em humanos (Fry *et al.*, 2006).

Pelas inúmeras propriedades bioquímicas, funcionais e estruturais, as peçonhas de serpentes são alvos interessantes de estudo. Em um acidente ofídico, a manifestação clínica depende da toxicidade intrínseca do veneno e da quantidade injetada. Os acidentes ofídicos apresentam sintomas variados, apresentando em sua maioria grande importância clínica e estes sistemas são classificados em poucas categorias (Koh *et al.*, 2006). Os acidentes botrópicos causados por serpentes do gênero *Bothrops* causam lesões locais como edema, bolhas e necrose, produzidos pelas ações de componentes enzimáticos como proteases, hialuronidases e fosfolipases. Além da atividade local, os envenenamentos causados por serpentes do gênero *Bothrops* produzem problemas na coagulação, caracterizados pela degradação proteolítica ou ativação dos fatores de coagulação, agindo como agonistas ou antagonistas da agregação plaquetária e degradando os componentes da membrana basal de capilares. Estas ações na hemostase têm como manifestação final a hemorragia, que é uma síndrome própria dos acidentes botrópicos (Ministério de Saúde, 2001).

O veneno de serpente contém uma mistura de compostos complexos de origem orgânica e compostos simples de origem inorgânica. Dentre os compostos simples de origem inorgânica estão íons como cálcio, cobre, ferro, potássio, magnésio, manganês, sódio, fósforo, cobalto e zinco (Friederich & Tu, 1971).

Dentro os compostos complexos de origem orgânica, encontram-se as proteínas (90-95% do peso seco do veneno), carboidratos, aminas biogênicas, aminoácidos e nucleotídeos. Na

composição protéica da peçonha de serpentes, podemos encontrar componentes enzimáticos como acetilcolinesterases (inibição do sistema nervoso central), adenosinadifosfatase, fosfolipases (relacionadas com a miotoxicidade e neurotoxicidade), hialuronidasas, L-aminoácido oxidases, metaloproteases, serinoproteases; e componentes não enzimáticos como desintegrinas, lectinas tipo C e peptídeos potenciadores da bradicinina (Braud *et al.*, 2000; Markland, 1998; Suhr & Kim, 1996; Tu, 1991). Em seguida serão descritas as principais classes de enzimas que constituem os venenos de serpentes:

1.1.1. Oxidoreduções

No veneno bruto de serpente são encontradas pelo menos duas enzimas responsáveis por reações tipo redox: as L-aminoácido oxidases (LAO) e lactato desidrogenase. As LAO convertem o aminoácido livre em um α -cetoácido. Muitos venenos de serpentes possuem atividade elevada de LAO que são responsáveis pela cor amarela dos venenos secos (Du & Clemetson, 2002). Descobriu-se que as LAO são capazes, em determinadas condições laboratoriais, de induzir a agregação plaquetária (Li *et al.*, 2008), e a apoptose em determinados tipos celulares (Suhr & Kim, 1996). Mclean e colaboradores (1971) descreveram que o veneno de algumas serpentes catalisa a conversão do lactato a piruvato. A presença do lactato desidrogenase foi demonstrada em vários venenos, principalmente em serpentes do gênero *Naja* e *Dendroaspis*.

1.1.2. Hidrolases

São consideradas neste grupo: fosfatases, fosfodiesterases, endonucleases, 5-nucleotidasas. As fosfodiesterases de veneno de serpente são largamente utilizadas no sequenciamento de oligonucleotídeos e polinucleotídeos. A 5-nucleotidase é uma enzima específica encontrada na maioria dos venenos de serpentes e é mais instável do que as fosfodiesterases. A importância das proteínas fosfatases se deve a sua participação nos processos de crescimento, diferenciação e proliferação celular, uma vez que as mesmas regulam a atividade de outras enzimas por desfosforilação, levando à alteração de suas atividades intrínsecas, permitindo assim um funcionamento perfeito do mecanismo de transdução de sinais, desencadeando uma série de reações bioquímicas que induzem uma resposta biológica, por exemplo: alterações no metabolismo de carboidratos, assim como em eventos carcinogênicos (Sales & Santoro, 2008).

1.1.3. Fosfolipases A₂

São enzimas largamente distribuídas na natureza, sendo encontradas em bactérias, plantas e tecidos de mamíferos (pulmão, fígado, baço, coração, eritrócitos, plaquetas e leucócitos polimorfonucleares). As mais conhecidas e estudadas são aquelas encontradas nos tecidos pancreáticos de mamíferos e nos venenos de serpentes e insetos (Dennis, 2000).

Nos venenos de serpentes elas se destacam como uma das principais famílias de proteínas, pois se apresentam em grandes quantidades. As PLA₂ são as enzimas mais estudadas do ponto de vista bioquímico e biológico, e têm importante papel na digestão de fosfolipídeos de membrana (Kini, 2003).

1.1.4. Glicosidases

Estas enzimas têm a função de facilitar a difusão das toxinas do veneno para dentro do tecido das vítimas (Tu, 1991). Dentre estas enzimas citam-se as α -amilases, as NAD nucleotidases e a hialuronidase. A hialuronidase é uma enzima que faz a catálise (hidrólise) do ácido hialurônico, um mucopolissacarídeo presente na pele, nos tecidos conectivos e nos tendões.

1.2. Proteases

Agrupam se em dois grandes grupos: as endopeptidases e as exopeptidases (Iwanaga *et al.*, 1976). Não são responsáveis pela ação letal dos venenos, mas causam outros tipos de efeitos danosos, tais como hemorragia. Venenos de serpentes das famílias Crotalidae e Viperidae contêm um ou mais fatores hemorrágicos chamados hemorraginas. Estas moléculas são caracterizadas como metaloproteases que contêm zinco e apresentam um domínio protease e, em algumas delas, domínios adicionais. Estas proteases agem degradando proteínas que compõem a membrana basal subjacente das células endoteliais dos capilares (Gutierrez *et al.*, 2005).

As proteases do veneno de serpente classificadas em serinoproteases e metaloproteases, são os principais grupos de enzimas que levam ao desequilíbrio hemostático (Braud *et al.*, 2000; Matsui *et al.*, 2000).

1.2.1. Serinoproteases de veneno de serpente (SVSP)

As serinoproteases de veneno de serpente (SVSP, siglas em inglês) são enzimas proteolíticas presentes em muitos gêneros das serpentes peçonhentas das famílias Viperidae e Colubridae (*Agkistrodon*, *Bothrops*, *Lachesis*, *Trimeresurus*, *Bitis*, *Ceratastes*, etc). As SVSP's

têm papel importante na atividade coagulante mostrada em muitos venenos de serpentes (Castro *et al.*, 2004; Lu *et al.*, 2005).

O principal mecanismo das SVSP's, que contribui para a coagulação do sangue, é a degradação proteolítica do fibrinogênio para formar monômeros de fibrina, estes monômeros polimerizam parcialmente formando um coágulo instável de fibrina com a qual as plaquetas não interagem para formar o tampão plaquetário. Este mecanismo de formação de fibrina apresentado pelas SVSP's tem muitas similaridades com o mecanismo da trombina, pelo qual são denominadas Thrombin-like (Braud *et al.*, 2000).

As SVSP's possuem outras atividades biológicas que afetam a hemostase, como a ativação de fatores da cascata de coagulação como o Fator V, a degradação da fibrina (atividade fibrinolítica), além de agirem como agonistas da agregação plaquetária pela interação com receptores de membrana como Proteinase-activate Receptors 1 (PAR-1) e 4 (PAR-4). Algumas SVSP's produzem incoagulabilidade do sangue pela ativação da Proteína C a qual degrada fatores V e VIII ativado, resultando no efeito anticoagulante (Braud *et al.*, 2000; Castro *et al.*, 2004). Cita-se como exemplo, a Balterobin purificada do veneno de *Bothrops alternatus* (Smolka *et al.*, 1998) e a Ba III-4 de *B. atrox* (Ponce-Soto *et al.*, 2007).

1.3. Metaloproteases de veneno de serpente (SVMP)

As hemorraginas de veneno de serpente são metaloproteases zinco dependente, as quais são componentes importantes do veneno das serpentes da família vipéridae. Estas enzimas pertencem à superfamília das metzincinas (metaloendopeptidases zinco dependentes) junto com as astalisinas, serralisinas, ADAM (A Desintegrin And Metalloproteinase) e metaloproteases de matriz (Ströcker & Bode, 1995).

1.3.1. Estrutura das metaloproteases de veneno de serpentes

As metaloproteases de veneno de serpentes (EC 3.4.24) são enzimas modulares de forma elipsoidal e dependente de zinco para realizar a sua função enzimática (Stöcker & Bode, 1995). Estas enzimas apresentam a adição de domínios na região C-terminal, o qual faz com que possuam uma faixa de massa molecular entre 20 e 100 kDa, além da diversidade nos efeitos farmacológicos produzidos (Björnason & Fox, 1994)

As metaloproteases de veneno de serpente são produzidas como zimogênios. O domínio principal que compõe estas enzimas é o domínio metaloprotease. Em seguida se descreverão os domínios que se apresentam nas metaloproteases de veneno de serpente.

1.3.1.1. Pré-Sequência

Hite e cols (1992) foram os primeiros a demonstrar que as SVMP são traduzidas como zimogênios e apresentam uma sequência sinal altamente conservada. Na Atrolisina esta sequência está conformada por 18 resíduos de aminoácidos. Nesta toxina a quebra da pré-sequência acontece entre os aminoácidos Gly18 e Ser19 (Björnason & Fox, 1994; Hati *et al.*, 1999).

1.3.1.2. Pró-sequência

Nos estudos dos cDNA das SVMP observou-se a presença de um domínio nomeado de Pró-sequência, encontrado entre a pré-sequência e o domínio metaloprotease. Na Atrolisina (*Crotalus atrox*) o domínio é conformado por 169 resíduos de aminoácidos. O domínio Pró-sequência é altamente conservado e apresenta uma sequência consenso de 7 resíduos de aminoácidos (PKMCGVT) perto do início da região N-terminal (aproximadamente 20 resíduos de aminoácido) da proteína funcional (zimogênio pós processado). Essa sequência é similar à sequência apresentada na família das Metaloproteases de Matriz (MMP's, PRCGV/NPV/LA7G), as quais são endopeptidases dependentes de Zn^{+2} produzidas por células endoteliais de mamíferos (Hati *et al.*, 1999; Keeling *et al.*, 2005). A função proposta para esta sequência é similar à apresentada nas Metaloproteases da Matriz (MMP, siglas em ingles) o qual é a de um “Cysteine switch” ou “Velcro” que inativa o domínio metaloprotease (Grams *et al.*, 1993).

1.3.1.3. Domínio Metaloprotease

O domínio metaloprotease é classificado, topologicamente, como uma proteína α/β , composta por sucessão de elementos estruturais secundários fixos: 5 folhas β (na qual a folha 4 é antiparalela) e 5 estruturas α hélice (onde a hélice $\alpha 1$ contém de 4 a 6 resíduos sendo a menor, e a hélice $\alpha 2$ é a maior com 16 a 21 resíduos). O sítio ativo divide o domínio metaloprotease em dois sub-domínios: o maior N-terminal e o menor C-terminal, os quais são ligados por duas ou três pontes dissulfeto, localizadas na região C-terminal, são responsáveis pela estabilidade da estrutura globular da enzima (Stöcker & Bode, 1995; Ramos & Selistre-de-Araujo, 2006).

O domínio que contém o sítio catalítico e possui uma extensão de 200-215 resíduos de aminoácidos e contém a sequência consenso HEBxHxBGBxHD (B: aminoácidos hidrofóbicos; x: qualquer resíduo). As Histidinas são as responsáveis pela ligação do átomo do Zinco e junto com uma molécula de água fazem a formação de um complexo tetraédrico piramidal. Neste complexo o primeiro e o terceiro resíduos de histidina e a molécula da água compõem a base, a terceira histidina forma o topo da pirâmide, e o zinco alinha-se com o plano da base (Stöcker & Bode, 1995; Hati *et al.*, 1999; Ramos & Selistre de Araújo, 2006).

De forma geral o domínio metaloprotease apresenta duas ou três pontes dissulfeto (Fox & Serrano, 2005; Ramos & Selistre de Araújo, 2006), o padrão das pontes relaciona-se segundo o tipo de SVMP, mas a introdução de pontes dissulfeto parece não produzir distúrbios significativos na estrutura do domínio, pelo qual, a influência na estrutura-função das SVMP ainda não está esclarecido (Fox & Serrano., 2005).

As SVMP compartilham a sequência motivo CIMxP (x: qualquer resíduo de aminoácido), a qual fica 24 resíduos de aminoácidos da sequência consenso na direção da região C-terminal da cadeia polipeptídica. Este motivo, nomeado “Met-Turn” ou “Giro-Metionina” (tradução livre), forma uma alça com giro à direita e é altamente conservado na superfamília das Metzincinas (superfamília pertencente as metaloproteases dependentes Zn^{+2}). A função principal da metionina é, ao parecer, estabilizar os resíduos de histidina, favorecendo a sua ligação com o zinco (Ströcker & Bode, 1995; Ramos & Selistre-de-Araújo, 2006).

O domínio metaloprotease é menos conservado que o pró-domínio, o que sugere que as SVMP evoluíram por meio da duplicação de genes, a partir de um ancestral comum e que este domínio sofreu um processo de evolução acelerada (Ramos & Selistre de Araújo, 2006).

1.3.1.4. Peptídeo ou Segmento Espaçador

Num primeiro momento foi definido como um segmento entre os domínios metaloprotease e Desintegrin-like (Björnason & Fox, 1994). O peptídeo apresenta 13-15 resíduos de aminoácido de comprimento; alguns precursores de metaloproteases de baixa massa molecular sofrem proteólise deste segmento, embora outros sejam encontrados em domínios desintegrinas e Desintegrin-like de cadeia longa. Nestes casos um resíduo de cisteína extra se encontra envolvido na formação de pontes dissulfeto com as cisteínas presentes no domínio formando novos padrões de pontes dissulfeto (exemplo Bitistatin-I e Catrocollastatin-C). No caso das SVMP o peptídeo possivelmente está relacionado com a resistência ao processamento proteolítico da proteína (Fox

& Serrano, 2005; Ramos & Selistre-de-Araújo, 2006). Kini e Cols (1997) sintetizaram um peptídeo baseado neste segmento e avaliaram a toxicidade e a atividade biológica dele. O segmento espaçador não apresentou atividade letal, anticoagulante ou efeito sobre as plaquetas e não mostrou nenhum efeito significativo nos níveis sanguíneos de triglicérides, colesterol total, ou lipoproteínas como o HDL ou LDL. Com tudo, o segmento apresentou atividade hipotensora em ratos normotensivos, mas ao ser testado com ratos hipertensivos não foi observado redução significativa. Com tudo, ao que parece o segmento espaçador não contribui com a atividade biológica das proteínas nas quais se apresenta.

1.3.1.5. Domínio Desintegrina e Desintegrina-símile

As Desintegrinas são uma família de peptídeos que apresentam baixa massa molecular, apresentam de 41 a 100 resíduos de aminoácidos, contem vários resíduos de cisteína os quais configuram variados padrões de pontes dissulfeto (Ramos & Selistre-de-Araújo, 2006). Estes peptídeos são encontrados na peçonha de serpentes da família Viperidae, e a maioria destes peptídeos são formados a partir de precursores SVMP da classe P-II por proteólise. Estes peptídeos apresentam uma estrutura em alça tipo- β de 13 resíduos de aminoácidos de comprimento, onde se encontra presente a sequência consenso RGD. A sequência consenso RGD é a responsável pela atividade inibitória da agregação plaquetária que estes peptídeos possuem, o motivo interage com o complexo glicoproteína IIb/IIIa (integrina $\alpha_{IIb}\beta_{III}$) inibindo a agregação plaquetária induzida pelo fibrinogênio como a Trigamin isolada do veneno bruto de *Trimeresurus flaviridis* (Kamiguti *et al.*, 1998; Hati *et al.*, 1999; Ramos & Selistre-de-Araújo, 2006).

As SVMP's de alta massa molecular apresentam domínios que possuem alta similaridade com as Desintegrinas, mas apresentam diferenças em relação a duas características: o motivo RGD não é conservado, observando-se que a arginina é trocada, em alguns casos, por ácido aspártico (DCD) ou ácido glutâmico (ECD, HR-1B e jararhagin) e duas cisteínas extras, formando assim pontes dissulfeto com o Segmento Espaçador e o domínio Cystein-rich. Estes domínios são nomeados como Desintegrin-like e potenciam atividade hemorrágica das SVMP's da classe P-III hemorrágicas pela interação com o colágeno de tipo I e IV, além de inibir a atividade da agregação plaquetaria (Hati *et al.*, 1999; Ramos & Selistre-de-Araújo, 2006; Moura da Silva *et al.*, 2008).

1.3.1.6. Domínio Rico em cisteína

Este domínio apresenta-se nas SVMP de alta massa molecular (Classe P-III) no sentido carboxi-terminal do domínio desintegrin-like. Este domínio é caracterizado pelo alto número de resíduos de cisteína, as quais se ligam para formar as pontes dissulfeto. Contudo, o domínio rico em cisteína apresenta um padrão definido de resíduos de cisteína. O primeiro padrão está na primeira metade do domínio (subdomínio), e possui maior conservação dos resíduos de cisteína apresentando a sequência CX6CX4CX14CX12CX9CX4C- (X: qualquer resíduo de aminoácido). Na segunda metade do domínio o padrão apresenta maior variabilidade e a necessidade de inserir “gaps” para os alinhamentos: CX4/6/10CX15/18/19CX5CX4CX7/9/16 (Björnason & Fox, 1994; Hati *et al.*, 1999).

No caso dos precursores de SVMP (classe P-I) e desintegrin-like que sofrem processo proteolítico, o domínio rico em cisteína apresenta-se sempre unido ao domínio desintegrina, a função atribuída, neste caso, é o correto alinhamento do domínio desintegrina (Björnason & Fox, 1994; Hati *et al.*, 1999).

Nas SVMP's de alta massa molecular (P-III) a função observada é o aumento da potência hemorrágica pela interação deste domínio com receptores de células endoteliais ou proteínas da membrana basal dos capilares (Björnason & Fox, 1994; Escalante *et al.*, 2006; Baldo *et al.*, 2009; Moura da Silva *et al.*, 2008). Outras atividades biológicas foram descritas para o domínio rico em cisteína. Jia e cols (1997) demonstraram que este domínio inibe a agregação plaquetária ($IC_{50} = 456nM$) induzida pelo colágeno, além de inibir a adesão de células MG-43 ao colágeno, as inibições foram dose dependente, mas não apresentou inibição da agregação plaquetária dependente do ADP (Björnason & Fox, 1994; Ramos & Selistre-de-Araújo, 2006).

1.3.1.7. Subunidade similar à Lectina tipo C

Este domínio foi descrito unicamente para as metaloproteases RVV-X (*Vipera russelli*) e VLFXA (*Vipera libetina*) e cada uma possui duas subunidades proteicas adicionais C-type Lectin-like ligadas à cadeia principal por pontes dissulfetos ao domínio rico em cisteína (figura 1; Björnason & Fox, 1995; Ramos & Selistre de Araújo, 2006).

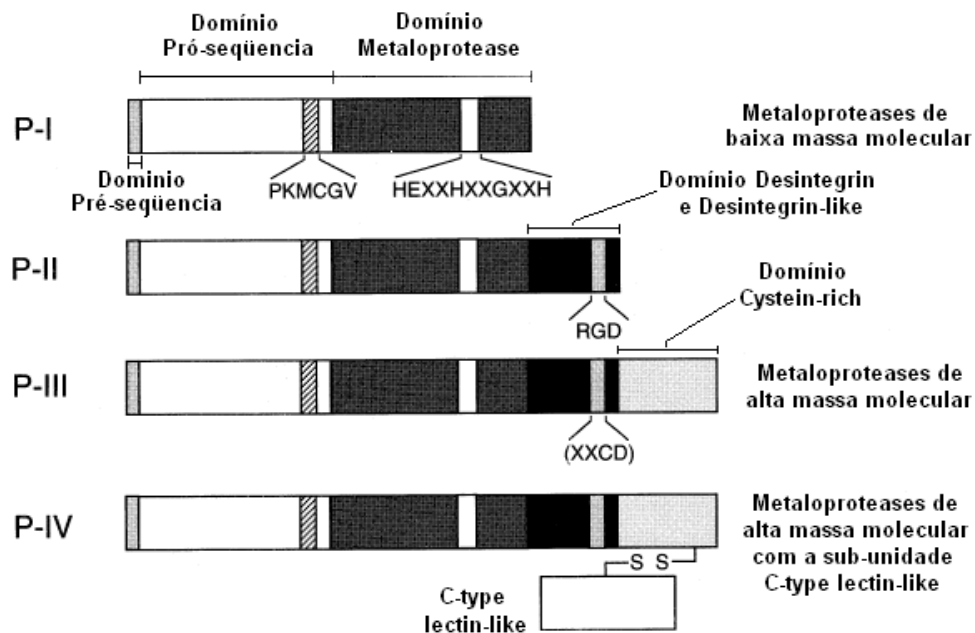


Figura 1. Domínios presentes nas metaloproteases de veneno de serpente. A figura mostra as seqüências consenso dos domínios Pró-seqüência (PKMCGV), Metaloprotease (HEXXHXXGXXH) e Desintegrina (RGD ou XXCD); adaptado de Ramos & Selistre de Araujo, 2005)

1.3.2.- Classificação das metaloproteases de veneno de serpente

A classificação das SVMP's é feita de acordo com a adição de domínios estruturais, fornecendo informações essenciais para compreender os mecanismos de ação dessas enzimas. As SVMP inicialmente foram classificadas em quatro classes (Bjarnson & Fox, 1994; Fox & Serrano, 2005), mas esta classificação foi alterada recentemente (Fox & Serrano, 2008). Atualmente as metaloproteases de veneno de serpente são classificadas em 3 classes:

1.3.2.1. SVMP Classe P-I: Esta classe apresenta a estrutura básica das SVMP's, baseada no cDNA, composto pelos Pré-Domínio, Pró-Domínio e Domínio Protease. Todas as SVMP-PI apresentam o motivo HEXXHXXGXXH, que é o sítio ativo e de ligação ao zinco, além disso, apresenta a seqüência CI/VM conhecida como "Met-Turn". Todos os membros desta classe possuem atividade proteolítica e atividade hemorrágica fraca. Atrolysin B, C, D, LHF-II, Fibrolase, Atroxase são alguns membros (Bjarnson & Fox, 1994; Fox & Serrano, 2005; Fox & Serrano, 2008).

1.3.2.2. SVMP Classe P-II: Apresentam a mesma estrutura básica das P-I's, mas tem a adição de um domínio "Desintegrin-simile" na região C-terminal. Este domínio apresenta o motivo RGD que age como um bloqueador de integrinas responsáveis da agregação plaquetária. Em geral as P-

II apresentam uma ação hemorrágica mais forte que as P-I. Em recentes revisões (Fox & Serrano, 2008) foi expandida a subclassificação desta classe de duas subclasses (P-IIa e P-IIb) para cinco subclasses (P-IIa – P-IIe) baseado no padrão de pontes dissulfeto e no processamento pós-traducional destas enzimas. As P-II são subclassificadas: P-IIa, as quais compreendem estruturas que sofrem a quebra no segmento espaçador liberando o domínio metaloprotease e desintegrina-simile os quais são funcionais, exemplo desta subclasse são Atrolysina E (*Crotalus atrox*) e Trigamin (*Trimeresurus gramineus*); P-IIb e P-IIc, pertencente a estas classes as metaloproteases P-II que não são susceptíveis de quebra proteolítica, sendo proteínas de cadeia única funcionais, a diferença entre estas duas subclasses é que as metaloproteases P-IIc formam estruturas diméricas. Exemplos de metaloproteases P-IIb são a Jerdonitina (*T. jerdonii*) e Stejnitin (*T. stejneri*); exemplos de metaloprotease P-IIc são BaG (*Bothrops alternatus*) e Bilitoxin-1 (*Angkistrodon bilineatus*). P-IId, são as metaloproteases P-II que sofrem processamento proteolítico liberando desintegrinas funcionais, enquanto o domínio metaloprotease é degradado. Exemplo desta subclasse formam estruturas diméricas, exemplo desta subclasse é a VAP1 (*Vipera russelli*) (Björnson & Fox, 1994; Fox & Serrano, 2005; Fox & Serrano, 2008)

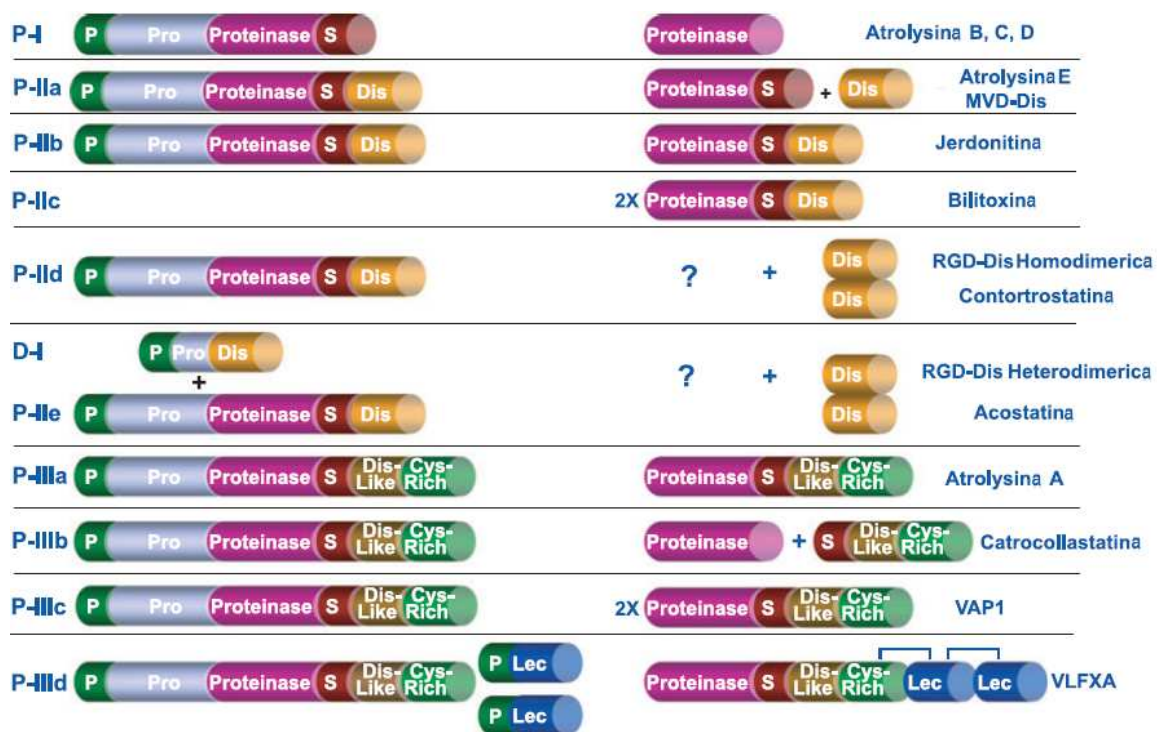


Figura 2. Classes e subclasses das metaloproteases de veneno de serpente. No lado esquerdo da figura mostra-se as formas não processadas das SVMP, no lado direito mostra-se as formas processadas das SVMP (adaptado de Fox & Serrano, 2008).

1.3.2.3. SVMP Classe P-III: As toxinas que pertencem a esta classe apresentam estrutura básica (P-I), com a presença do domínio “Desintegrin-like” e adicionado depois um domínio “Cysteine-rich”, que é caracterizado pela presença de vários resíduos de cisteína. A presença dos três domínios sugere uma complexidade funcional, além disso, apresenta a maior atividade hemorrágica das SVMP junto com outros efeitos na hemostase. As P-IIIs são subclassificadas: P-IIIa, compreendem estruturas completas de cadeia única, como pôr exemplo Atrolysina A (*C. atrox*) ou Daborhagin (*Daboia russelli*). P-IIIb, pertencente a esta classe são as metaloproteases P-III que são susceptíveis de quebra proteolítica liberando o domínio metaloprotease e o domínio desintegrina-simile/rico em cisteína, exemplos desta subclasse são a jararhagina (*B. jararaca*) e Baltergina (*B. alternatus*); P-IIIc, são as metaloproteases P-III que formam estruturas diméricas, exemplo desta subclasse é a VAP1 (*V. russelli*) (Björnson & Fox, 1994; Fox & Serrano, 2005; Fox & Serrano, 2008).

Recentemente foi incluída a classe P-IIId a qual inclui os membros da classe P-IV. Fox e Serrano (2008) baseiam-se em estudos feitos usando cDNA, os quais mostram que a estrutura P-III e C-type Lectin-like são codificadas por diferentes genes (VLFXA, *Vipera libetina*) sugerindo que os membros desta classe são produtos de modificações pós-traducionais. Esta subclasse caracteriza-se pela presença da cadeia principal que é uma estrutura similar à P-III e mais dois domínios “C-type Lectin-Like” que se apresentam ligadas por pontes dissulfeto a cadeia principal (estrutura quaternária). Atualmente têm-se dois representantes: RVV-X (Russelysin) e VLFXA (VL Factor-X Activator; Fox & Serrano, 2008).

1.3.3.-Aspectos funcionais das metaloproteases de veneno de serpente

1.3.3.1.- Mecanismo da atividade enzimática e ativação

As metaloproteases de veneno de serpente são endopeptidases que possuem atividade catalítica numa variedade de substratos endógenos. Dentre esses substratos endógenos encontram-se proteínas como: fibrinogênio/fibrina, fibronectina, laminina, nidogeno (entactina), colágeno (tipo I- IV), gelatina, fator de von Willebrand, α 2-Macroglobulina, insulina, oxitocina, bradicinina, substancia P e proteínas expressas na superfície celular como integrinas (Maruyama *et al.*, 1992; Bjarnason & Fox, 1994; Trummal *et al.*, 2000; Ramos & Selistre de Araujo, 2004). Embora as metaloproteases possuam uma ampla atividade e variedade de substratos, o sítio de clivagem e a ligação peptídica onde acontece a proteólise são surpreendentemente específicos

(Bjarnson & Fox, 1994). Usando a cadeia β da insulina como substrato foi determinado que as metaloproteases quebram preferencialmente e rapidamente as ligações X-L, onde X (posição P1) é um aminoácido pequeno polar (Alanina) ou um aminoácido hidrofóbico (Leucina, Tirosina, Fenilalanina), enquanto a Leucina (L) é necessária na posição P1' (Figura 3A; Bjarnson & Fox, 1994; Sánchez *et al.*, 1995; Ramos & Selistre de Araujo, 2006; Chen *et al.*, 2008).

O mecanismo de catálise das metaloproteases de veneno de serpente é realizado por meio de ataque nucleofílico, ou seja, utilizando uma molécula de água polarizada para a quebra da ligação peptídica. Como vimos anteriormente o domínio metaloprotease contém o motivo metaloprotease, no qual três histidinas coordenam um átomo de zinco. A molécula de água que se encontra entre o átomo de zinco e o grupo carboxila da cadeia lateral do ácido glutâmico catalítico ficam polarizadas ao transferir um próton ao grupo carboxila do ácido glutâmico (figura 3B). A molécula de água polarizada “ataca” o carbono do grupo carbonila da ligação peptídica do substrato (P1), originando um estado de transição penta-coordenado (figura 3C). O próton extra que possui o ácido glutâmico é transferido para o nitrogênio do enlace peptídico do substrato na posição P1' (Leucina; figura 3D), completando a quebra da ligação e liberando os produtos (Stöcker & Bode, 1995; Ramos & Selistre de Araujo, 2006).

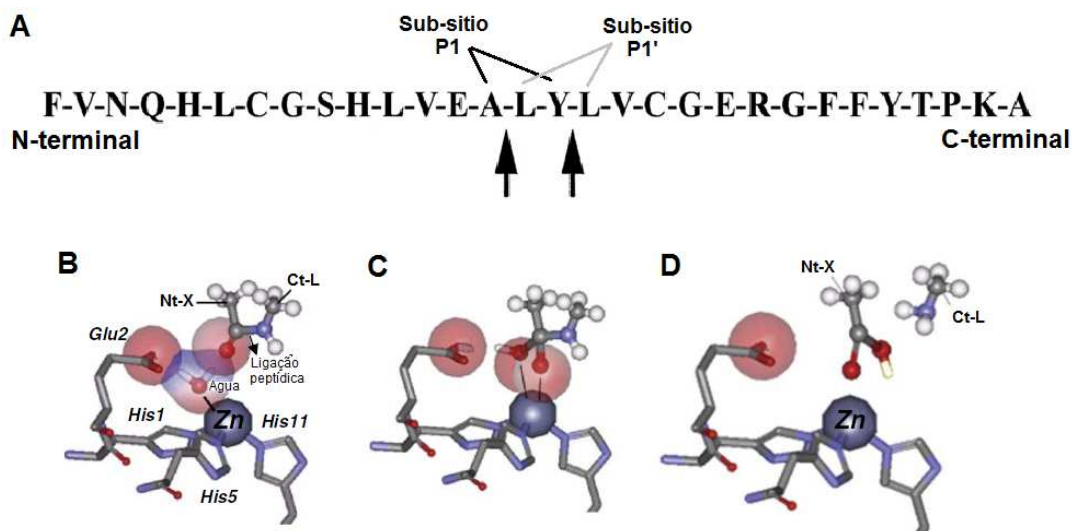


Figura 3. Especificidade de substrato e mecanismo catalítico das metaloproteases de veneno de serpente. A) Pontos de quebra da ligação peptídica da cadeia β da insulina (setas pretas) pelas SVMP. B) Polarização da molécula de água. C) Transferência de próton da molécula de água para o ácido glutâmico (Glu) e formação do intermediário penta-coordenado. D) Transferência do próton do Glu para o nitrogênio da ligação peptídica quebrada e liberação dos produtos.

Como foi descrito acima, as metaloproteases de veneno de serpente são sintetizadas como zimogênios. O mecanismo de ativação foi descrito por Grams e cols (1993) e foi nomeado

“Cystein-switch” ou “Velcro”, e seria similar ao proposto para metaloproteases de matriz (MMP). Este mecanismo é baseado em um motivo altamente conservado no pró-domínio “PKMCGVT”, o qual interage com o sítio catalítico semelhante um “cachorro quente”. O grupo tiol da cisteína teria a função de se ligar com o átomo de Zn, bloqueando fisicamente o sítio catalítico e impedindo a formação do complexo enzima-substrato. A hipótese mais aceita é a ativação por ação autocatalítica residual. Foi observado que nesse mecanismo o pró-domínio é sucessivamente degradado em direção à região C-terminal envolvendo resíduos hidrofóbicos na posição P1’, gerando intermediários de ativação. O processo continua até liberar completamente o sítio catalítico dessa proteína (Shimokawa *et al.*, 1996; Ramos *et al.*, 2003; Ramos & Selistre de Araujo, 2006).

1.3.4.-Efeitos biológicos das metaloproteases de veneno de serpente

As metaloproteases de veneno de serpente são responsáveis pelo efeito hemorrágico local e sistêmico, característico dos acidentes ofídicos causados por espécies da subfamília viperinae e crotalinae (Ministerio de Saúde, 2001). Adicionalmente, essas toxinas estão envolvidas na manifestação de outros efeitos patológicos como: mionecrose local, danos na pele, formação de edema (dentre outros processos inflamatórios), distúrbios na hemóstase sanguínea e dano tecidual (Figura 3. Gutierrez & Rucavado, 2000; Ramos & Selistre-de-Araujo, 2006). Seguidamente, iremos descrever os principais efeitos farmacológicos produzidos por estas toxinas.

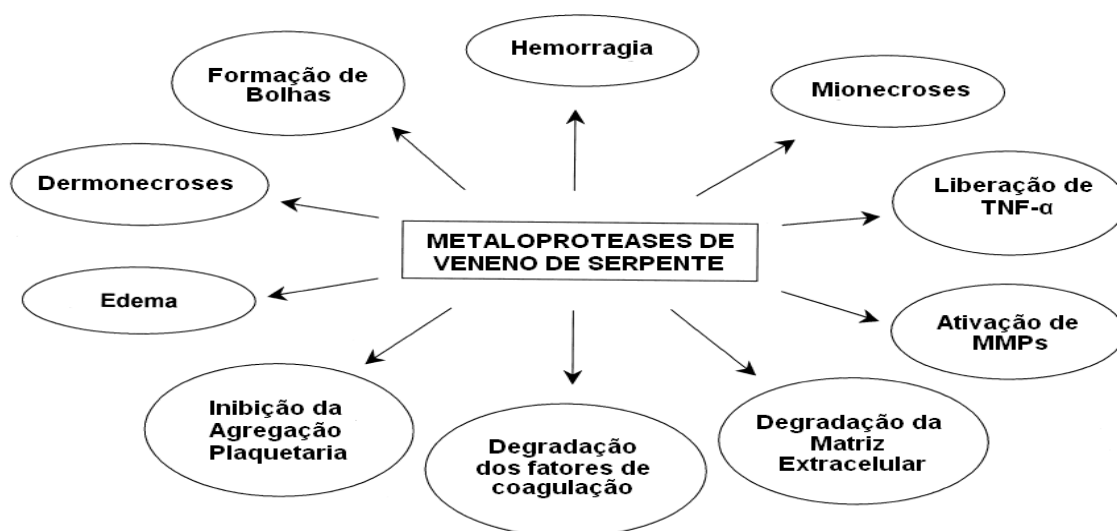


Figura 4. Resumo dos vários efeitos exercidos pelas metaloproteases de veneno de serpente. Alguns dos efeitos são devido à ação direta das SVMP's, mas outros são efeitos secundários como resultado da ação destas enzimas (adaptado de Gutierrez & Rucavado, 2000).

1.3.4.1. Efeito hemorrágico

O acidente ofídico produzido pela família Viperidae é caracterizado, entre outros, pela hemorragia severa. A hemorragia produzida pode ser no local da picada e contribuir com a isquemia local, ou também sistêmica afetando outros órgãos diferentes do local da picada produzindo complicações como choque cardiovascular (Gutierrez *et al.*, 2005), sendo o principal alvo a membrana basal dos capilares e vênulas. Além disso, combina-se com uma ampla variedade de efeitos dos venenos na hemostase sanguínea (Bjarnason & Fox, 1994; Markland, 1998).

Em capilares e vênulas a membrana basal (MB) possui um papel fundamental no arranjo estrutural do endotélio e também influencia a adesão celular, acumulando fatores de crescimento, além de participar na formação do trombo plaquetário pela interação de alguns de seus componentes com receptores da membrana das plaquetas (Savage *et al.*, 2001; Kalluri, 2003). Componentes da MB como a laminina se associam com integrinas de membranas das células endoteliais e por sua vez, a laminina se associa com o colágeno tipo IV por meio do nidogênio (entactina), os quais formam a estrutura basal da MB. As metaloproteases de matriz (MMP) são as encarregadas da manutenção e reparo da membrana basal, além da sua participação nos processos inflamatórios facilitando o incremento da permeabilidade vascular (Keeling *et al.*, 2005).

O efeito hemorrágico observado em acidentes ofídicos é produzido pelas metaloproteases de veneno de serpente ou hemorraginas, as quais hidrolisam os componentes da membrana basal como colágeno tipo IV, laminina, entactina, fibronectina. A hidrólise destes componentes é o passo fundamental na patogênese da hemorragia. Nos capilares, as células endoteliais sofrem alterações na sua morfologia tais como redução de vesículas pinocíticas e projeções celulares no lúmen do capilar. Estas alterações junto com o desprendimento da membrana basal que ocorre devido à hidrólise, formam lacunas (gaps) nas células endoteliais pelos quais o líquido e elementos celulares sanguíneos extravasam ao tecido circundante chamado de hemorragia “*per rhexis*”. Nas vênulas, a degradação da MB e as reações inflamatórias fazem com que as uniões intercelulares das células endoteliais sofram um afastamento entre essas células, pelo qual os componentes celulares do sangue extravasam para o tecido, processo chamado como hemorragia “*per diapedesis*”, sendo assim, um processo morfológico diferente da hemorragia “*per rhexis*”. (Gutierrez *et al.*, 2005).

Durante a hemorragia, as hemorraginas não produzem citotoxicidade nas células endoteliais, mas produzem apoptose destas pela degradação de moléculas de adesão celular como as caderinas e integrinas (β e γ), o qual induz desprendimento celular pela interferência de integrinas na superfície celular ocasionando a ativação da integrina $\alpha V\beta 3$; ativação de MMP como a MMP-2 a qual participaria no aumento da degradação da MB. A ação geral das hemorraginas sobre as moléculas de adesão celular das células endoteliais e a membrana basal do capilar é resumida na figura 5 (Gutierrez *et al.*, 2005).

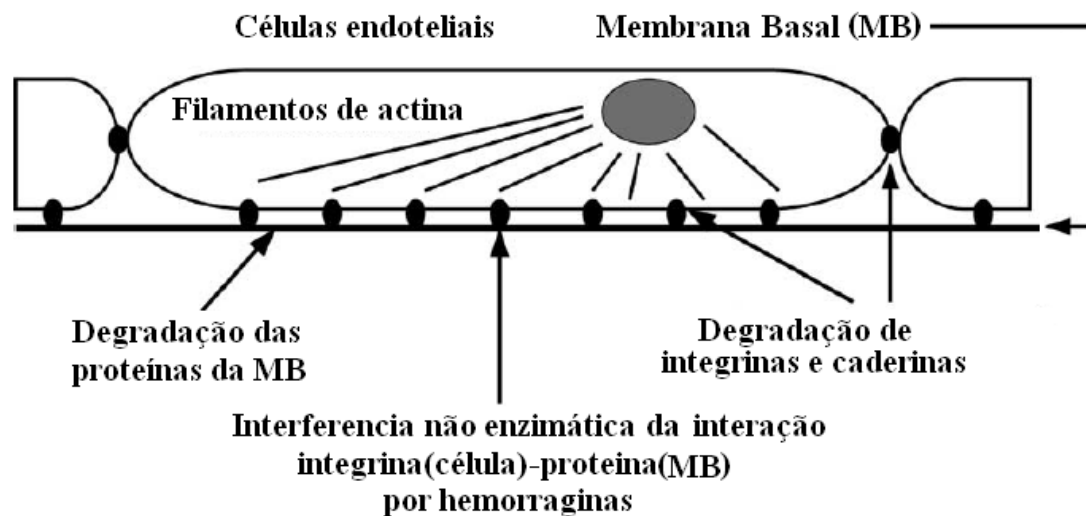


Figura 5. Modelo proposto para a produção da hemorragia. As hemorraginas (metaloproteases zinco dependentes de veneno de serpentes) degradam as proteínas da membrana basal (MB), assim como moléculas de adesão célula-célula (caderinas) e célula-MB (integrinas). As hemorraginas também interferem a interação das integrinas das células endoteliais com as proteínas da MB. Dessa forma as hemorraginas impedem a união entre os filamentos de actina do citoesqueleto das células endoteliais e as proteínas da MB produzindo a permeabilização do capilar além de induzir o processo de apoptose das células endoteliais (Adaptado de Gutierrez *et al.*, 2005).

1.3.4.2. Efeitos na hemostasia sanguínea

As metaloproteases de veneno de serpente também alteram a hemóstase sanguínea (envolve tanto a formação quanto a dissolução do coágulo) produzindo o efeito hemorrágico por alteração da cascata de coagulação. Estas toxinas são descritas como enzimas coagulantes e anticoagulantes; foram descritas metaloproteases que podem ativar fatores da cascata da coagulação como o fator X, fator VII e protrombina sem a presença de co-fatores não enzimáticos do complexo protrombinase. A atividade anticoagulante das metaloproteases de veneno de serpente esta relacionada à sua capacidade de degradar o fibrinogênio (especialmente a cadeia α), o coágulo de fibrina, fatores da cascata de coagulação e também inibem a formação do trombo

plaquetário pela interação com integrinas na superfície das plaquetas (Markland, 1998; Andrews & Berndt, 2000; Gutierrez *et al.*, 2005; Lu *et al.*, 2005; Swenson & Markland, 2005).

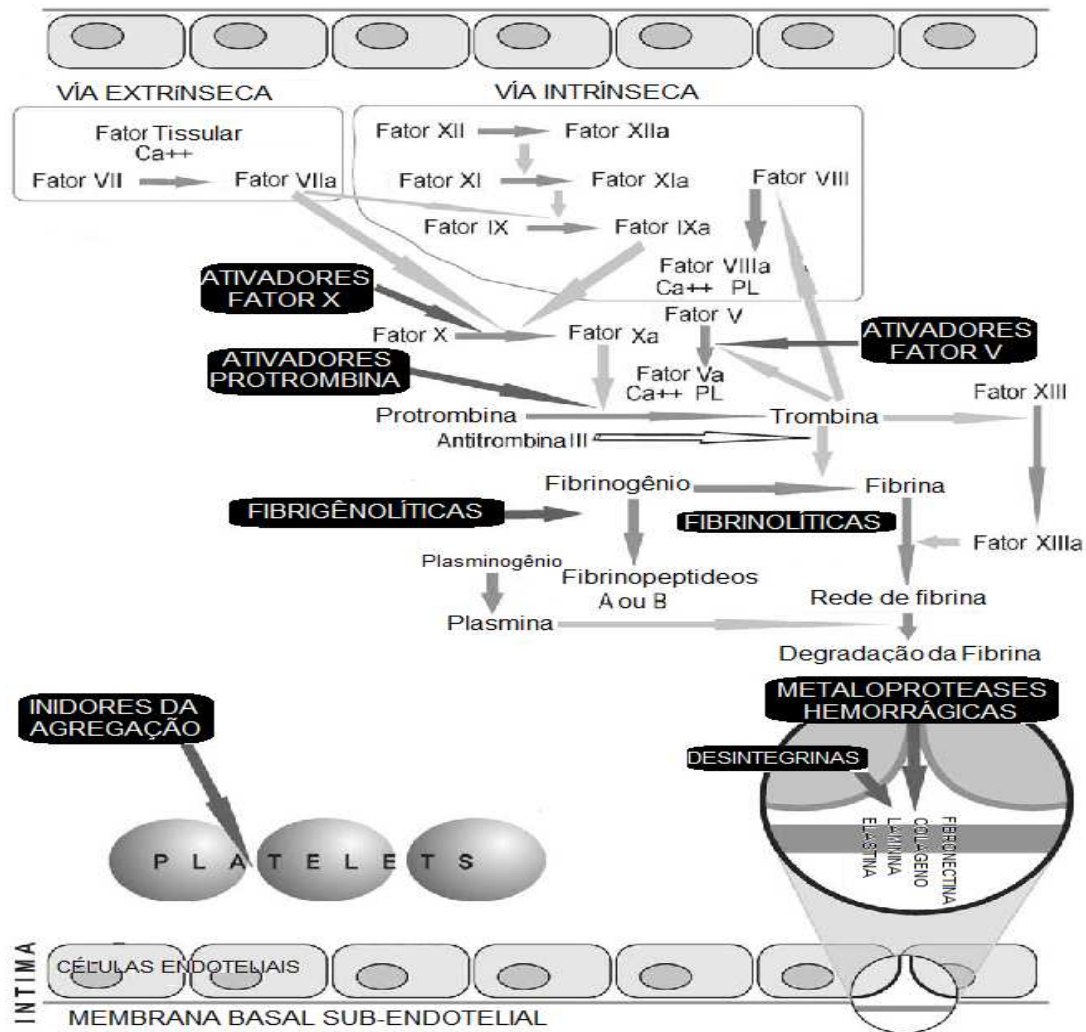


Figura 6. Esquema geral dos efeitos das metalproteases de veneno de serpente sobre a hemostase. Na figura se mostra a ativação das vias intrínseca e extrínseca da coagulação para a formação de fibrina. As principais ações das SVMP são a degradação de fibrinogênio (fibrinogenolíticas) e fibrina (fibrinolíticas), e como inibidores da agregação plaquetária. (Adaptado de White, 2005).

1.3.4.3. Efeitos pro-inflamatórios

Além de induzir hemorragia local e sistêmica as metalproteases de veneno de serpente possuem importante participação no complexo processo de inflamação que é característico do envenenamento por viperídeos. As SVMP induzem edema, bolhas, liberação de citocinas pró-inflamatórias e a estimulação de mastócitos e recrutamento de leucócitos, especialmente polimorfonucleares (Gutierrez & Rucavado, 2000; Texeira *et al.*, 2005).

Gutierrez e colaboradores (1995a) demonstraram pela primeira vez que as SVMP induzem inflamação local. BaP1 é uma SVMP da classe P-I que induziu rapidamente edema quando injetado no coxim plantar de camundongos com doses nas quais não produz hemorragia (Dose Edematogênica Mínima = 1,25 µg). O efeito edematogênico é descrito na literatura para SVMP e acompanhado de hemorragia, dependendo da potência hemorrágica da enzima. As SVMP que possuem atividade edematogênica pertencem principalmente às classes P-I e P-III (Rodriguez *et al.*, 2001; Gay *et al.*, 2005; Mazzi *et al.*, 2004; Gomez *et al.*, 2009; Torres-Huaco *et al.*, 2010).

A formação de edema local está relacionada com a atividade proteolítica, especialmente para SVMP da classe P-I (Rodriguez *et al.*, 2001; Texeira *et al.*, 2005; Torres-Huaco *et al.*, 2010). A formação de edema local pelas SVMP é um processo tempo-dependente apresentando-se na primeira hora após injeção e o efeito máximo é observado entre 1 e 3 horas. Após 3 horas o edema reduz-se até desaparecer após 24 horas (Rodriguez *et al.*, 2001; Gay *et al.*, 2005; Mazzi *et al.*, 2007; Torres-Huaco, *et al.*, 2010). Nos mecanismos pró-inflamatórios das SVMP, estão envolvidos a degradação de proteínas da membrana basal, o que produz o relaxamento da parede vascular, permitindo a extravasamento de plasma, liberação do TNF- α (Fator de Necrose Tumoral α), estimulação de mastócitos e macrófagos os quais liberam Interleucinas (IL), especialmente IL-1, IL-6 e IL-8 (Gutierrez & Rucavado, 2000; Texeira *et al.*, 2005; Fernandes *et al.*, 2006). A indução de liberação de IL é um fenômeno no qual pode ou não estar envolvido a atividade enzimática das SVMP. Esse fenômeno foi observado especialmente em membros da classe P-III, como a jarharagina, já que os domínios desintegrina-símile, rico em cisteína interagem com integrinas específicas da membrana, e assim, liberam IL (Clissa *et al.*, 2001; Texeira *et al.*, 2005).

Além do efeito edematogênico, as SVMP produzem bolhas rapidamente quando injetadas na pele de camundongos, separando a epiderme da derme. Esse efeito está relacionado com a degradação de componentes essenciais da junção epiderme-derme, o alvo provável é a integrina $\alpha_6\beta_4$ que forma parte dos hemidesmosomos, além de, proteínas que fazem parte dos filamentos de ancoragem como a laminina (Gutierrez & Rucavado, 2000).

1.3.4.4. Efeitos miotóxicos e mionecróticos

Necrose muscular é um efeito local importante induzido por muitos venenos de serpente, especialmente os venenos botrópicos. As principais moléculas responsáveis pela ação miotóxica dos venenos botrópicos são fosfolípases A₂ as quais são também nomeadas de miotoxinas

(Gutierrez & Lomonte, 1995a). Além das miotoxinas, diversos autores descreveram que muitas metaloproteases de veneno de serpente quando injetadas intramuscularmente, produzem mionecrose (Gutierrez & Rucavado, 2000; Ramos & Selistre-de-Araujo, 2006). O mecanismo de ação miotóxica das miotoxinas fosfolipásicas é bem conhecido atualmente (Lomonte *et al.*, 2003; Montecucco *et al.*, 2008), pelo contrário, o mecanismo pelo qual as metaloproteases de veneno de serpente produzem mionecrose ainda não foi elucidado (Gutierrez & Rucavado, 2000).

Por enquanto, existem dois mecanismos de miotoxicidade descritos experimentalmente. O primeiro mecanismo relaciona-se com a atividade hemorrágica das metaloproteases, já que a miotoxicidade e mionecrose induzidas por metaloproteases é consequência da isquemia decorrente da hemorragia. O aumento dos níveis plasmático de CK e a observação histológica de necrose são comprovados várias horas após a inoculação, além disso, o aumento de ácido láctico no músculo indicam que o processo de dano celular é devido à isquemia. A análise histológica demonstrou que as áreas necróticas foram encontradas em regiões com abundante hemorragia. E a análise ultra-estrutural das células musculares mostraram características típicas descritas em modelos experimentais de isquemia em células musculares. (Karpati *et al.*, 1974; Gutierrez & Rucavado, 2000). As metaloproteases BaP1 (P-I, *B. asper*), BaH1 (P-III, *B. asper*) e Baltegin (P-III, *B. alternatus*) são exemplos de metaloproteases que produzem miotoxicidade e mionecrose pelo mecanismo descrito acima (Gutierrez *et al.*, 1995a; Gutierrez *et al.*, 1995c; Gay *et al.*, 2005).

No segundo mecanismo observado, a miotoxicidade é produzida rapidamente e não está relacionada à hemorragia. Contudo, ainda não se sabe se este mecanismo de miotoxicidade é devido a efeitos citotóxicos diretos ou resultado de processos inflamatórios. LHF-II (P-I, *L. muta muta*) e Bilitoxina (P-III, *A. bilineatus*) produziram efeitos miotóxicos rapidamente após injeção no músculo gastrocnêmio de camundongos. Além disso, a Neuwidase é uma metaloprotease da classe P-I (*B. neuwidii*) não hemorrágica, é capaz de induzir miotoxicidade em altas doses (Ownby *et al.*, 1990; Rucavado *et al.*, 1999; Rodriguez *et al.*, 2001).

1.4. *Bothriopsis taeniata*

Bothriopsis taeniata (Wagler, 1824; Viperidae: Crotalinae) é uma espécie de serpente venenosa encontrada nos bosques chuvosos da América do Sul. Os adultos têm comprimento inferior 100 cm, mas há citação de indivíduos com 150 cm de comprimento. O corpo é delgado com uma cauda prênscil. Apresentam o padrão de cor complexo, variando de cinzento-azulado até amarelo-esverdeado. Nas serpentes jovens a variação da cor é ontogenética até alcançar a maturidade. Esta espécie se diferencia das outras do gênero pela presença de escamas subcaudais

simples e linhas compostas por manchas brancas no encontro das escamas ventral e dorsal (Campbell & Lamar, 2004). A espécie *Bothriopsis taeniata* encontra-se amplamente distribuída pelos bosques equatoriais chuvosos do Equador, Colômbia, Venezuela, Guiana, Suriname, Guiana Francesa, Brasil, Perú e Bolívia (McDiarmid *et al.*, 1999), nas zonas de terras baixas e no sopé. Usualmente é encontrada em vegetações baixas em bosques primários e nas bordas dos bosques (Campbell & Lamar, 2004).

Porto e Cols. (2007) estudaram os efeitos biológicos do veneno total de *Bothriopsis taeniata*. Os autores reportam que o veneno dessa serpente produz inflamação significativa na cavidade peritoneal de camundongos, caracterizada pelo recrutamento de neutrófilos 4 horas após a inoculação da dose de 1 µg/animal ou superiores do veneno. A inflamação produzida foi acompanhada de hemorragia significativa com doses acima de 5 µg/animal, ainda que os autores não reportam a dose hemorrágica mínima para esse veneno. Os dois efeitos biológicos observados estão relacionados a atividade de metaloproteases na composição desse veneno, pois foram inibidos completamente quando o veneno foi pre-incubado com o quelante EDTA. O efeito pro-inflamatório induzido pelo veneno de *B. taeniata* é produzido principalmente pela ativação da via da lipooxigenase, devido a que essa atividade é inibida pela dexametasona e zileutone (inibidor da 5-lipoxigenase) conhecidos inibidores da via da lipoxigenase (Porto *et al.*, 2008).

Recentemente foi reportado o primeiro caso de acidente por *Bothriopsis taeniata* no Brasil (Torrez *et al.*, 2010). A vítima foi um trabalhador rural com 43 anos de idade, que foi picado pouco acima do calcanhar direito, em novembro de 2007. O trabalhador não aplicou torniquete ou tentou sugar o veneno do ferimento. De acordo com os registros do hospital da cidade de Santarém-PA o paciente já fora picado por outra serpente do gênero *Bothrops*. O paciente foi admitido no pronto-socorro do hospital de Santarém, duas horas e meia após o acidente. O local da picada apresentou hemorragia moderada, ainda que, desenvolveu inchaço na perna, abaixo do joelho. O paciente estava consciente, em boa condição e os sinais vitais normais, mas os ensaios bioquímicos mostraram significativa miotoxicidade e resposta inflamatória (Torrez *et al.*, 2010).

1.5.- Justificativa

Os envenenamentos por viperídeos na América Latina caracterizam-se por uma fisiopatologia complexa, que inclui efeitos locais (neurotoxicidade, mionecrose, dermonecrose, hemorragia, edema e dor) e, em casos moderados e severos, alterações sistêmicas como coagulopatias, sangria, choque cardiovascular e insuficiência renal aguda (Gutierrez, 2000). No

Brasil, os acidentes botrópicos são os de maior importância epidemiológica, pois são responsáveis por cerca de 73,5% dos envenenamentos dos 26905 casos reportados durante o ano de 2008 (Ministério de Saúde, 2008).

O papel das metaloproteases da classe P-I nos efeitos local e sistêmico produzidos pelo envenenamento ofídico é tradicionalmente tomado como irrelevante, devido a sua baixa atividade hemorrágica, quando comparada com SVMP da classe P-III, e consideradas como proteases não tóxicas (Rodriguez *et al.*, 2001). Até hoje a caracterização de metaloproteases da classe P-I contradiz essa hipótese, mostrando que essas proteínas exercem um papel relevante na patologia local e sistêmica durante o envenenamento ofídico.

A pesquisa da literatura disponível sugere que as SVMP P-I prolongam o efeito hemorrágico, produzido pelas SVMP P-III, ao tornarem o sangue incoagulável. Os mecanismos envolvidos nesse efeito estariam relacionados com a ativação ou degradação dos fatores de coagulação (Swenson & Markland, 2005; White, 2005). Ao mesmo tempo, muitas das SVMP P-I produzem hemorragia em doses as quais permitiriam contribuir diretamente com o efeito hemorrágico produzido pelos venenos ofídicos. Estudos preliminares mostraram que o veneno de *Bothriopsis taeniata* possui uma potente atividade hemorrágica, assim como potente atividade pró-inflamatória e distúrbios na hemostasia sanguínea os quais seriam induzidos principalmente por metaloproteases (Porto *et al.*, 2007; Torrez *et al.*, 2010).

Até a presente data, não existem trabalhos relacionados com o isolamento e a caracterização estrutural e funcional de metaloproteases a partir do veneno de *B. Taeniata*, motivo pelo qual a presente pesquisa é inédita. O presente estudo justifica-se não só por ser a primeira descrição de uma nova metaloprotease não descrita na literatura, mas também pela necessidade de nova informação da relação da estrutura e função desta proteína, o que permite validar as hipóteses recentes sobre os mecanismos pelos quais as metaloproteases de venenos de serpentes produzem os efeitos biológicos atribuídos a esta família de proteínas.

O Laboratório de Química de Proteínas da Unicamp (LAQUIP) possui um parque tecnológico instalado, desenvolvendo ao longo do tempo uma linha de pesquisa sobre toxinas protéicas, com vários trabalhos publicados e teses defendidas. O presente estudo visou o aprofundamento dos conhecimentos sobre proteínas, aprender a padronizar técnicas específicas utilizadas na caracterização estrutural, funcional e biológica de macromoléculas.

II.- OBJETIVOS

2.1. Gerais:

Caracterizar metaloproteases de baixa massa molecular (Classe P-I), tanto bioquímica quanto biologicamente para melhor detalhá-las e conhecê-las buscando assim entender a relação estrutura-função e aumentar o conhecimento sobre o papel que desenvolvem durante o envenenamento ofídico.

2.2. Específicos:

2.2.1) Isolamento e purificação da nova metaloprotease da classe P-I (BtaHF) proveniente do veneno de *Bothriopsis taeniata* através da combinação de cromatografia convencional e de alta eficiência (CLAE).

2.2.2) Caracterizar físico-quimicamente a BtaHF purificada através de eletroforese de poliacrilamida (SDS-PAGE), composição de aminoácidos (Analisador de aminoácidos Pico-Tag) e espectrometria de massas ESI-QTOF-MS/MS.

2.2.3) Caracterização enzimática da metaloprotease BtaHF através do estudo dos parâmetros cinéticos e estudos dos efeitos de inibidores e íons usando azocaseína como substrato, assim como sua atividade em outros substratos como fibrinogênio, fibrina e BA_pNA.

2.2.4) Caracterização dos efeitos locais induzidos pela metaloprotease BtaHF por meio do estudo da atividade hemorrágica, edematogênica e miotóxica, assim como a análise histológica dos efeitos locais.

2.2.5) Avaliar a atividade citotóxica da metaloprotease BtaHF em modelo de células da musculatura esquelética mioblastos C2C12.

2.2.6) Avaliar histologicamente os efeitos sistêmicos induzidos pela metaloprotease BaHF em pulmão, rim e fígado de camundongo, bem como os efeitos sobre a coagulação sanguínea por meio de análises *in vitro* dos índices de coagulação Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada (APPT) e Tempo de Protrombina (PT).

III.- MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Veneno e animais de experimentação

O veneno total de *Bothriopsis taeniata* foi uma doação do Prof. Dr. Ronald Navarro Ojeda da Universidad Nacional de San Agustín (Arequipa-Perú). Foram utilizados camundongos SWISS machos (20 ± 2 g). Os protocolos experimentais envolvendo animais estão de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pela sociedade brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL), protocolo 1836-1.

3.2. Reativos

Todos os solventes, produtos químicos e reagentes utilizados foram de grau HPLC, grau sequência ou de alto grau de pureza, obtidos da Sigma-Aldrich Chemicals, Merk e Bio Rad. A determinação dos níveis de CK plasmático foi feita com o kit CK-NAC (LABORLAB, Brasil). Para a determinação do APTT, PT e dos níveis plasmáticos de fibrinogênio foi utilizado o kit CLOT (CLOT, Brasil) e Wiener-LAB (Wiener, Argentina). Para a dosagem do LDH de culturas celulares foi usado o kit Kit LDH-P UV (Wiener, Argentina).

3.3. Purificação da metaloprotease BtaHF a partir do veneno total de *Bothriopsis taeniata*

3.3.1. Cromatografia convencional de exclusão molecular

O veneno bruto (20 mg) de *Bothriopsis taeniata* foi homogeneizado em tampão bicarbonato de amônio 1M pH 7,9 e centrifugado a $12\ 054 \times g$ (Microfuge® Lite Centrifuge, Beckman) por 5 minutos para a clarificação da solução. O sobrenadante foi aplicado a uma coluna Sephadex G75 (Kontex Flex Column 78 X 2cm), equilibrada com tampão bicarbonato de amônio 0,25M pH 7,9. Sob um fluxo de 0,3 ml/min frações de 15 min foram coletadas por um coletor automático (Coletor Automatic RediFrac, Pharmacia Biotech). O perfil de eluição foi monitorado a 280 nm utilizando um Espectrofotômetro modelo 700Plus (FEMTO, Brasil). As frações formadas pelos tubos que se encontraram na convergência da ascendência e descendência de cada pico. Cada uma das frações foi submetida à determinação da atividade proteolítica sobre o substrato azocaseína (método descrito no item 3.4), determinação da dependência da atividade proteolítica de íons metálicos pela pré-incubação de uma amostra de cada fração com o agente quelante EDTA (método descrito no item 3.5.3) e a determinação da atividade hemorrágica

(método descrito no item 3.10.1). As frações coletadas foram liofilizadas e armazenadas a -20°C para continuar com o processo de purificação.

3.3.2 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) de troca iônica

A fração com atividade caseinolítica e hemorrágica do passo cromatográfico anterior foi submetida a cromatografia em coluna DEAE 8HR AP-Minicolumn (5 X 50 mm) (Waters), acoplado a um sistema de CLAE. O sistema cromatográfico foi previamente equilibrado com AMBIC 0,05M pH 8,0. Inicialmente a eluição das amostras foi realizada através de um gradiente linear com AMBIC (0,05 - 1M, Tampão B). A corrida cromatográfica foi monitorada a 280nm. Cada uma das frações foi submetida à determinação da atividade proteolítica, inibição por EDTA (5 mM) e PMSF (2 mM) e atividade hemorrágica como foi descrito no item anterior. As frações foram formadas pelos tubos que se encontraram na convergência da ascendência e descendência de cada pico. As frações coletadas foram liofilizadas e armazenadas a -20°C para continuar com os estudos de estrutura e função.

3.3.3. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência de Fase Reversa

Para o monitoramento do grau de pureza da metaloprotease purificada pelos passos cromatográficos anteriores, 500 μg da fração proveniente da coluna de troca iônica que apresentou atividade biológica foi submetida a cromatografia em coluna C5 Discovery® Bio Wide Pore (25 cm x 4,6 mm x 10 μm) (Sigma, USA). O sistema cromatográfico foi previamente equilibrado com ácido trifluoroacético 0,1%, pH 3,5 (Tampão A). A eluição da amostra foi realizada através de um gradiente linear de acetonitrila 66% (Tampão B), monitorada em comprimento de onda de 280 nm.

3.4. Eletroforese em SDS-PAGE

Uma eletroforese em gel de poliacrilamida foi realizada de acordo com Laemmli (1970) e realizada em um sistema High Small II 250 (Hoefel Scientific). Os géis de poliacrilamida foram preparados de modo descontínuo, apresentando um gel de concentração de 5% e gel de corrida de 12,5% preparados a partir de uma solução de acrilamida estoque a 30% e N,N, metileno-bisacrilamida a 0,8% (Bio Rad Labs. Richmond, CA, USA). As amostras (frações purificadas) e

marcadores foram dissolvidos em tampão de amostra Tris-HCl 0,075 M, pH 6,8, 10% de Glicerol, 4% de SDS, 0,001% de azul de Bromofenol. As massas moleculares (BioRad) dos marcadores (em Kda) são: fosfolipase B – 94, albumina – 67, ovalbumina – 43, anidrase carbônica – 30, inibidor de tripsina de soja – 20 e lisozima – 14. A corrida foi realizada utilizando-se uma amperagem constante de 40 mA durante 90 minutos. Após a corrida eletroforética o gel foi corado com Comassie blue R-250. O gel foi embebido em solução corante por 12 horas. Em seguida, o gel foi lavado com solução descolorante (ácido acético).

3.5. Determinação quantitativa de proteínas

A dosagem da concentração de proteínas presentes no veneno total, frações do primeiro passo cromatográfico e da metaloprotease BtaHF, foi realizada através do método de Bradford (1976), baseado na mudança de cor do corante azul brilhante de Coomassie G-250 em resposta a diferentes concentrações de proteína, existindo em duas formas diferentes de cores, vermelho e azul. A cor vermelha é convertida para azul após ligação do corante com a proteína. O complexo proteína-corante possui alto coeficiente de extinção, conduzindo para uma grande sensibilidade da medida de proteína. Para determinação da curva padrão, utilizou-se albumina de soro bovino (Sigma-Aldrich) como proteína padrão, modelo que serviu como parâmetro para os resultados obtidos das amostras de *Bothriopsis taeniata*. A análise das amostras foi feita no comprimento de onda de 595 nm num leitor de microplacas (VERSA Max microplate reader, Molecular Devices, Sunnyvale, CA).

3.6. Atividade caseinolítica

A atividade caseinolítica foi determinada colorimetricamente sobre o substrato azocaseína, segundo o método de Wang & Huang (2002). Um volume de 90µL de solução azocaseína (5mg/mL), preparada em tampão Tris-HCl pH 8,0, foi misturada com 10µL (1ug/µL) de veneno total, fração ou metaloprotease, e incubadas por 90 minutos no banho-maria modelo 31681 (ÉTICA Equipamentos S.A. Brasil) a 37 °C. A reação foi interrompida pela adição de 200µL de ácido tricloroacético (5%). Em seguida, as amostras foram submetidas à centrifugação 4565xg durante 4 minutos. Um volume de 150µL do sobrenadante foi misturado com 150µL de NaOH (0,5M) e a atividade proteolítica monitorada pela determinação dos azo-peptídeos produzidos pela atividade catalítica das proteases sobre a azocaseína numa absorvância de 440nm

usando um leitor de microplacas VERSAMAX microplate reader. Uma unidade de atividade proteolítica foi definida como a quantidade de enzima, em μg , que hidrolisa $1\mu\text{g}$ de azocaseína por minuto a pH 8,0 e 37°C (Chowdhury *et al.*, 1990). Os experimentos foram realizados em triplicata.

3.7. Cinética Enzimática

3.7.1. Efeito da temperatura na atividade caseinolítica

O experimento para a observação do efeito da temperatura sobre a atividade caseinolítica da metaloprotease purificada foi realizado segundo o método descrito no item 3.6. A temperatura de incubação foi variada num intervalo de $10\text{-}90^\circ\text{C}$ em um banho-maria modelo 31681 (ÉTICA Equipamentos S.A. Brasil) e para cada temperatura foi feito um controle. Os experimentos foram realizados em triplicata.

3.7.2. Efeito do pH na atividade caseinolítica

O experimento do efeito do pH sobre a atividade metaloprotease, foi realizado em tampões preparados com diferentes valores de pH (5,0-12,0), sendo que a determinação da atividade metaloprotease e a concentração da enzima foram idênticas ao usado na seção 3.6 e para cada pH foi feito um controle. Os tampões utilizados nesse experimento foram: tampão citrato de sódio-HCl pHs 4,5; 5,0 e 5,5, tampão fosfato-NaCl pHs 6,0; 6,5; 7,0 e 7,5, tampão Tris-HCl pHs 8,0; 8,5 e tampão glicina-NaOH pHs 9,0; 9,5 e 10,0 respectivamente.

3.7.3. Efeito de Inibidores

Os ensaios de inibição foram feitos com azocaseína como substrato, segundo a metodologia descrita na seção 3.6 sob as condições de temperatura e pH ótimos. As frações ou metaloprotease purificada e os agentes quelantes EDTA (5 mM), EGTA (5 mM), o agente redutor DTT (5mM) e os inibidores de serino proteases PMSF (2 mM) e SBT-1 (1mg/mL), foram pré-incubados por 15 minutos a 37°C antes de acrescentar à mistura de reação. A atividade proteolítica residual foi calculada como atividade percentual em relação à preparação controle (frações ou metaloprotease sem inibidores), a qual foi considerada como 100% de atividade. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

3.6.4 Efeito de Íons

Os ensaios do efeito de íons foram feitos com azocaseína como substrato, segundo a metodologia descrita na seção 3.6 sob as condições de temperatura e pH ótimos para as metaloproteases purificadas. A metaloprotease purificada e os íons divalentes Ca^{+2} (1 e 5mM) Mg^{+2} , Zn^{+2} e Mn^{+2} (5mM respectivamente), diluído em tampão de trabalho, foram pré-incubados por 15 minutos a 37°C antes de acrescentar à mistura de reação. A atividade proteolítica residual foi calculada como atividade percentual em relação à preparação controle (metaloprotease sem inibidores), a qual foi considerada o 100% de atividade. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

3.8. Atividade fibrinogênolítica

A atividade proteolítica sobre o fibrinogênio (atividade fibrinogênolítica) foi determinada pelo método descrito por Cominetti (2007). Brevemente, 200 μL de uma solução de fibrinogênio bovino (0,1% m/v, tampão Tris-HCl 10mM, NaCl 100mM, pH 7.4) foi misturada com 20 μL da metaloprotease purificada (1,25- 20 μg) e incubada a diferentes intervalos de tempo (5, 15 e 30 minutos; 1, 3, 6, 12 e 24 horas). Depois foi adicionado 200 μL de solução desnaturante (Tris-HCl 0,05M pH 6,5; Urea 10M; β -mercaptoetanol 10% (v/v), glicerol 10% (v/v), azul de bromofenol 0,05% (v/v)) e deixada à temperatura ambiente por 24 horas. As amostras foram analisadas por meio de Gel SDS-PAGE segundo descrito no item 3.4.

3.9. Atividade fibrinolítica

Sangue bovino citratado foi diluído 1:2 com tampão Tris 50 mM; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 70 mM; NaCl 90 mM; CaCl_2 1,7 mM; MgCl_2 0,70 mM pH 7.5. Um volume de 22ml da solução foi transferida para recipientes de plásticos (13 x 8 cm) e 3,0 ml de CaCl_2 0,25 M adicionado para produzir a coagulação. A mistura foi incubada a 37° C por 60 minutos e logo foram feitas perfurações de 2 mm no coágulo e foram adicionados 10 μl de soluciones de BtaHF (2,5; 5; 10 e 20 $\mu\text{g}/10\mu\text{L}$) ou veneno total de *Bothrops jararacussu* (5 μg , controle positivo) em cada perfuração. Logo foram incubadas a 37 °C durante 18 horas. Após o tempo de incubação foram medidos o diâmetro do halo de fibrinólise produzida pelas diferentes diluições da metaloprotease

e do veneno. A concentração fibrinolítica mínima (CFM) é a concentração de toxina ou veneno (mg/ml) que produz um halo de fibrinólises de 12 mm de diâmetro (Gené *et al.*, 1989).

3.10. Atividade arginina amidase

O substrato cromogênico N α -Benzoil-DL-Arginina (BA ρ NA) foi utilizado para a dosagem da amostra. Este substrato tem sido empregado para avaliar a atividade amidásica de enzimas proteolíticas tais como: tripsina, quimiotripsina, fator Xa, calicreína plasmática humana, trombina e plasmina humana. Os substratos derivados do cromóforo ρ -nitroanilida são amplamente utilizados principalmente pela alta sensibilidade fotométrica na absorvância de 405 nm, o método utilizado é segundo Erlanger *et al.* (1961), com algumas modificações.

Foi preparada uma solução estoque do substrato BA ρ NA (0,1M) em DMSO, logo foi preparada a solução de trabalho do substrato diluindo a solução de estoque em tampão Tris-HCl, 10 mM, 10 mM CaCl₂, 100 mM NaCl, pH 8,0 (tampão de trabalho, 1:100). Em microplacas de 96 poços foram misturados 200 μ L da solução de trabalho, 50 μ L de tampão de trabalho e 15 μ L de água destilada e pre-incubados a 37 °C por 10 minutos. Logo foram adicionados 5 μ L de amostra ou tampão de trabalho, em um volume final de 270 μ L, a mistura de reação foi incubada a 37°C por 30 minutos e as absorbâncias lidas em um comprimento de onda de 410 nm em leitor de microplacas VERSAMAX. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

3.11. Análises Estruturais

3.11.1. Determinação da massa molecular da BtaHF por Espectrometria de Massas (ESI-Q-Tof)

Análises ESI-CID-MS/MS foram executadas usando um espectrômetro de massa híbrido tempo de voo-quadrupolo (Q-TOF Ultima de Micromass, Manchester, UK) equipado com uma fonte nano Zspray operando em modo íon positivo. As condições de ionização de uso incluído uma voltagem capilar de 2,3 kV, um cone voltagem e lente de 30 V e 100 V, respetivamente, e a energia de colisão de 10 eV. A temperatura da fonte foi 70°C e o cone de gás foi N₂ em um fluxo de 80l/h; gás nebulizando não foi utilizado para obter o spray. Argônio foi usado para esfriamento colisional e para fragmentação de íons na cela de colisão. Calibração externa com iodeto de sódio foi feita sobre uma gama de massa desde 50 até 3000 m/z. Todos os espectros foram adquiridos

com o analisador Tof em “V mode” (Tof kV = 9.1) e a voltagem MCP fixado em 2150 V (Damico *et al.*, 2005).

3.11.2. Análise de composição de aminoácidos

A análise de composição de aminoácidos da metaloprotease BtaHF foi feita usando o analisador “Pico-Tag” da Waters, onde a identificação dos aminoácidos foi feita através da cromatografia em HPLC do produto feniltiocarbamil do aminoácido, proveniente da derivatização com feniltiocianato dos aminoácidos obtidos de hidrólise ácida. Estas formas de cromóforos podem ser detectadas em concentrações de 1,0 pmol (Henrikson & Meredith 1984). A análise dos aminoácidos PITC foi realizada em HPLC, usando coluna C18 μ -Bondapak (3,9 mm X 15 cm) em cromatografia de fase reversa com um gradiente linear de 0 a 100% de acetonitrila 60% por 21 min. A identificação de cada aminoácido foi feita em relação a um corrido padrão de aminoácidos PITC (Bidleingmeyer *et al.*, 1984).

Para estimativa da composição global, a análise de composição de aminoácidos foi realizada de acordo com método descrito por Ponce-Soto *et al.*, (2007).

3.11.3. Determinação de peptídeos internos

Redução e Carboximetilação: A BtaHF pura foi dissolvida em 6M guanidina/HCl, 0,4 M Tris pH 8.15, 2mM EDTA, reduzida com dithiothreitol (DTT) e carboximetilada com 14C-ácido iodo acético. A dessalinização da amostra foi realizada em coluna G-25, previamente equilibrada com ácido acético glacial 1M.

Digestão enzimática e purificação dos fragmentos peptídicos: A BtaHF, reduzida e carboximetilada, foi inicialmente digerida com Tripsina, por 16h a 37°C com uma razão enzima substrato de 1:50. Após interromper a reação a amostra foi liofilizada. A toxina digerida com tripsina foi repurificada em HPLC de fase reversa (Water PDA 991 System), utilizando-se uma coluna μ -Bondapak C-18. A separação dos peptídeos trípticos foi feita com um gradiente de Acetonitrila em 0.1% de ácido trifluoracético.

3.11.4. Estudo de homologia sequencial

Para a sequência interna da BtaHF, foi determinada sua homologia sequencial com outras metaloproteases de venenos de serpente de sequências conhecidas usando os algoritmos:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>

<http://ca.expasy.org/>

3.12. Caracterização Biológica

3.12.1. Atividade hemorrágica (Método de pele)

Foi preparada uma solução estoque da BtaHF (1 mg/ml) em tampão PBS (0,12M NaCl, 0,04 M fosfato de sódio, pH 7,2) a partir da qual foram preparadas doses de 5; 25; 50; 100 e 200 µg/ml. Essas soluções foram inoculadas via intradérmica (0,1ml) em camundongos de 18 a 20g de peso (n = 5). Depois de 2h de aplicação, os camundongos foram sacrificados por inalação com CO₂ e a pele das costas foi retirada cuidadosamente e foram medidos os diâmetros dos halos hemorrágicos formados. A Dose Hemorrágica Mínima (DHM) é definida pela quantidade mínima de toxina capaz de induzir um halo hemorrágico com um diâmetro de 10 mm (Gutierrez *et al.*, 1985). A DHM foi determinada utilizando o método de Regressão e Correlação, das médias obtidas dos diâmetros hemorrágicos das 5 repetições para cada dose. Os resultados foram expressos em milímetros.

Para determinar a relação da atividade hemorrágica com a atividade proteolítica da BtaHF, 40 µg da metaloprotease (duas DHM) foram pre-incubadas com inibidores como foi descrito no item 3.5.3, depois foi realizado o experimento segundo o descrito acima. A atividade hemorrágica residual foi calculada como atividade percentual em relação à preparação controle (metaloprotease sem inibidores), a qual foi considerada o 100% de atividade. Todos os experimentos foram realizados com 5 replicatas.

3.12.2. Formação de Edema

A avaliação da formação de edema foi feita em grupos de 5 camundongos (18-20g.) foram feitas injeções da metaloprotease, dissolvido em 50 µl de PBS (0.12M NaCl, 0.04M fosfato de sódio, pH 7.2), no coxim plantar na pata direita; na pata esquerda inoculou-se 50µl de PBS como controle. Depois de determinados intervalos de tempo (30 min, 1h, 3h, 6h e 24h) após da injeção, a formação de edema foi avaliada pelo aumento do diâmetro da pata direta, medida

com um Comparador Externo com Relógio Serie 5400 (Metroltec, SP-Brazil). A formação de edema foi expressada como a percentagem a mais do diâmetro da pata direita em relação á pata esquerda. A dose mínima para a formação de edema (MED) definiu-se como a quantidade de toxina que induz 30% de formação de edema.

Para determinar a relação da atividade edematogênica com a atividade proteolítica da BtaHF, 10µg da metaloprotease foi pré-incubada com inibidores como foi descrito no item 3.5.3, depois foi realizado o experimento segundo o descrito acima. A atividade edematogênica residual foi calculada como atividade percentual em relação à preparação controle (metaloprotease sem inibidores), a qual foi considerada o 100% de atividade. Todos os experimentos foram realizados com 5 replicatas.

3.12.3. Determinação dos níveis de CK plasmáticos em camundongos inoculados por via intramuscular (miotoxicidade local)

Para a determinação da atividade miotóxica local, grupos de 5 camundongos (18 a 20g) receberam injeções intramuscular (músculo gastrocnêmio) de veneno total de *Bothriopsis taeniata* (5µg) ou de metaloprotease BtaHF (20 e 30µg) dissolvidas em 50µl de tampão PBS, o grupo controle recebeu apenas PBS.

Após aplicação da toxina, em diferentes intervalos de tempo (1, 3, 6 e 9h) amostras de sangue foram coletadas, da cauda de camundongos, em tubos capilares heparinizados. O plasma foi obtido após centrifugação dos capilares numa centrífuga para hematócrito durante 5min. Depois foram determinados os níveis plasmáticos de creatina kinase (CK) utilizando o kit CK–NAC Método Cinético-UV (LABORLAB). Um volume de 200µl do substrato reconstituído foi pré-incubado por 4 minutos a 37°C, logo foram acrescentados 4µl de plasma obtido. A mistura foi incubada por 6 minutos registrando as leituras de absorbância dos minutos 3, 4, 5 e 6. Determina-se a diferença média de absorbância por minuto ($\Delta A/\text{min}$), subtraindo cada leitura da anterior e calculando a média dos valores. A média foi multiplicada pelo fator 8095. As leituras foram feitas em leitor de microplacas VERSA Max microplate reader, no comprimento de onda de 340 nm. A atividade foi expressa em U/L, definida como a fosforilação de 1mmol de creatina/min a 25°C.

3.12.4. Análise histológica dos efeitos locais e sistêmicos da metaloprotease BtaHF

Para realizar os estudos dos efeitos locais da BtaHF, diferentes quantidades da metaloprotease (2,5; 10 e 20 μ g) foram dissolvidos em 50 μ L de PBS e injetados no músculo gastrocnêmio de camundongos Swiss (18-20g, n= 4), os animais controle foram injetados com 50 μ L de PBS. Duas horas após a injeção, os animais foram sacrificados por aprofundamento da anestesia inalatória halogenada, isoflurano (Forane®, do laboratório Abbott). Os músculos gastrocnêmio foram cuidadosamente retirados por meio de equipamentos cirúrgicos.

Concluído o tempo de tratamento, os músculos foram fixados em tampão formaldeído 10% durante pelo menos 48 h. Para processar o material, utilizou-se a técnica histológica clássica para inclusão em blocos com parafina (Michalany, 1980) e cortados em micrótomo do tipo Minot em 5 μ m e coradas com Hematoxilina e Eosina e ácido periódico de Schiff. As observações morfológicas foram feitas com microscópio Olympus BX41.

A análise digital das imagens foi feita usando o sistema Image ProPlus 4.1.0.1® (Media Cybernetics, Silver Spring, MA, USA), conectado em computador. As imagens foram geradas por máquina fotográfica vídeo Sony ExwaveHAD, conectado a um microscópio Olympus CH2 com fonte de energia estabilizada. Utilizaram-se lentes com objetivas planocromáticas de 4x, 10x e 40x de aumento.

O microscópio foi calibrado de fábrica para alcançar uma iluminação de tipo Koehler; uma imagem de um campo vazio foi usada para medir a iluminação. As imagens foram armazenadas em formato TIF, com uma resolução de 640x480 pixel de tamanho e 32 bits de cor.

Para estudar os efeitos sistêmicos da BtaHF, 20 μ g da enzima foram dissolvidas em PBS e injetadas via endovenosa, pela veia caudal de camundongos Swiss (18-20g, n= 2). Nos camundongos controle injetou-se 50 μ L de PBS. Duas horas após a injeção, os animais foram sacrificados por aprofundamento da anestesia inalatória halogenada, isoflurano (Forane®, do laboratório Abbott). Pulmões, rins e fígado foram cuidadosamente retirados por meio de equipamentos cirúrgicos. O tratamento dos tecidos para a análise histológica foi feita como é descrito acima.

A análise histopatológica e fotografias foram realizadas no laboratório do Departamento de Farmacologia da Escola de Ciências Veterinárias da Universidade do Nordeste, UNNE, na cidade de Corrientes, Argentina.

3.12.5. Efeito de BtaHF sobre o fibrinogênio plasmático

O teste *in vivo* foi realizado com 6 grupos de camundongos tratados e um grupo controle. Cada grupo foi formado por 5 camundongos machos com um peso de 18-22g. Os camundongos receberam por via intravenosa o BtaHF (5 e 20 μ g) dissolvidos em PBS, para o grupo controle foi injetado PBS. Os grupos foram: Grupo 1: 5 minutos; Grupo 2: 15 minutos; Grupo 3: 30 minutos; Grupo 4: 60 minutos e Grupo 5: 120 minutos.

Após o tempo de exposição, os animais foram anestesiados com hidrato de cloral (300mg/kg de peso corporal) e 1ml de sangue foi coletado por meio da veia cava. O sangue obtido foi misturado com citrato de sódio (0,129M) numa proporção de 9:1 e plasma pobre em plaquetas foi obtido por centrifugação (2500 x g por 5 minutos) em temperatura ambiente.

O fibrinogênio plasmático foi determinado usando o kit de diagnóstico de Fibrinogênio (Wiener-LAB. Argentina) baseado no método de Clauss. Quando um excesso de trombina é adicionado a plasma diluído, o tempo de coagulação é inversamente proporcional à concentração de fibrinogênio plasmático.

A determinação da curva de calibração foi feita com as diluições 1:10, 1:15, 1:20, 1:30, do Calibrador reconstituído (plasma liofilizado) com uma solução de imidazol 0,05M, pH 7,3 (Tampão B). A diluição de 1:10 representa o 100% indicado no kit. As amostras de plasma dos animais controle, tanto quanto dos tratados, foram diluídos 1:10 com tampão B antes de realizar a determinação. Para a determinação do tempo de coagulação foram pré-aquecidos 200 μ L, das diluições da curva de calibração ou amostras, a 37°C por 2 minutos. Depois foram adicionados 100 μ L de Trombina (100 NIH/mL, Wiener) e os tempos de coagulação determinados em um coagulômetro Fibrintimer 2-type Coa DATA 2001 (Wiener Lab, Germany).

A inoculação em camundongos e a obtenção de plasma foram realizados no laboratório do Departamento de Farmacologia da Escola de Ciências Veterinárias da Universidade do Nordeste, UNNE, na cidade de Corrientes, Argentina. A determinação do nível de fibrinogênio plasmático foi realizada na Faculdade de Ciências Exatas, Naturais e de Agrimensura (Departamento de Bioquímica) da Universidade Nacional do Nordeste, UNNE, Cidade de Corrientes, Argentina.

3.12.6. Efeito de BtaHF *in vitro* sobre os índices de coagulação Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada (APPT) e Tempo de Protrombina (PT)

Camundongos de 25g foram anestesiados (xylazina, 2% - 16mg/Kg; ketamina 10% - 100mg/Kg), o sangue foi coletado por punção cardíaca e misturado suavemente com Citrato de

Sodio (3,2%; 9:1 v/v). O sangue foi centrifugado a 642 x g por 15 minutos a 25°C para obter plasma pobre em plaquetas.

Cinquenta microlitros de plasma foram pré-incubados durante 2 minutos a 37°C, logo foram misturados com variadas quantidades da metaloprotease BtaHF (0,312-5µg/5µL) durante um minuto a 37°C.

A determinação do índice APTT foi feita segundo o kit de diagnóstico APTT CLOT (CLOT AS, Brasil). A mistura de plasma (50µL) e metaloprotease (5µL) foi pré-incubada por 2 minutos a 37°C com 100µL do reagente APTT CLOT. Após esse tempo, a reação foi iniciada com 50µL de CaCl₂ (CLOT kit) e o tempo de coagulação registrado usando o coagulômetro CLOTimer (CLOT AS, Brasil).

A determinação do índice PT foi feita usando o kit de diagnóstico PT CLOT. A mistura de plasma e metaloprotease (55µL) foi pre-incubada 2 minutos a 37°C, logo foram adicionados 100µL do reagente PT CLOT e o tempo de coagulação registrado usando o mesmo aparelho descrito acima.

Os resultados obtidos para cada índice foram expressos em segundos e como média e ±SEM de 6 determinações.

3.12.7. Diferenciação das células da linhagem C2C12

A linhagem celular C2C12 é um subclone da linhagem celular de mioblastos C2 derivada de células satélites de camundongos adultos (Lopes-Martins *et al.*, 2006). As células C2C12 cresceram em meio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, Cultilab) suplementado com 10 % de soro fetal bovino (FBS, Cultilab) e 1% de solução antibiótica-antimicótica (Cultilab), sempre a 37°C em um ambiente úmido e a 5% CO₂. As células foram mantidas em estado de subconfluência e repicadas a cada 2 ou 3 dias.

Antes dos experimentos, todas as culturas foram examinadas e sua viabilidade foi confirmada pelo método de exclusão do azul de trypan. Para induzir o estresse celular, metade das culturas foi cultivada em DMEM suplementado com apenas 5% de FBS por 24h antes de cada experimento. Esta situação *in vitro* produz estresse similar às condições de estresse *in vivo*, reduzindo as taxas de crescimento celular (Pereira *et al.*, 2002; Azevedo *et al.*, 2006).

3.12.8. Efeitos citotóxicos da metaloprotease BtaHF sobre mioblastos da linhagem C2C12

A atividade citotóxica foi estudada em mioblastos da linhagem celular C2C12 obtidos no item anterior. Quantidades variadas de toxina (31-500µg/mL) foram diluídas em meio de cultura DME (Dulbecco's Modified Eagle's) suplementado com 1% de soro fetal bovino e adicionado a placas de 96 poços (200µl por poço) com células ressuspensas semeadas em uma quantidade de $1,5-2,5 \times 10^4$ células/poço. Após 3 horas de incubação a 37°C e 5% de CO₂ em atmosfera úmida, a citotoxicidade foi avaliada qualitativamente usando um microscópio de contraste de fases (Axiovert 40®, Carl Zeiss, Germany). Fotografias das observações foram capturadas com a câmara digital CANON modelo CCD 2272x1704 (Japão).

A citotoxicidade da metaloprotease BtaHF foi também avaliada pela quantificação da enzima lactato desidrogenase liberada (LDH) proveniente das células lisadas por ação da metaloprotease em estudo, usando-se para isso alíquotas coletadas do sobrenadante das culturas e ensaios colorimétricos descrito no Kit LDH-P UV Método UV otimizado SFBC (Wiener, Argentina), as leituras de absorvância foram feitas a 340nm. Todos os experimentos foram feitos em triplicatas.

Os experimentos de cultura celular foram realizados na Faculdade de Ciências Exatas, Naturais e de Agrimensura (Departamento de Bioquímica) da Universidade Nacional do Nordeste, UNNE, Cidade de Corrientes, Argentina.

3.12.9. Efeitos da metaloprotease BtaHF sobre a adesão celular de mioblastos

Os estudos sobre a adesão celular foram feitos utilizando o método descrito por Paludo e Cols (2006). Em placas de ELISA, os poços foram cobertos com uma camada da mistura de SFB:PBS (1:4 v/v) por 1 hora a temperatura ambiente e logo foi eliminado o excesso. Em cada poço foi adicionado 100µL de suspensão de mioblastos C2C12 (DMEM com 5% de SFB como suplemento, $2,5-3 \times 10^4$ células/poço) e diferentes concentrações de metaloprotease (30 e 60 µg/mL), Logo a placa foi incubada durante 2 horas a 37°C e 5% de CO₂. Após o tempo de incubação cada poço foi suavemente lavado com PBS para eliminar as células não aderidas. A avaliação da adesão celular foi feita utilizando o corante cristal violeta medindo a absorvância a 620nm em um leitor de microplacas (Thermo Multiskan Ex). Os resultados foram expressos como percentagem de adesão celular em relação à suspensões celulares sem enzima (100%). Todos os experimentos foram feitos em triplicatas.

Os experimentos de cultura celular foram realizados na Faculdade de Ciências Exatas, Naturais e de Agrimensura (Departamento de Bioquímica) da Universidade Nacional do Nordeste, UNNE, Cidade de Corrientes, Argentina.

3.13. Análise Estatística

Os resultados foram expressos pela média e o \pm erro padrão. ANOVA seguido pelo teste múltiplo “Tukey-Kramer”, usado para comparação estatística dos dados (análise de significância). A análise estatística foi feita usando as funções estatísticas do programa Origin Pro SR2 versão 8.0891 (OriginLab Corporation, MA, USA). O valor de $p < 0,05$ foi considerado significativo.

IV. RESULTADOS

4.1. Purificação da metaloprotease BtaHF isolada a partir do veneno total de *Bothriopsis taeniata*

4.1.1. Cromatografia convencional de exclusão molecular

A figura 7 mostra o fracionamento do veneno bruto de *B. taeniata*, em uma coluna Sephadex G-75 (78 x 2 cm). O cromatograma apresenta cinco picos, os quais foram nomeados BtaI até BtaV.

As atividades proteolíticas metalo-dependente (inibida com EDTA) e hemorrágicas foram encontradas nas frações Bta I e Bta II. A fração Bta II apresentou atividade proteolítica sobre a azocaseína e atividade hemorrágica sendo assim selecionada para prosseguir para a seguinte etapa de purificação. O pool foi realizado na convergência da ascendência e descendência de cada pico.

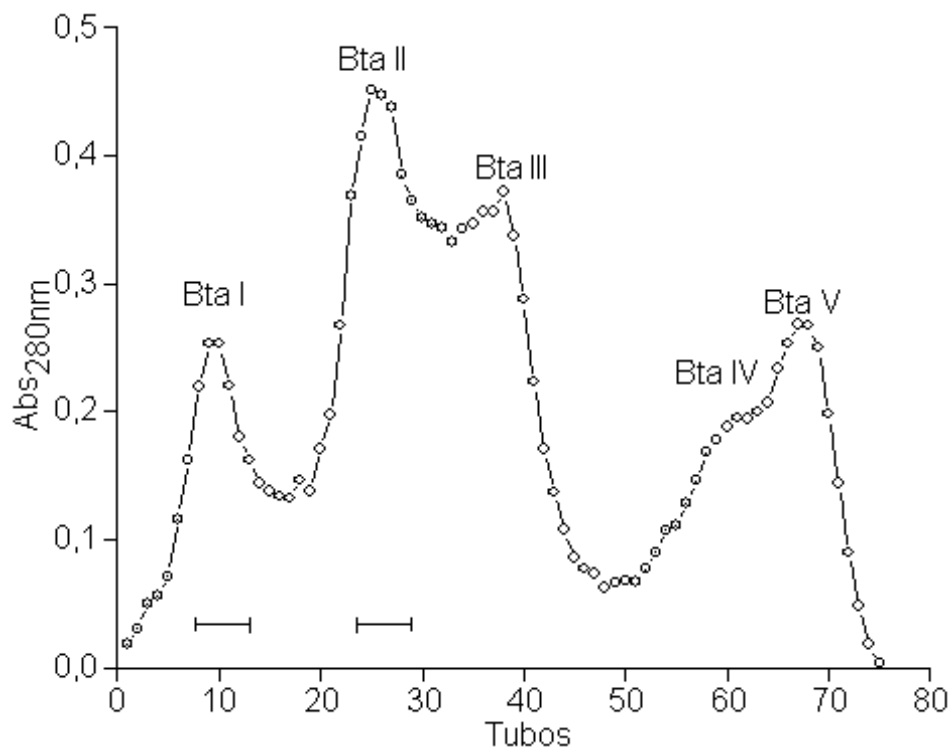


Figura 7. Cromatografia convencional de exclusão molecular numa coluna Sephadex G-75. Frações de 50 mg do veneno total de *Bothriopsis taeniata* dissolvidas em 1mL de tampão Bicarbonato de Amônia 1M foram injetadas em uma coluna previamente equilibrada e eluída com tampão Bicarbonato de Amônia 0,2M pH 7,9, num fluxo de 0,3mL/min. O monitoramento da corrida cromatográfica foi realizado a 280 nm. As barras horizontais indicam a presença de atividade caseinolítica e hemorrágica.

4.1.2. Purificação da fração BtaII em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) de troca iônica

A Figura 8 mostra o perfil cromatográfico da fração BtaII, obtida no passo cromatográfico anterior, numa coluna DEAE 8HR AP-Minicolumn 5 x 50 mm analítica (Waters), acoplada a um sistema CLAE. Foram obtidos oito picos nomeados de Bta II-1 até Bta II-8. A atividade proteolítica metalo-dependente (inibida com EDTA) sobre azocaseína e atividade hemorrágica foi encontrada na fração Bta II-4 a qual foi selecionado para a posterior caracterização físico-químico, funcional, estrutural e foi renomeada como BtaHF (*Bothriopsis taeniata* Hemorrhagic Factor). Os pools foram realizados na convergência da ascendência e descendência de cada pico.

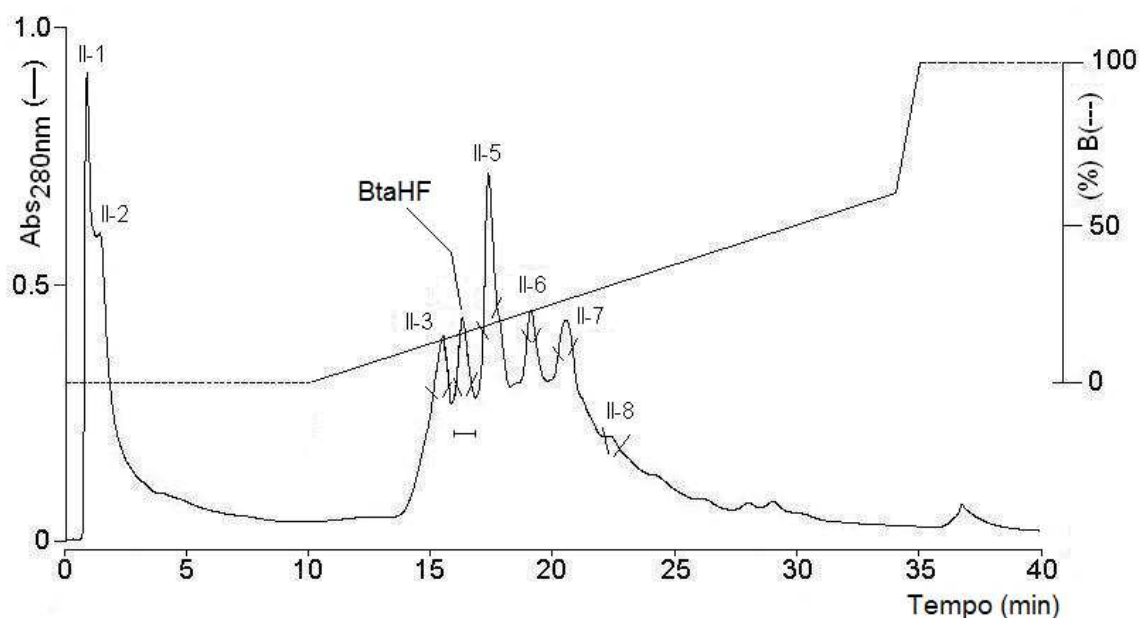


Figura 8. Perfil cromatográfico fração Bta II em um sistema de CLAE de troca iônica. Aliquotas de 4 mg da fração BtaII foram aplicadas numa coluna DEAE 8HR AP-Minicolumn 5 x 50 mm analítica (Waters). A eluição da amostra foi realizada usando um gradiente linear contínuo de AMBIC de 0,05-1 M. O fluxo foi mantido constante a 1 mL/min. O monitoramento da corrida cromatográfica foi realizado a 280 nm. A barra horizontal indica a presença de atividade caseinolítica e hemorrágica

4.3. Atividade caseinolítica e inibição da fração Bta II (Sephadex G-75) e frações obtidas por troca iônica (DEAE 8HR AP-Minicolumn)

A figura 9A mostra as atividades caseinolíticas da fração Bta II e das frações obtidas por troca iônica (Bta II-1 – Bta II-7). Os estudos de inibição mostram que a atividade caseinolítica da fração Bta II é metal dependente. Das frações obtidas por troca iônica as frações Bta II-1, Bta II-3, Bta II-4 e Bta II-5 mostraram atividade caseinolítica, mas a fração BtaII-3 foi a única que não foi metal dependente. A figura 9B mostra que a fração Bta II-4 (BtaHF) apresenta a maior atividade hemorrágica, enquanto as frações Bta II-3 e Bta II-5 possuem atividade menor quando comparada com atividade da fração Bta II.

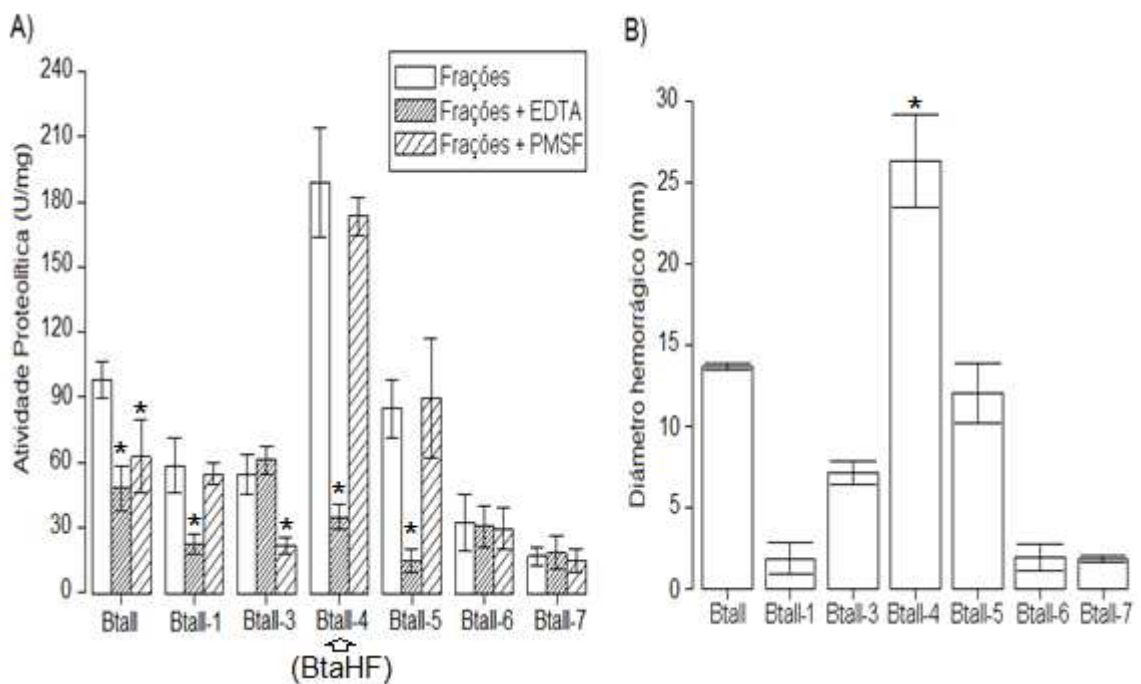


Figura 9. A) Monitoramento da atividade caseinolítica e inibição por EDTA (5 mM) e PMSF (2 mM) da fração Bta II (Sephadex G-75) e das frações BtaII-1 ate BtaII-7 (Troca Iônica). Quantidades de 10µg de fração foram misturadas com 90 µL de azocaseína em condições padrão (Item 3.6 material e métodos) B) Monitoramento da atividade hemorrágica da fração Bta II e frações obtidas no segundo passo de purificação. Quantidades de 40µg de amostra foram injetadas intradermicamente nas costas de camundongos. Os valores foram expressos pela média e ± SEM (n=3). *Diferença significativa ($p < 0,05$).

4.4. Controle do grau de pureza da fração BtaHF num sistema CLAE de Fase Reversa para a determinação do grau de pureza

A figura 10A mostra a eletroforese em SDS-PAGE da metaloprotease BtaHF sob condições não reduzidas (NR) e reduzidas (R), a qual revelou a presença de uma banda ao redor de 25 kDa, evidenciando um padrão semelhante a outras metaloproteases de baixa massa molecular presentes em venenos botrópicos.

Para confirmar o grau de pureza da metaloprotease BtaHF, 0,5 mg da toxina foi submetida numa cromatografia de Fase Reversa num sistema CLAE. Na figura 10B observou-se a presença de um pico simétrico com o tempo de retenção em 40 minutos, sendo eluído com 57% do tampão B.

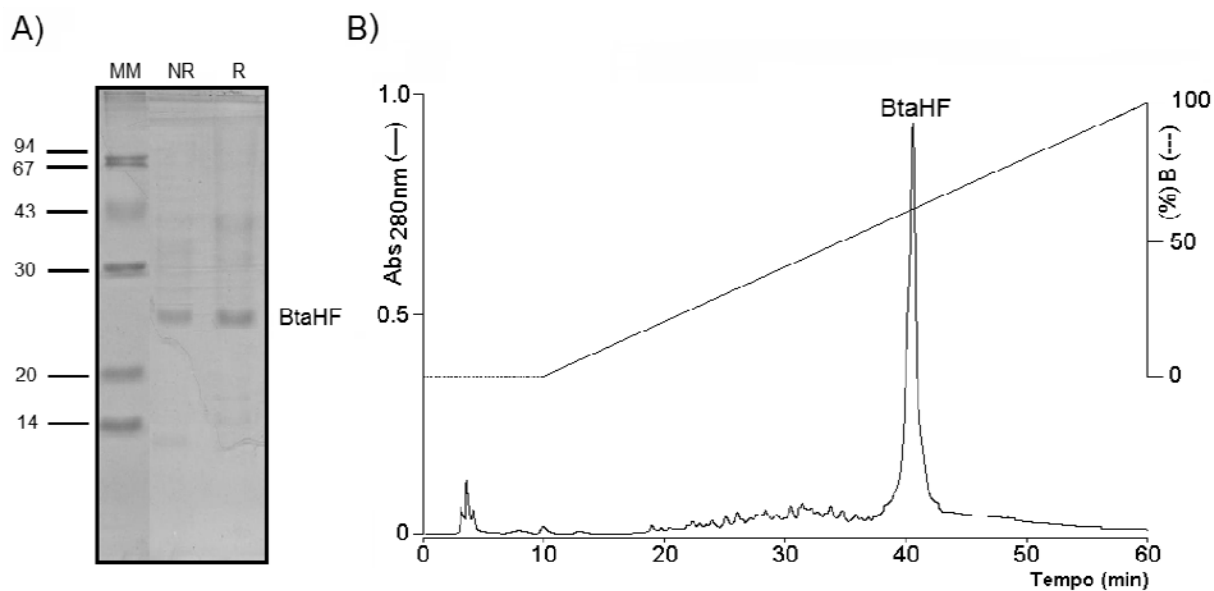


Figura 10. Avaliação da pureza e determinação da massa molecular relativa da metaloprotease BtaHF. (A) Eletroforese em gel de poliacrilamida em condições não reduzidas e reduzidas com DTT, corado com Comassie blue 0.05%. As pistas eletroforéticas correspondem aos Marcadores de massa molecular (MM), BtaHF em condição não reduzida (NR) e em condição reduzida com DTT (R). (B) Perfil cromatográfico da fração BtaHF em HPLC de fase reversa numa coluna μ -Bondapck C-18 (Waters), sistema CLAE. A eluição da amostra foi realizada usando-se um gradiente linear contínuo de concentração do tampão B (Acetonitrila 60%, TFA 0,025%). O fluxo foi mantido constante a 1mL/min. O monitoramento da corrida cromatográfica foi realizado a 280nm.

4.3. Tabela de purificação da BtaHF

A Tabela 1 resume as etapas do processo de purificação, assim como o cálculo da recuperação e o fator de purificação obtido para a metaloprotease BtaHF, a partir dos parâmetros de atividade caseinolítica usando azocaseína como substrato.

A fração BtaII, obtida no primeiro passo cromatográfico representa aproximadamente 50% da proteína do veneno total e é responsável pelo 60% da atividade proteolítica do veneno total. Com o segundo passo cromatográfico de troca iônica foi obtido a metaloprotease BtaHF o qual representa 16,81% da atividade caseinolítica do veneno total.

A tabela 1 mostra que a metodologia de purificação utilizada no presente trabalho permitiu purificar a metaloprotease BtaHF 76,41 vezes em termos de atividade caseinolítica.

Tabela 1 Rendimento da purificação da metaloprotease BtaHF isolada do veneno de *Bothriopsis taeniata*.

| Etapas de Purificação | Volume (mL) | Proteína Total (mg) | Atividade^a (UP) | Atividade Total^b (UT) | Atividade Específica (U/mg) | Purificação | Rendimento (%)^c |
|------------------------------|--------------------|----------------------------|-----------------------------------|---|------------------------------------|--------------------|-----------------------------------|
| Veneno Total | 20,00 | 50,00 | 564,80 | 11296,00 | 11,30 | 1,00 | 100,00 |
| Exclusão Molecular (BtaII) | 5,00 | 24,20 | 1361,50 | 6807,50 | 56,26 | 4,98 | 60,26 |
| CLAE Troca Iônica (BtaHF) | 1,00 | 2,20 | 1898,90 | 1898,90 | 863,14 | 76,41 | 16,81 |

^aUP: Atividade do veneno total, fração BtaII e BtaHF em 1 ml de reação.

^bUT: Atividade no volume total de amostra utilizado no procedimento cromatográfico.

^cRendimento baseado na atividade caseinolítica.

4.4. Massa molecular da metaloprotease BtaHF

A metaloprotease BtaHF apresentou massa molecular de 25968,16 Da (Figura 11A). A determinação da massa molecular real é consistente com a massa molecular relativa determinada pela eletroforese em SDS-PAGE. De acordo com o tipo de técnica empregada de espectrometria de massa (ESI-Q-ToF MS), pode-se confirmar a pureza da metaloprotease BtaHF confirmando os resultados obtido por CLAE de fase reversa.

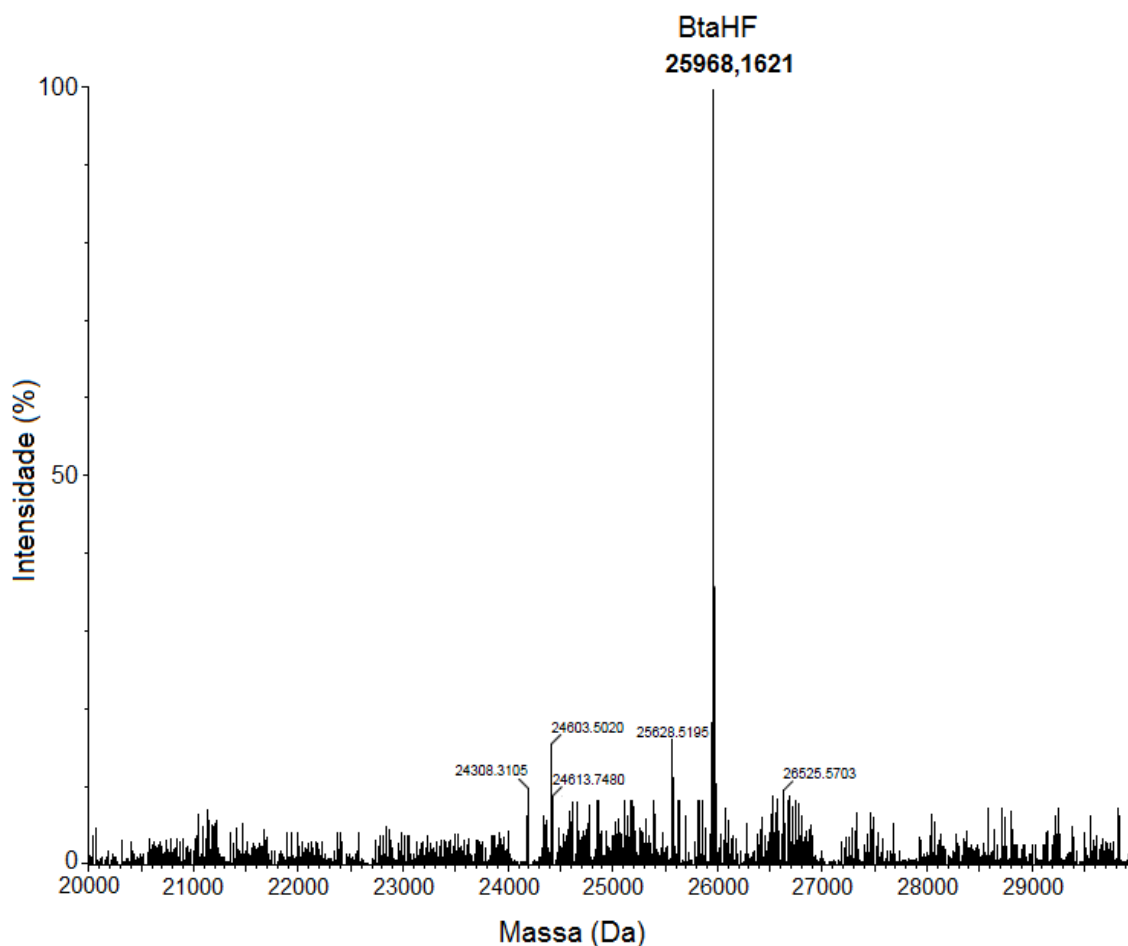


Figura 11. Determinação da massa molecular da metaloprotease BtaHF nativa por espectrometria de massa ESIQ-TOF MS. Espectro da massa da metaloprotease BtaHF.

4.5. Atividade caseinolítica da metaloprotease BtaHF

A atividade proteolítica sobre a azocaseína do veneno bruto (VT) de *B. taeniata*, fração BtaII do primeiro passo de purificação (cromatografia de exclusão molecular) e da metaloprotease BtaHF mostra-se na figura 12. A atividade do veneno bruto, de BtaII e da metaloprotease BtaHF foi de $56,48 \pm 4,24$ U/mg, $136,15 \pm 23,39$ U/mg e $189,89 \pm 25,59$ U/mg respectivamente. O gráfico mostra que a atividade específica de BtaHF se incrementa conforme aumenta o grau de pureza.

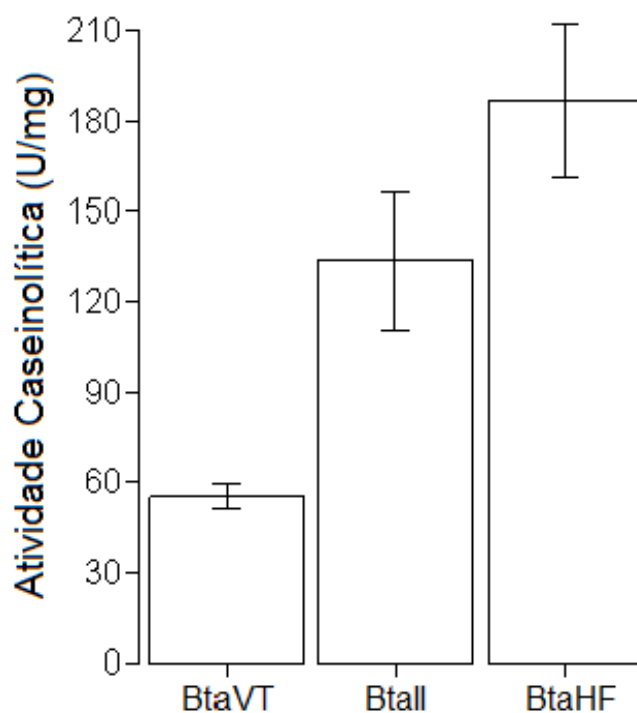


Figura 12. Atividade caseinolítica do veneno bruto de *Bothrops taeniata* (BtaVT), BtaII e BtaHF. 10 μ L das amostras foram misturados com 90 μ L de uma solução de azocaseína (5mg/mL) e incubados no banho-maria por 90 minutos a 37 °C. Foram adicionados 200 μ L de TCA (5 %), e as amostras foram centrifugadas a 4279xg por 8 minutos. Após misturar 150 μ L de sobrenadante com igual volume de NaOH (0,5 M), leituras foram feitas a 440 nm. Os valores foram expressos pela média e a \pm SEM (n=3).

4.6. Efeito da temperatura na atividade caseinolítica de BtaHF

A figura 13 mostra o efeito da temperatura na atividade caseinolítica sobre a azocaseína da metaloprotease BtaHF. Na figura, nota-se que a temperatura ótima da BtaHF foi na faixa dos 30-40 °C, temperatura á qual se apresentou maior atividade proteolítica. Em temperaturas maiores a 60°C a atividade de BtaHF se reduz significativamente ($p = 0,00109$), no entanto, com temperaturas acima de 70°C e abaixo de 20°C a atividade caseinolítica foi quase completamente inibida.

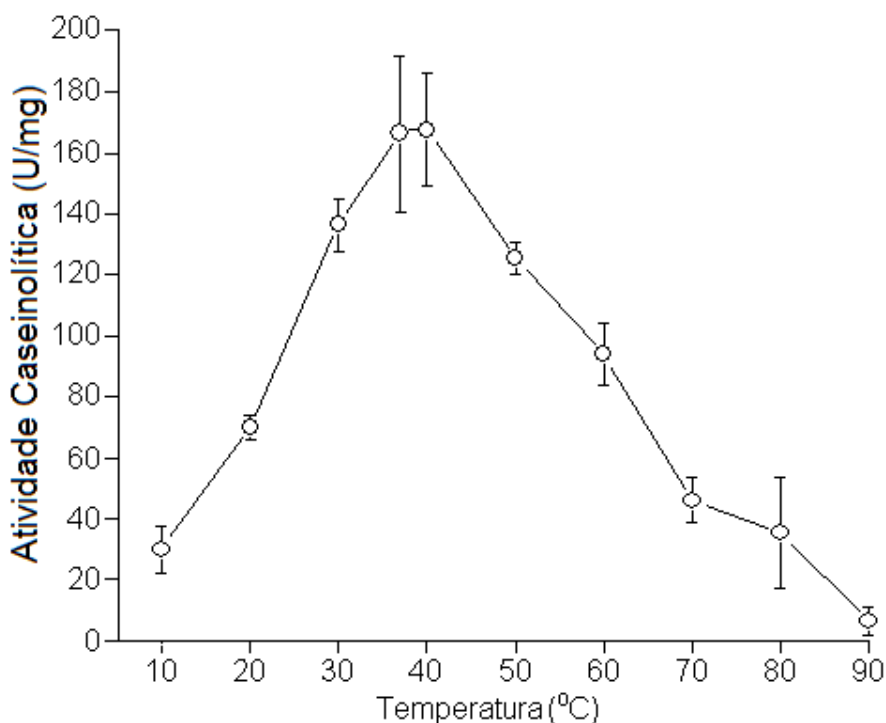


Figura 13. Efeito da temperatura na atividade caseinolítica da metaloprotease BtaHF. A determinação da atividade proteolítica foi feito sobre a azocaseína como substrato, a temperatura de incubação foi variada num intervalo de 10-90°C. Os valores foram expressos pela média e \pm SEM (n=3).

4.7. Efeito do pH na atividade caseinolítica da BtaHF

Foi avaliado o efeito do pH sobre a atividade caseinolítica sobre a azocaseína da metaloprotease BtaHF. A figura 14 mostra que os valores ótimos de pH para a atividade proteolítica sobre a azocaseína da metaloprotease BtaHF foram de 7 e 8, fora desse intervalo observa-se que a atividade catalítica da metaloprotease diminui. Para valores de pH ácidos (menor que pH 6) e básicos (maiores que pH 11) ocorre quase a completa redução da atividade caseinolítica.

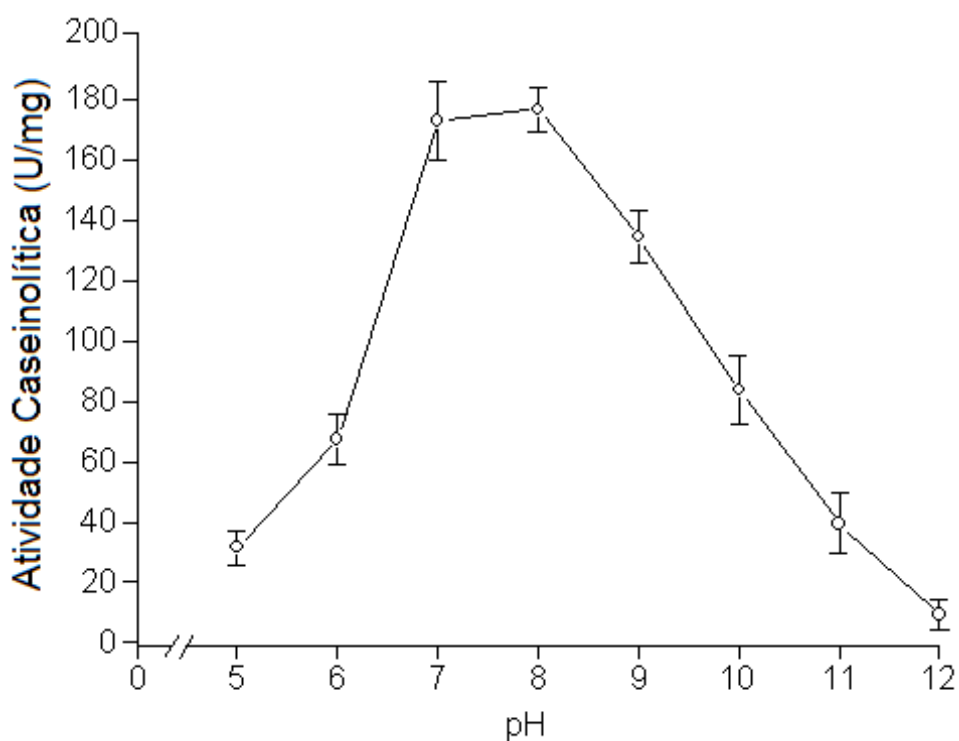


Figura 14. Efeito do pH na atividade caseinolítica da metaloprotease BtaHF. A atividade caseinolítica da BtaHF foi feita sobre a azocaseína como substrato. O pH da mistura de reação foi variado num intervalo de 5-12. Os valores foram expressos pela média \pm SEM (n=3).

4.8. Efeito de inibidores sobre a atividade proteolítica de BtaHF

Os estudos com inibidores permitem diferenciar as atividades proteolíticas de metaloproteases e serinoproteases quando é usado a azocaseína como substrato.

Na figura 15 apresentam-se os efeitos inibitórios dos agentes quelantes EDTA e EGTA, do PMSF (inibidor de serinoproteases) e do inibidor de tripsina de soja (SBT-I) na atividade proteolítica sobre a azocaseína da metaloprotease BtaHF. Na figura observa-se que os agentes quelantes EDTA (5 mM) e o EGTA (5 mM) e o agente redutor DTT (1mM) inibem significativamente ($p = 3,81 \times 10^{-7}$) a atividade caseinolítica da BtaHF, com atividades residuais de 6,99, 8,48 e 3,98% respectivamente. O PMSF (2mM) e SBT-1 (1mg/ml) não apresentaram nenhum efeito inibitório significativo ($p = 0.652$) sobre a atividade caseinolítica da BtaHF.

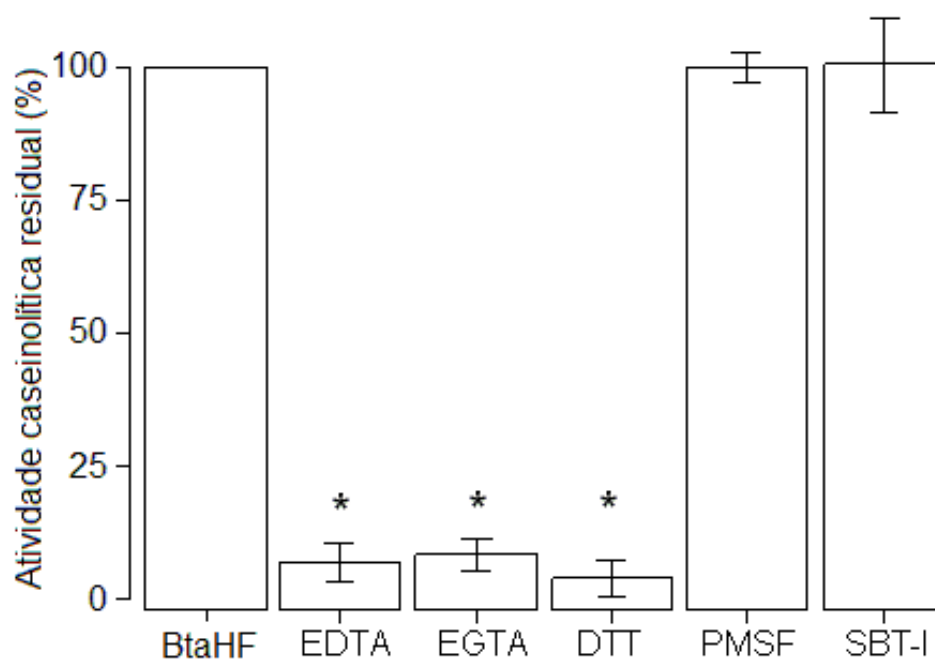


Figura 15. Efeito de inibidores sintéticos na atividade caseinolítica de BtaHF. A metaloprotease BtaHF foi previamente incubada com EDTA (5mM), EGTA (5mM), DTT (1mM), PMSF (2mM), SBT-1 (1 mg/mL) por 30 minutos a 37°C, logo após o procedimento descrito foi aplicado sob condições ótimas. Os resultados são expressos em porcentagem de atividade proteolítica residual, tendo como 100% de atividade caseinolítica a atividade da metaloprotease BtaHF sem os inibidores (n = 3). *Diferença significativa ($p < 0.05$).

4.9. Efeito de íons sobre a atividade caseinolítica de BtaHF

Foram avaliados os efeitos de íons divalentes na atividade caseinolítica de BtaHF. Na figura 16A mostra que o íon Ca^{+2} produziu aumento significativo ($p = 0,00414$) da atividade caseinolítica da BtaHF com 1 mM ($119,95 \pm 6,611$ %) e 5 mM ($118,88 \pm 3,353$ %). Observa-se que o Mg^{+2} não produziu nenhum efeito sobre a atividade caseinolítica da metaloprotease em estudo, mas os íons Zn^{+2} e Mn^{+2} produzem inibição significativa ($p = 0,000465$) da atividade caseinolítica com atividades residuais de 5,41 e 3,25%, respectivamente.

Na figura 16B observa-se que o aumento de atividade caseinolítica da metaloprotease BtaHF produzido pelo íon Ca^{+2} é dose dependente com baixas concentrações (< 1mM). Por outro lado, a BtaHF mostrou atividade máxima em concentrações de Ca^{+2} acima de 1mM.

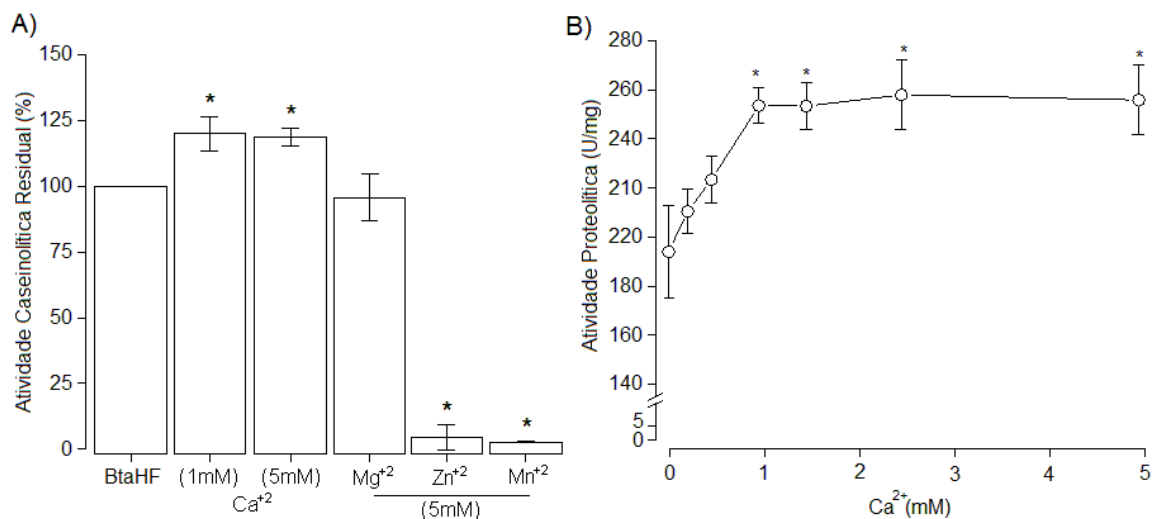


Figura 16. A) Efeito de íons divalentes na atividade caseinolítica de BtaHF. O experimento foi feito em condições ótimas. A metaloprotease BtaHF foi pré-incubada com os íon Ca^{+2} (1 e 5mM), Mg^{+2} (5mM), Zn^{+2} (5mM) e Mn^{+2} por 30 minutos a 37 °C. Os resultados foram expressos em porcentagem de atividade proteolítica residual, tendo como 100% de atividade caseinolítica a atividade da metaloprotease BtaHF sem íons ($n = 3$). B) Efeito de diferentes concentrações de Ca^{+2} sobre a atividade caseinolítica, diferentes concentrações do íon (0,25-5 mM) foram pré-incubadas com a metaloprotease BtaHF (10 μ g) em condições ótimas. *Diferença significativa ($p < 0.05$).

4.10. Efeito da concentração de BtaHF sobre a degradação de fibrinogênio

A metaloprotease BtaHF apresenta atividade proteolítica dose-dependente sobre o fibrinogênio o qual foi detectado através de eletroforese SDS-PAGE. A figura 17 mostra que o processo de degradação das cadeias do fibrinogênio bovino é dose dependente. Com quantidade de 1,25 μg (poço 6) a metaloprotease degrada completamente a cadeia α , mas, com quantidades acima de 10 μg (poço 2 e 3) observou-se que, além da proteólise completa da cadeia α , há proteólise parcial da cadeia β .

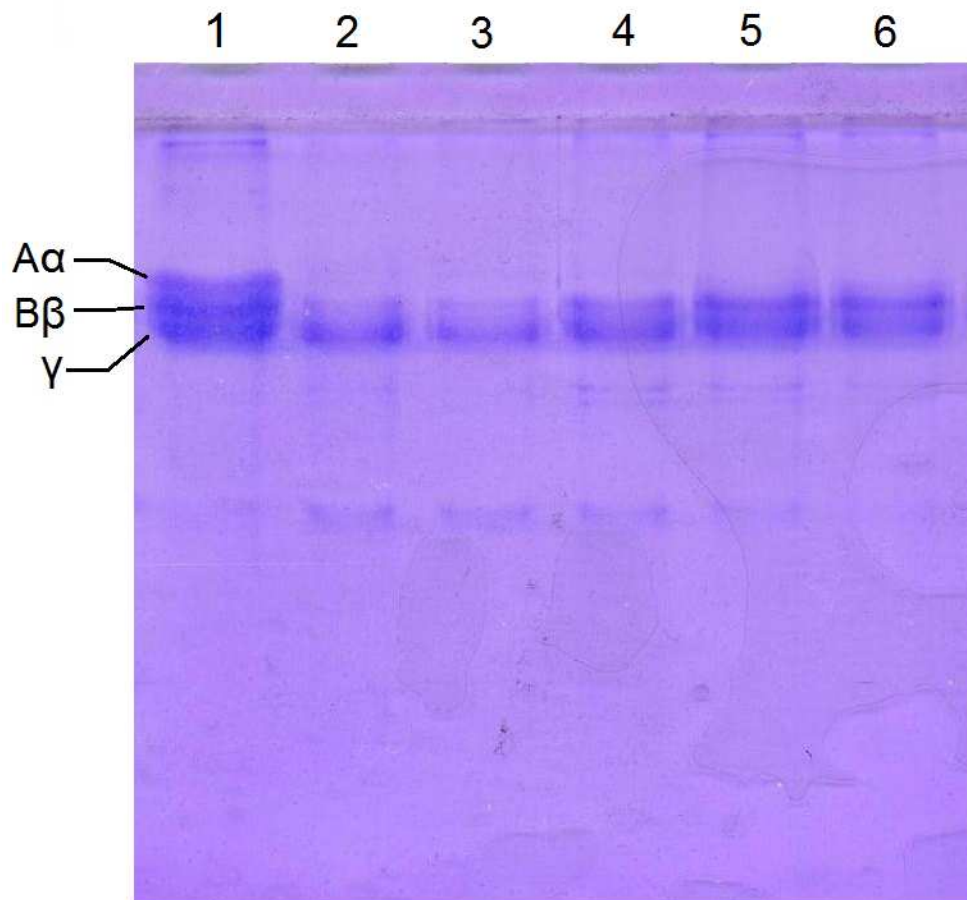


Figura 17. Atividade fibrinogenolítica com diferentes quantidades da metaloprotease BtaHF: (1) Fibrinogênio bovino; (2) Fibrinogênio + BtaHF (20 μg); (3) (10 μg); (4) (5 μg); (5) (2,5 μg); (6) (1,5 μg). A mistura de reação foi incubada a 37°C por duas horas. A análise foi realizada em eletroforese SDS-PAGE (12.5%) com amperagem constante de 30 mA e a voltagem variando entre 70 e 100V. O gel foi corado com Comassie Blue R-250 “overnight”.

4.11. Efeito do tempo sobre a degradação de fibrinogênio

A metaloprotease BtaHF apresenta atividade proteolítica sobre o fibrinogênio o qual foi detectado através de eletroforese SDS-PAGE. Na figura 18 evidenciou-se o processo de degradação da cadeia α do fibrinogênio bovino, desde os 15 minutos (poço 3). A completa degradação da cadeia α deu-se após 30 minutos (poço 4) de reação.

Por outro lado a cadeia β sofreu completa degradação após 9 horas (poço 8) de incubação e a cadeia γ não sofre degradação alguma, mesmo depois de 24 (poço 9) horas de incubação com a metaloprotease BtaHF.

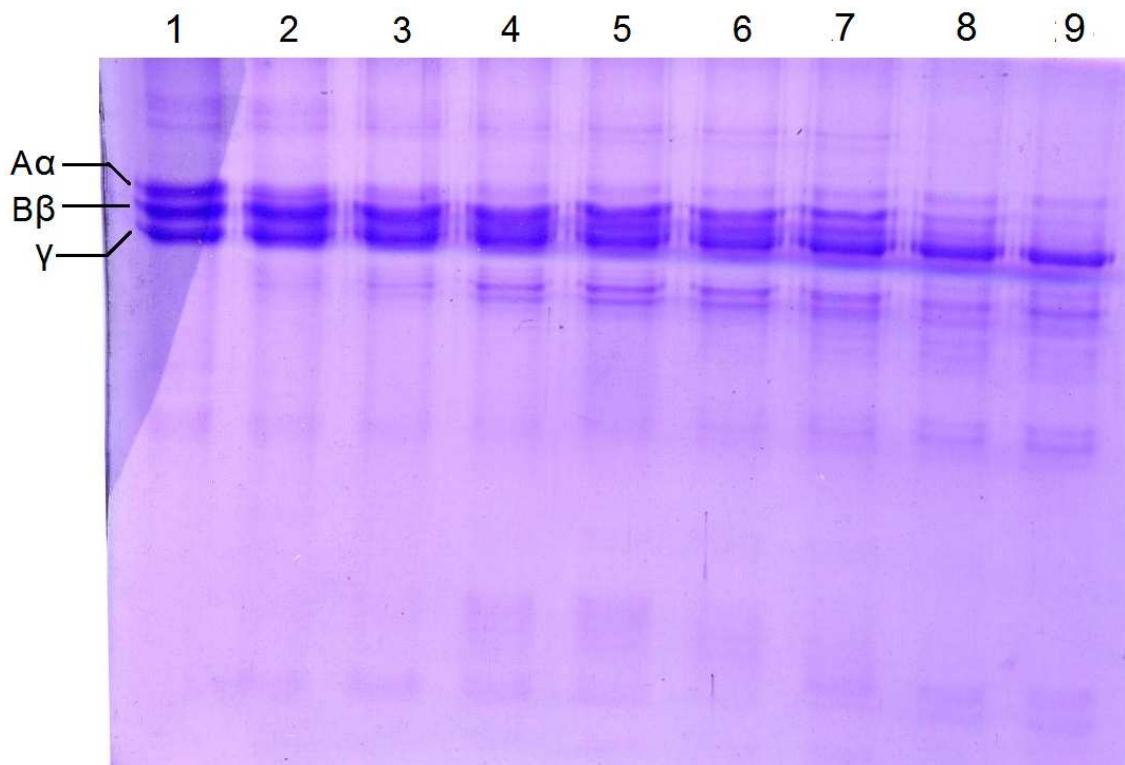


Figura 18. Atividade fibrinogênolítica da metaloprotease BtaHF (1,25 μ g) com diferentes tempos de incubação: (1) Fibrinogênio bovino; (2) Fibrinogênio + BtaHF (5 min); (3) (15 min); (4) (30 min); (5) (1 h); (6) (3 h); (7) (6 h); (8) (9 h); (9) (24 h). Análise foi realizada em eletroforese SDS-PAGE (12.5%) com amperagem constante de 30 mA e a voltagem variando entre 70 e 100V. O gel foi corado com Comassie Blue R-250 “overnight”.

4.12. Atividade proteolítica sobre a fibrina da BtaHF

A metaloprotease BtaHF não apresentou atividade proteolítica sobre a fibrina (Figura 19). Foram incubados por 24 horas diferentes quantidades de metaloprotease: 2,5; 5; 10 e 20 μg , com fibrina em placas. Com a quantidade de 20 μg , a metaloprotease BtaHF não produziu halos fibrinolíticos após o tempo de incubação. Como controle positivo, 20 μg de veneno total de *Bothrops jararacuçu* (BjussuVT9) produziu um halo fibrinolítico de $15,2 \pm 1,25$ mm.

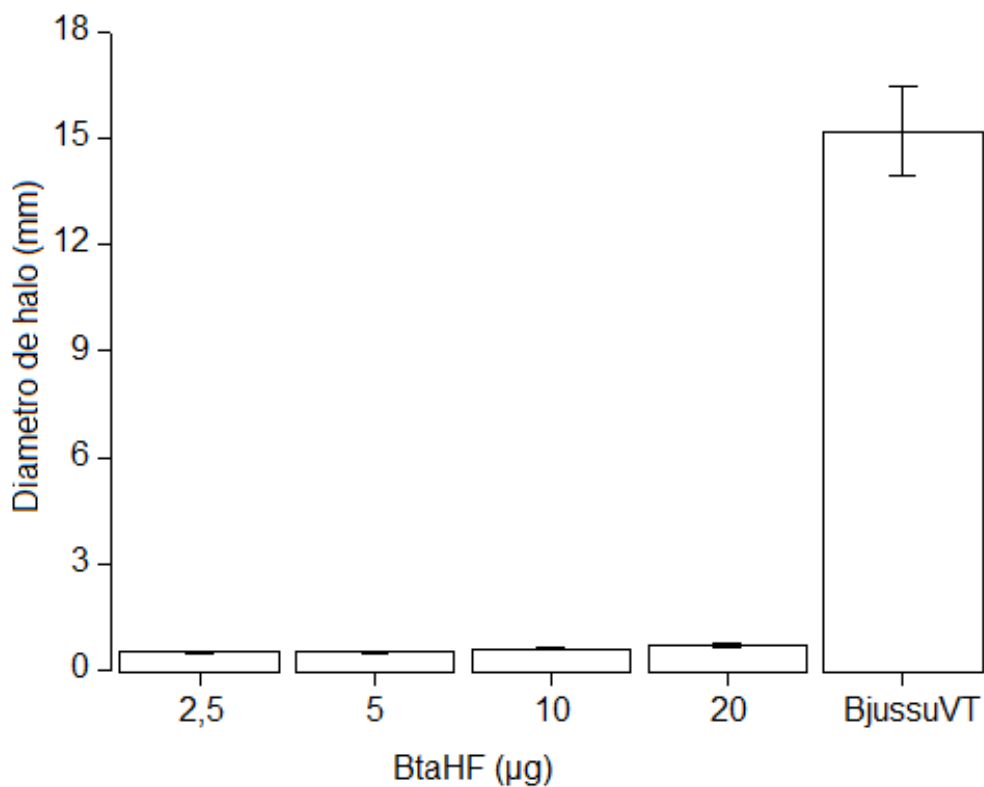


Figura 19. Atividade fibrinolítica da metaloprotease BtaHF. Diferentes quantidades da metaloprotease (2,5 – 20 μg), foram incubadas com fibrina polimerizada a partir de sangue bovino com CaCl_2 , em recipientes plásticos durante 18 horas a 37°C . Como controle positivo de atividade fibrinolítica foi usado $0,5\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de veneno total de *Bothrops jararacuçu* (BjussuVT). Os valores foram expressos pela média \pm SEM (n=3).

4.13. Atividade arginina-amidase sobre o substrato BApNA

Para descartar a contaminação da fração BtaHF com proteínas da família das serinoproteases, avaliou-se a atividade proteolítica de BtaHF sobre o substrato BApNA. Na figura 20 observam-se os valores de V_o para a fração BtaII, a metaloprotease BtaHF e as outras frações obtidas do segundo passo de purificação (troca iônica). A serinoprotease Ba III-4, purificada a partir de *Bothrops atrox* (Ponce-Soto *et al.*, 2007), foi usada como controle positivo. A fração BtaHF não apresenta atividade quando comparada com a atividade da tripsina, indicando que a BtaHF não possui atividade sobre o substrato BApNA.

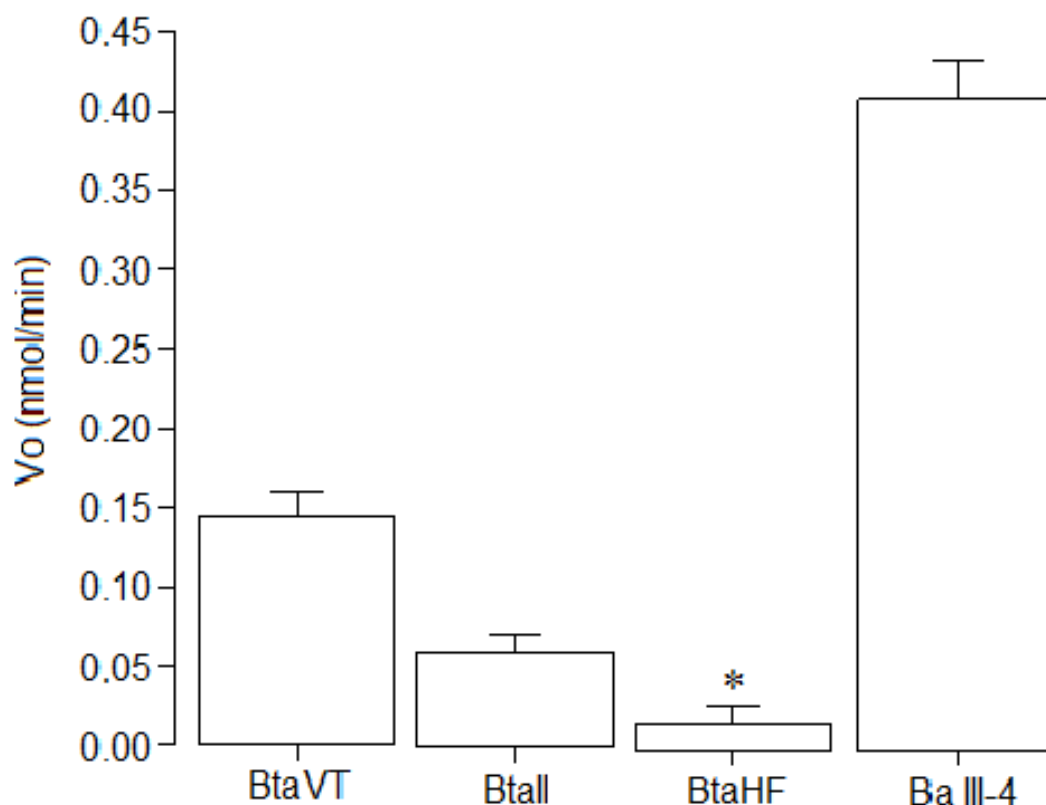


Figura 20. Atividade proteolítica sobre o substrato sintético BApNA. 4 μ L (1 μ g/ μ L) de veneno total (BtaVT), fração Bta II ou foram misturados com 270 μ L de solução de substrato, a mistura foi incubada por 30 minutos a 37°C, após de esse tempo às amostras foram lidas a uma absorbância de 405nm. Os valores foram expressos pela média \pm SEM (n=3).

4.14. Análise de Composição de aminoácidos

A tabela 2 mostra a composição de aminoácidos da metaloprotease BtaHF. A informação mostrada sugere que a BtaHF possui uma massa teórica de 23990.99kDa e poderia ter um comportamento ácido devido à presença maioritária de Asx e Glx (30 e 18, respectivamente). A presença de 6 resíduos de cisteína sugerem a formação três pontes dissulfeto.

Tabela 2. Análise de composição de aminoácidos da metaloprotease BtaHF.

| Amino ácido | Valor Integral Molar | % | PM Calculado |
|--------------------|-----------------------------|------------|---------------------|
| Asx | 30 | 13,76150 | 3453,30 |
| Glx | 18 | 8,25688 | 2324,34 |
| Ser | 16 | 7,33945 | 1393,44 |
| Gly | 20 | 9,17431 | 1141,40 |
| His | 6 | 2,75229 | 822,96 |
| Arg | 7 | 3,21101 | 1093,47 |
| Thr | 13 | 5,96330 | 1444,56 |
| Ala | 14 | 6,42202 | 995,26 |
| Pro | 18 | 8,25688 | 1748,34 |
| Tyr | 8 | 3,66972 | 913,20 |
| Val | 12 | 5,50459 | 1957,80 |
| Met | 5 | 2,29358 | 656,05 |
| Cys | 6 | 2,75229 | 618,84 |
| Ile | 12 | 5,50459 | 1238,04 |
| Leu | 14 | 6,42202 | 1584,38 |
| Phe | 8 | 3,66972 | 1177,52 |
| Lys | 11 | 5,04587 | 1410,09 |
| Trp* | --- | --- | |
| Total | 218 | 100 | 23990,99 |

4.15. Espectrograma dos peptídeos trípticos da metaloprotease BtaHF.

A figura 21 mostra o espectrograma de ESI/MS resultante da digestão tríptica da metaloprotease BtaHF alquilada. Foram obtidos 8 peptídeos com massas entre 673,82 e 3315,79 Da. Os valores das massas moleculares desses peptídeos foram submetidos no banco de dados MASCOT. A sequência deduzida destes peptídeos, assim como, a massa teórica é mostrado na Tabela 3. Pode ser observar que os peptídeos 2 e 7 contêm os motivos “Giro-Metionina” e metaloprotease, respectivamente.

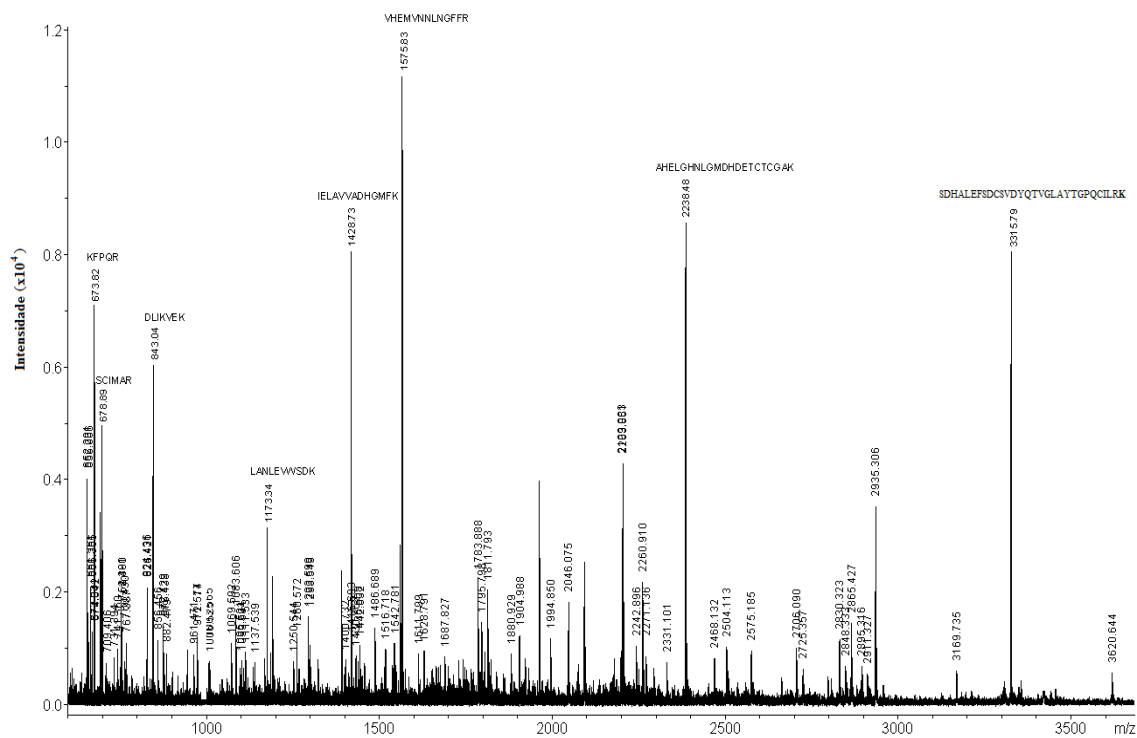


Figura 21. Espectro ESI-QTOF-MS/MS dos peptídeos trípticos produzidos durante a digestão tríptica da metaloprotease BtaHF.

Tabela 3. Sequência obtida por MS/MS baseado nos peptídeos obtidos na digestão trípica da metaloprotease BtaHF.

| Peptídeo No. | Massa medida (Da) | Sequência de aminoácidos | Massa teórica (Da) |
|--------------|-------------------|--------------------------------|--------------------|
| 1 | 673.82 | KFPQR | 673.78 |
| 2 | 678.89 | SCIMAR | 678.85 |
| 3 | 843.04 | DLIKVEK | 843.00 |
| 4 | 1173.34 | LANLEVWSDK | 1173.30 |
| 5 | 1428.73 | IELAVVADHGMFK | 1428.69 |
| 6 | 1575.83 | VHEMVNNLNGFFR | 1575.79 |
| 7 | 2238.48 | AHELGHNLGMDHDETCTCGAK | 2238.44 |
| 8 | 3315.79 | SDHALEFSDCSVDYQTVGLAYTGPOCILRK | 3316.69 |

4.16. Estudos de homologia sequencial dos peptídeos trípticos da metaloprotease BtaHF.

A figura 22 mostra o estudo de homologia sequencial dos peptídeos trípticos da metaloprotease BtaHF com metaloproteases de veneno de serpentes da classe P-I: BaP1 (72,5 %; *B. asper*; Watanabe *et al.*, 2003) BmoomMP α -1 (70,7 %; *B. moojeni*; Bernardes *et al.*, 2002); LHF-II (65,3 %; *L. muta muta*; Sanchez *et al.*, 1991b); Neuwidase (61,3 %; *B. neuwidii*; Rodriguez *et al.*, 2000); Ruberlysin (56%; *C. ruber*; Takeya *et al.*, 1990), Adamalysin II (53,3 %; *C. adamanteus*; Gomis-Ruth, *et al.*, 1994) e Atoxase (51,8%; *C. atrox*; Baker *et al.*, 1995).

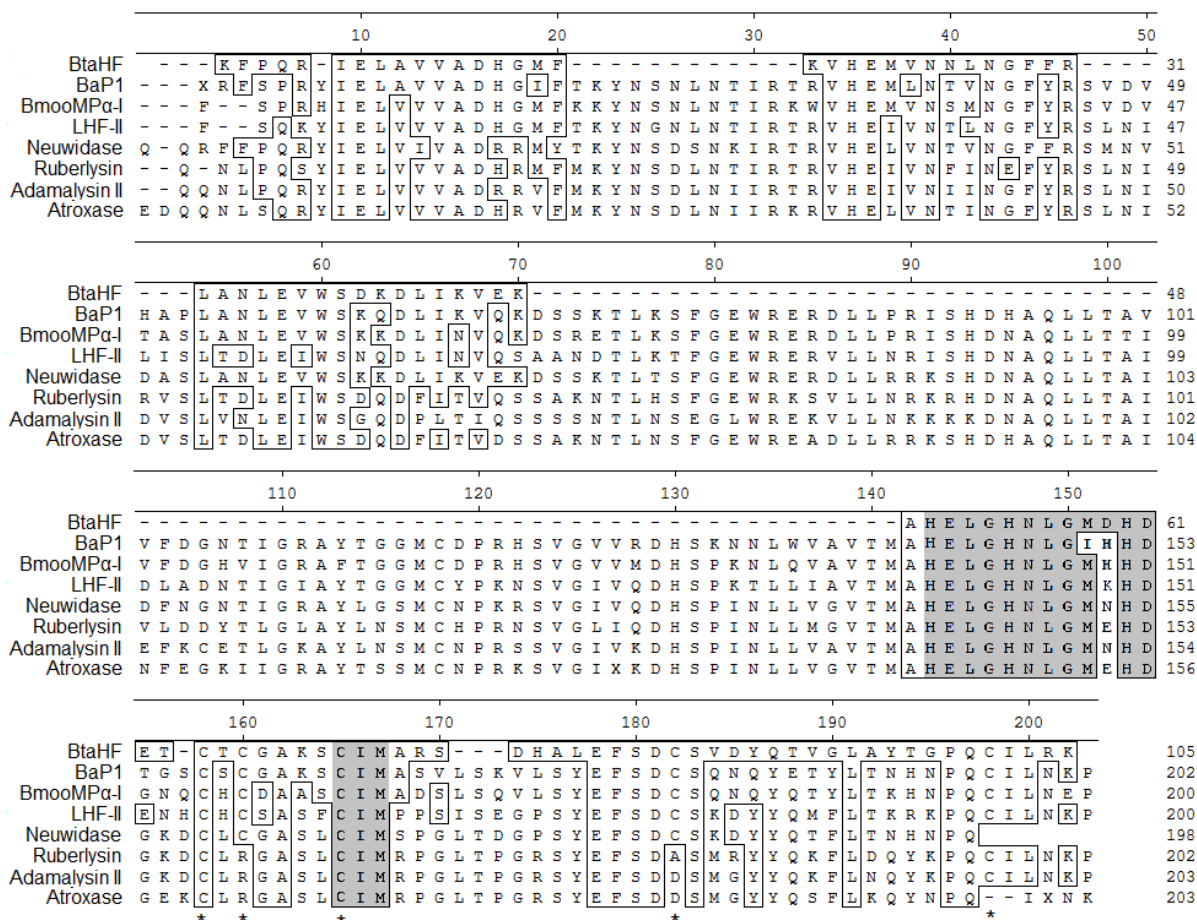


Figura 22. Alinhamento dos segmentos trípticos da metaloprotease BtaHF com SVMP da classe P-I. Os motivos metaloproteases e “Giro-metionina” em cor cinza; (*) resíduos de cisteína conservadas nas SVMP. Os peptídeos trípticos da BtaHF foram alinhadas: BaP1 (2W12_A) de *Bothrops asper*; BmoomMP α -I (P85314.2) de *Bothrops moojeni*; LHF-II (P22796) de *Lachesis muta muta*; BmHF-I (P86802.1) de *Bothrops marajoensis*; Neuwidase (Q919R4.1) de *Bothrops neuwidii*; Ruberlysin (P20897) de *Crotalus ruber*, Adamalysin II (AAB31038.1) de *Crotalus adamanteus* e Atoxase (Q91401.2) de *Crotalus atrox*. O alinhamento foi obtido com o programa MegAling v5.01 usando o método de CLUSTAL W.

4.17. Caracterização Biológica

4.17.1. Dose hemorrágica mínima do veneno total de *Bothriopsis taeniata* e a metaloprotease BtaHF.

A figura 23 mostra a dose hemorrágica mínima (DHM) do veneno total de *B. taeniata* (Fig. 23A) e metaloprotease BtaHF (Fig. 23B). A figura mostra que a DHM do veneno total tem uma atividade hemorrágica quatro vezes mais potente (5,34 μg ; $r = 0,98765$) em comparação com BtaHF (20,32 μg ; $r = 0,99898$).

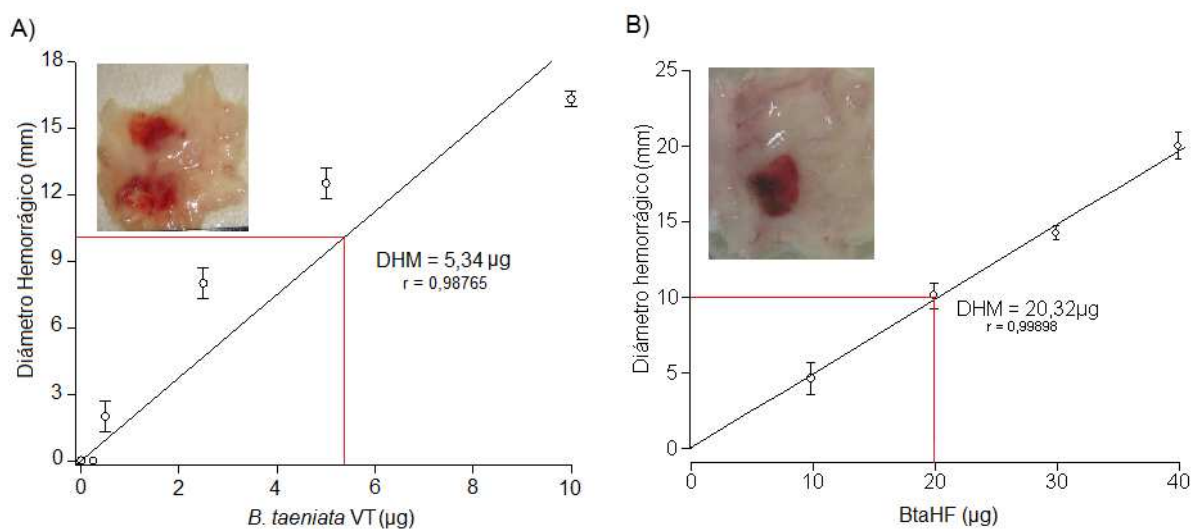


Figura 23. Determinação da dose hemorrágica mínima (DHM) do veneno total de *B. taeniata* (A) e a metaloprotease BtaHF (B). Diferentes doses (0,25 - 40 μg /animal) de veneno ou toxina foram injetados, nas costas de camundongos (18-20g). A hemorragia foi quantificada através da medida dos halos hemorrágicos. A DHM é a quantidade de toxina capaz de produzir um halo hemorrágico de 10mm.

4.17.2. Inibição da atividade hemorrágica da metaloprotease BtaHF

Na figura 24 apresentam-se os efeitos inibitórios dos agentes quelantes EDTA e EGTA, DTT, PMSF (inibidor de serinoproteases) e do inibidor de tripsina de soja (SBT-I) na atividade hemorrágica da metaloprotease BtaHF. Na figura pode-se observar que os agentes quelantes EDTA (5 mM) e o EGTA (5 mM), assim como DTT (1mM), inibiram completamente a atividade hemorrágica da BtaHF. Por outro lado, o PMSF (2mM) e SBT-1 (1mg/ml), não apresentaram nenhum efeito inibitório significativo ($p = 0,116$) sobre a atividade hemorrágica da BtaHF.

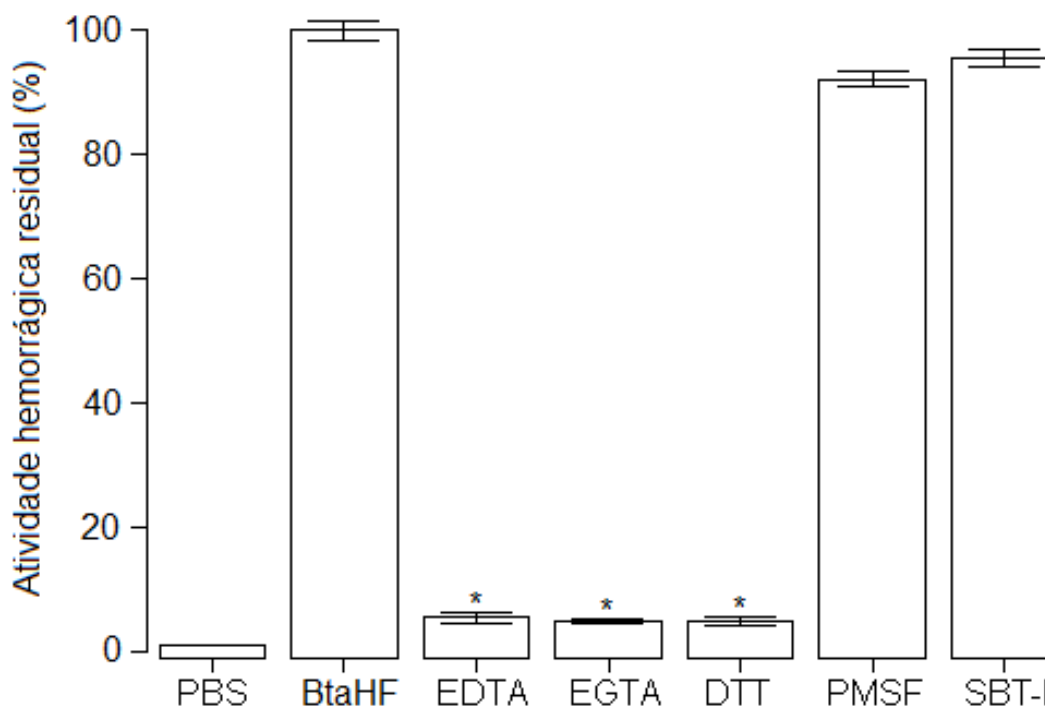


Figura 24. Inibição da atividade hemorrágica da metaloprotease BtaHF. 40 μ g (2DHM) da fração BtaHF foram pré-incubados com EDTA (5mM), EGTA (5mM), DTT (1mM), PMSF (2mM) e SBT-I (1mg/mL) a 37°C por 30 minutos. Depois foi realizado o experimento segundo descrito no item 3.12.1. Os resultados foram expressos como porcentagem de atividade hemorrágica residual da média \pm SEM (n = 5).

4.17.3. Atividade Edematogênica da Fração BtaHF

A figura 25 mostra que a fração BtaHF apresentou atividade edematogênica quando foi injetada via intradérmica na região plantar da pata de camundongos. Atividade edematogênica de BtaHF foi dependente da dose durante a primeira hora após administração.

Dos dados obtidos, a atividade edematogênica de BtaHF apresentou um comportamento dependente do tempo, pode-se observar que nestas doses o efeito é prolongado até 6 horas após a aplicação. A atividade edematogênica diminuiu após 6 horas e às 12 horas depois da aplicação de BtaHF não foi observado edema.

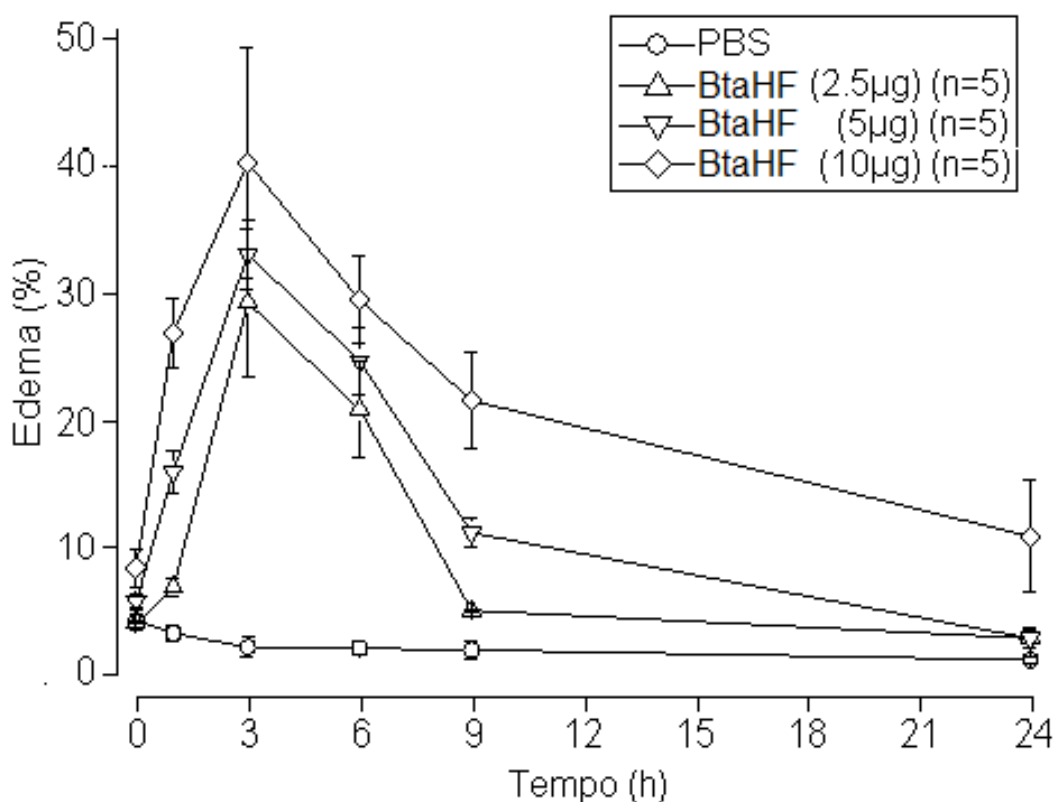


Figura 25. Atividade edematogênica da metaloprotease BtaHF. Diferentes doses da metaloprotease (2,5, 5 e 10µg/animal) foram injetadas na região plantar da pata direita de camundongos, PBS (50µL) foi injetada na região plantar esquerda como controle. O aumento da área da pata foi avaliado após 0,5; 1; 3; 6; 9 e 24 horas. Os resultados são expressos em porcentagem de edema em relação com o controle. Os valores foram expressos pela média \pm SEM (n=3).

4.17.4. Inibição da atividade edematogênica da metaloprotease BtaHF

Assim como para a atividade hemorrágica, foi avaliado se o efeito edematogênico da metaloprotease BtaHF estaria associado à atividade catalítica e ao correto enovelamento da estrutura terciária. Na figura 26 apresenta os efeitos do agente quelante EDTA (5 mM) e o agente redutor DTT (1mM) na atividade edematogênica da metaloprotease BtaHF. Pode-se observar que o EDTA e o DTT inibiram completamente a atividade edematogênica da BtaHF ($p=2,692 \times 10^{-9}$).

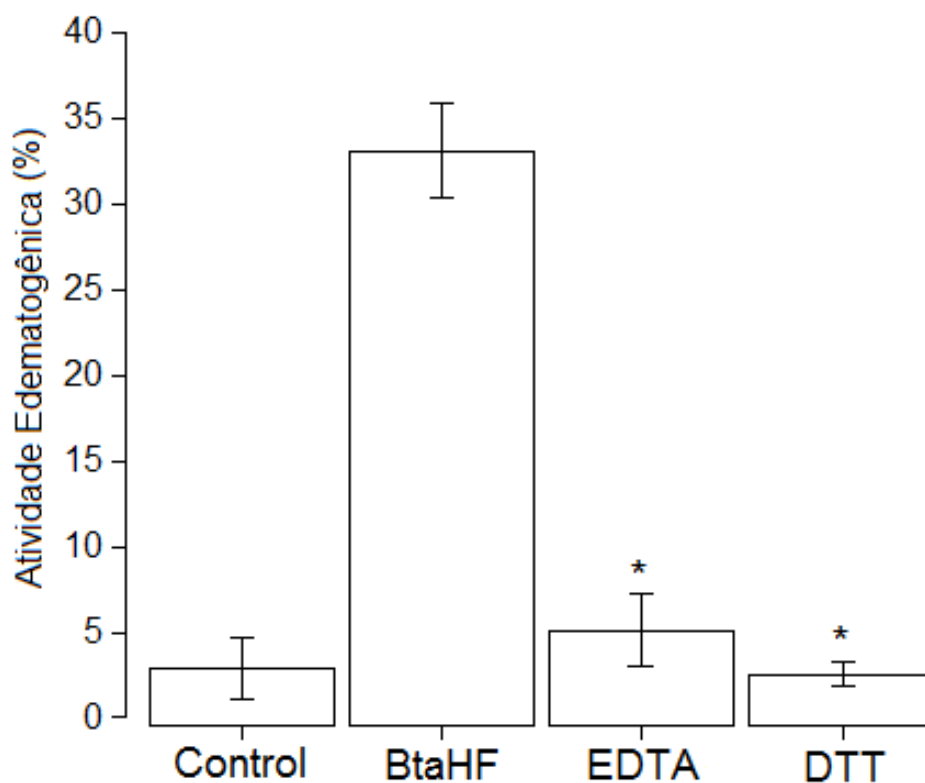


Figura 26. Inibição da atividade edematogênica da metaloprotease BtaHF. Cinco microgramas da toxina BtaHF foram pré-incubados com EDTA (5mM) e DTT (1mM) a 37°C por 30 minutos. Depois foi realizado o experimento segundo descrito 3.12.2. Os resultados foram expressos como porcentagem de edema residual da média \pm SEM (n = 5).

4.17.5. Efeito miotóxico da metaloprotease BtaHF

A figura 27 mostra que a BtaHF, nas doses aplicadas, não produziu efeito miotóxico quando injetada no músculo gastrocnêmio de camundongo. Por outro lado, 5 µg de veneno total de *Bothriopsis taeniata* induziu miotoxicidade moderada com valores máximos de CK plasmático após 3 horas da injeção. O efeito miotóxico do veneno total se reduziu ao longo do tempo.

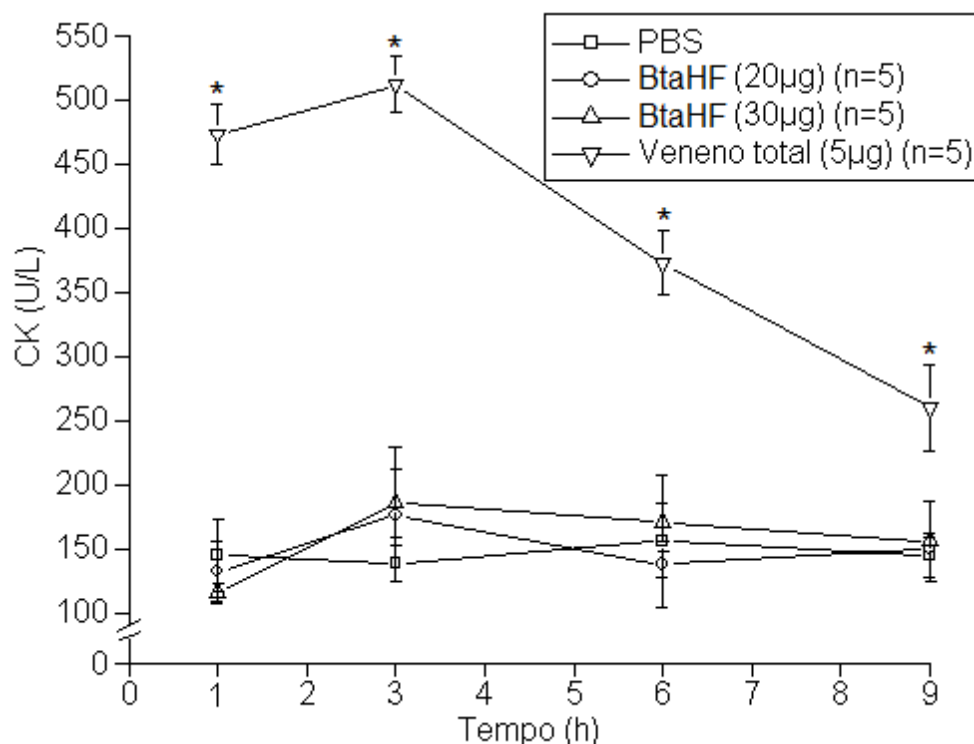


Figura 27. Efeito miotóxico da metaloprotease BtaHF e do veneno total de *B. taeniata*. A metaloprotease (20 e 30µg), veneno total (5µg) e PBS (controle) foram injetados no músculo gastrocnêmios de camundongos. Em diferentes intervalos de tempo foram extraídos alíquotas do sangue dos camundongos pela veia caudal. A partir das amostras do sangue foi obtido plasma e os níveis de CK plasmático foram determinados segundo o kit CK-NAC (LABORLAB). Os resultados foram expressos pela média ±SEM (n = 5). * Diferencia significativa ($p < 0,05$).

4.17.6. Avaliação qualitativa do efeito citotóxico da metaloprotease BtaII-4 sobre mioblastos C2C12

A análise com microscopia ótica (20X) de mioblastos C2C12 avaliado pelo ensaio de cristal violeta revelou que, as culturas tratadas com a metaloprotease BtaHF durante três horas, sofreram efeito citotóxico dose dependente (Figura 28 B-F) quando comparado com as culturas controle (figura 28A). Com dose de 31.5µg/ml observa-se o desprendimento das células do substrato, induzindo alterações morfológicas, arredondamento de células, resultando em áreas sem células (Figura 28B). Com 500µg/ml de amostra produziu 100% de separação dos mioblastos do substrato e morte celular (figura 28F).

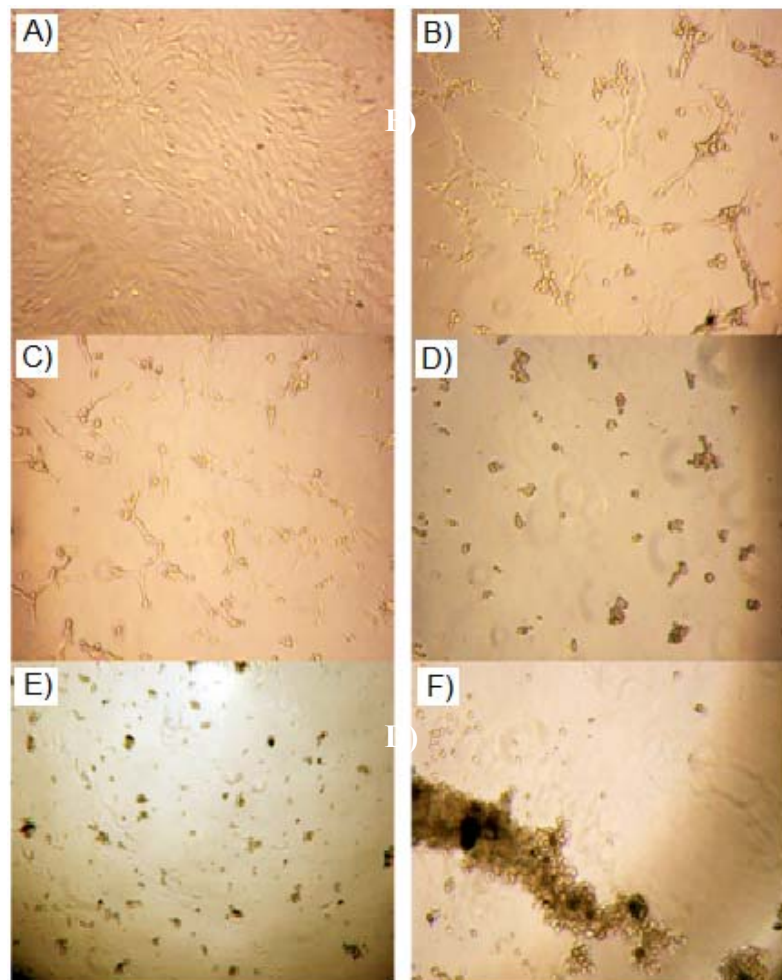


Figura 28. Atividade citotóxica de BtaHF sobre mioblastos C2C12. A cultura primária de mioblastos consiste na proliferação de células musculares mononucleadas e ainda estão parcialmente indiferenciadas (20X). (A) Controle, (B) 31,5 µg/mL, (C) 62,5 µg/mL, (D) 125 µg/mL, (E) 250 µg/mL, (F) 500 µg/mL de BtaHF dissolvido no meio de cultura. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

4.17.7. Quantificação da LDH das culturas celulares

A citotoxicidade da metaloprotease BtaHF foi estimada através da liberação da enzima lactato desidrogenase (LDH) no meio de cultura após 3 horas de exposição das células à proteína, mostrado na figura 29.

A metaloprotease produziu lise das células da musculatura esquelética (C2C12) com uma dose de 6,3µg/poço (31,5µg/mL), o que produziu liberação de $40,2 \pm 5,30$ % de LDH no meio de cultura. O efeito citotóxico da proteína em estudo foi de 55.152 % com dose de 12,6µg/poço (62,5µg/mL, Figura 29).

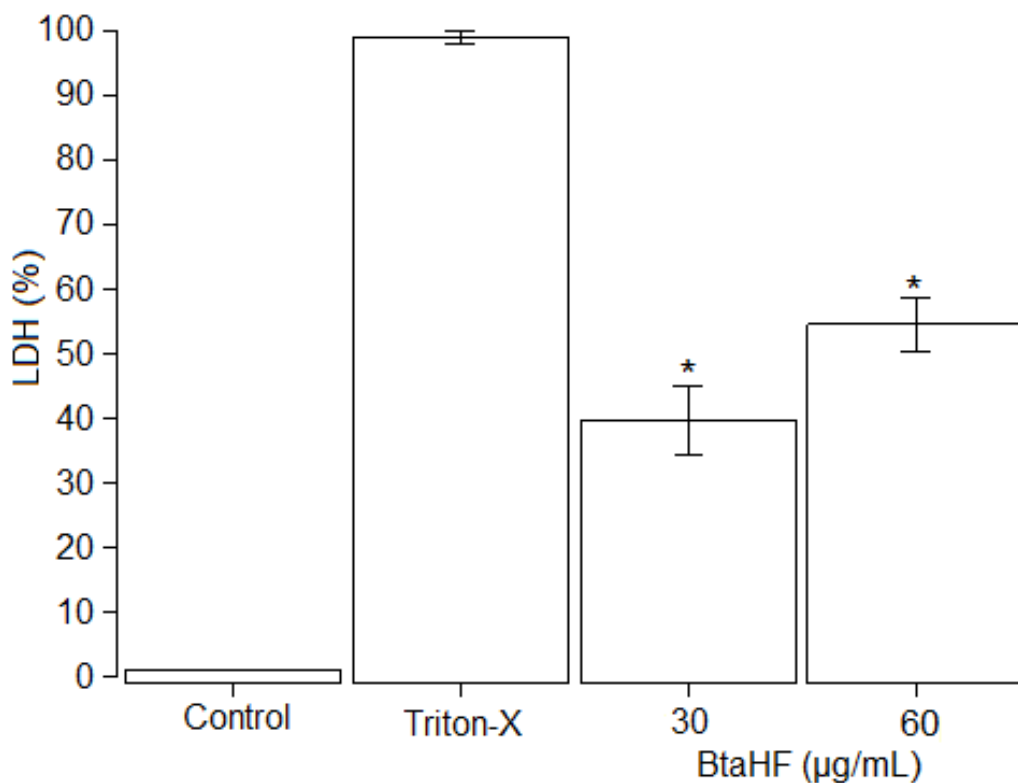


Figura 29. A citotoxicidade da metaloprotease BtaHF em mioblastos da musculatura esquelética (C2C12) foi medida a partir da liberação de LDH. O controle para 0 e 100% de toxicidade consiste de meio de ensaio e de 0.1% de Triton X-100, respectivamente. Cada ponto representa a média e \pm SEM em experimentos realizados em triplicata. * Diferença significativa ($p < 0,05$) comparado ao controle positivo.

4.17.8. Avaliação do efeito da metaloprotease BtaII-4 sobre a adesão de mioblastos C2C12

A figura 30 mostra que a metaloprotease BtaHF reduziu significativamente ($p= 0,000569$) a adesão de mioblastos C2C12. Quando incubadas com dose de $31,5\mu\text{g/mL}$ da proteína $59,65\pm 4,94\%$ das células de mioblastos conseguiram adesão ao meio de cultivo. Por outro lado, com dose de $62,5\mu\text{g/mL}$ da proteína $39,43\pm 6,15$ das células de mioblastos conseguiram adesão.

O efeito de inibição da adesão celular exercida pela metaloprotease BtaHF sobre os mioblastos C2C12 e um efeito dose dependente, mostrado pela diferença significativa ($p= 0,0486$) das respostas induzidas pelas doses testadas.

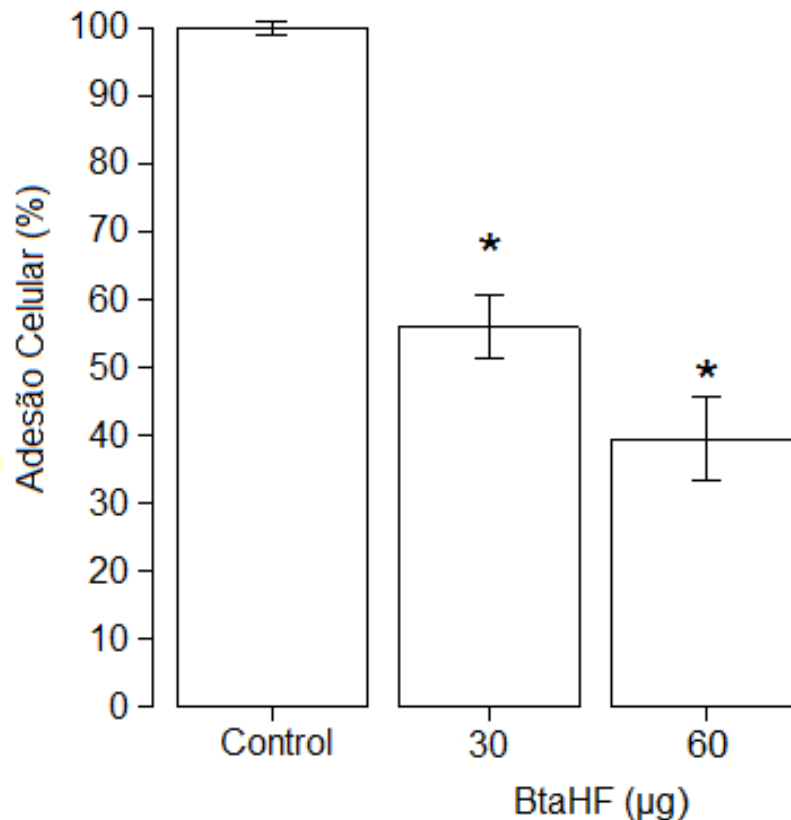


Figura 30. Efeito da metaloprotease BtaHF sobre a adesão de mioblastos da musculatura esquelética (C2C12). Foi medida a absorvância a 620nm de culturas de células previamente tratadas com a proteína. Os resultados foram expressos em termos de % de adesão. A absorvância obtida das culturas sem proteína foi considerada como 100%. Os resultados são expressos pela média \pm SEM ($n = 3$). * Diferença significativa ($p < 0,05$).

4.17.9. Estudos histopatológicos dos efeitos da metaloprotease BtaHF sobre músculo gastrocnêmio de camundongo

A figura 31 mostra os efeitos de diferentes doses (2,5; 10 e 20 μ g/animal) da metaloprotease BtaHF sobre o músculo gastrocnêmio de camundongo. A figura 31B mostra que com doses de 2,5 μ g/animal da BtaHF não produziu hemorragia interfibrilar (40x), as fibras musculares estavam intactas, bem como a parede vascular, ainda que se observa uma zona de degradação (retângulo). É importante assinalar que foi observada a presença de neutrófilos nos vasos sanguíneos, assim como, alguns deles migrando para o tecido ao redor. Na dose de 10 μ g (figura 31C, 40x) observou-se a degradação da parede de um vaso sanguíneo (retângulo), a metaloprotease BtaHF produziu hemorragia na periferia do fascículo muscular (dado não mostrado) e infiltrado inflamatório principalmente de neutrófilos. Com uma dose de 20 μ g (figura 31D, 40x) a BtaHF produz uma intensa hemorragia no tecido muscular (setas pretas), importante infiltrado inflamatório (principalmente neutrófilos, setas azuis), mas não observou-se necrose das células musculares, as quais encontraram-se intactas.

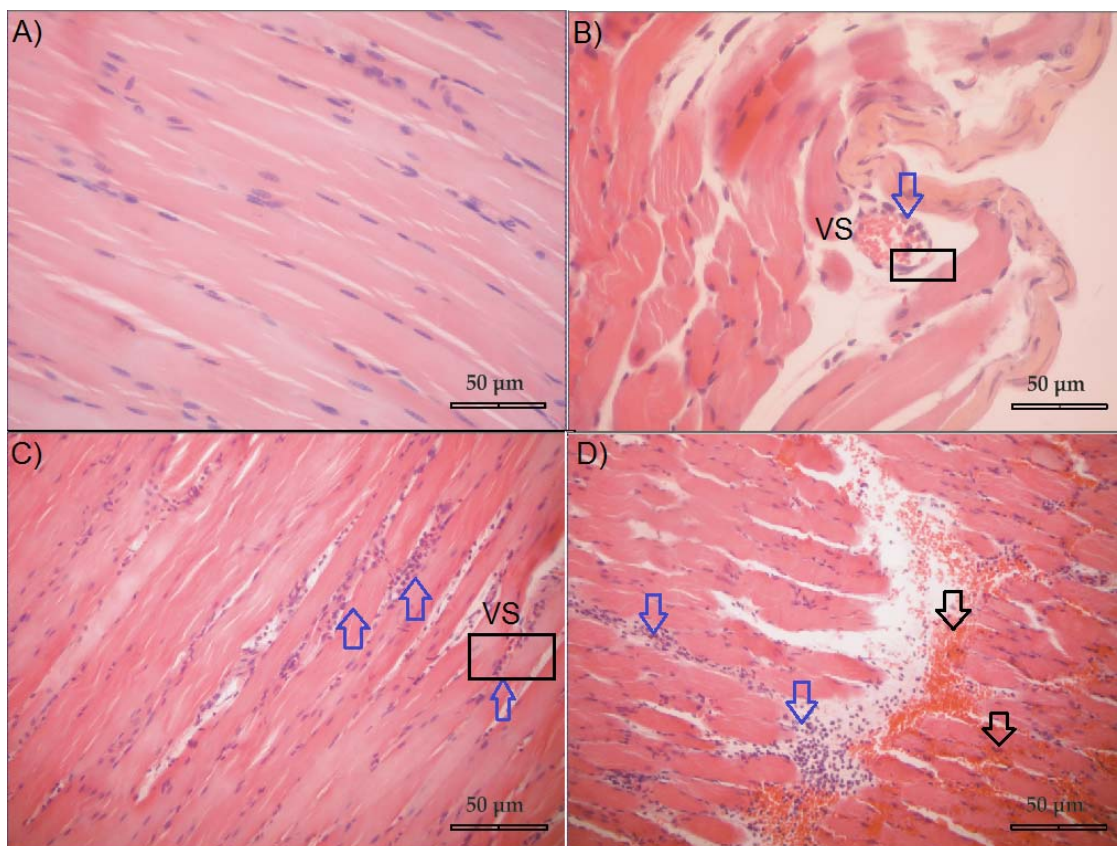


Figura 31. Microfotografias de microscopia de luz de músculo de gastrocnêmico de camundongo com varias doses da metaloprotease BtaHF. (A) Controle, tecido normal (40X), (B) 2,5µg (40X): é observada estrutura tissular normal sem hemorragia, presença de neutrófilos no vaso sanguíneo (VS) e saindo dele além de degradação da parede vascular (retângulo), (C) 10µg (40X): estrutura mio-fibrilar normal com pequena hemorragia (retângulo), e elevada infiltração inflamatória (setas azuis), (D) 20µg (40X): Hemorragia (seta preta) com abundante infiltração de neutrófilos (seta azul).

4.17.10. Estudos histopatológicos dos efeitos da metaloprotease BtaHF em pulmão de camundongo

A figura 32 mostra os efeitos sistêmicos da metaloprotease BtaHF em pulmão de camundongo. A figura 32A (controle) mostra o corte histológico do parênquima pulmonar normal, nele pode-se observar os alvéolos, espaço alveolar (EA), pneumócitos tipo 1 (seta branca) e pneumócitos tipo 2 (seta preta), assim como um vaso sanguíneo (VS). Com dose de 20 μ g/animal a BtaHF produz hemorragia no parênquima pulmonar, alteração da estrutura alveolar e espessamento dos septos interalveolares (figura 32B). Com aumento de 20X (Figura 32C) podemos observar com maior detalhe a hemorragia no parênquima produzida pela metaloprotease. Com o aumento de 40X (Figura 32D) pode-se observar o espessamento dos septos pulmonares, a diminuição da luz alveolar e infiltração inflamatória.

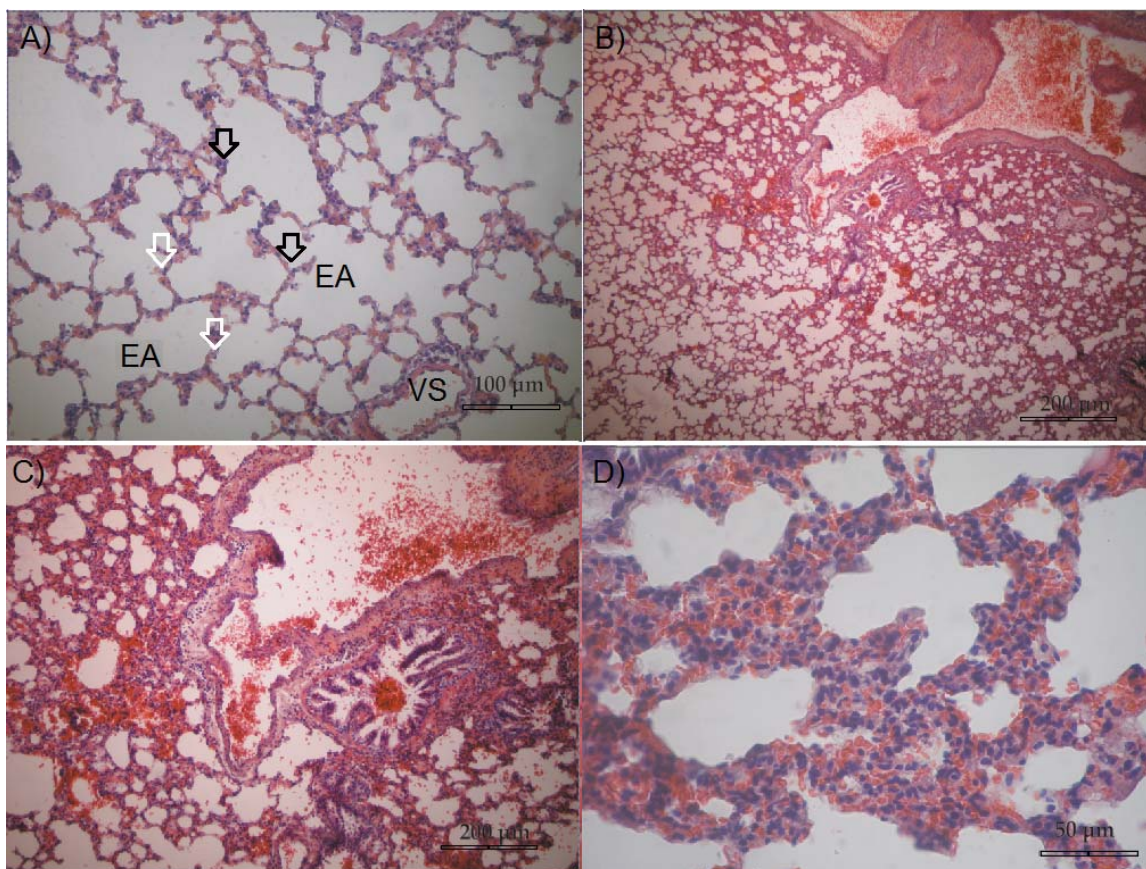


Figura 32. Microfotografias de microscopia de luz de pulmão de camundongo. (A) Controle (20X) parênquima pulmonar normal (EA: Espaço alveolar; VS: Vaso sanguíneo), mostrando os pneumócitos tipo 1 (seta branca) e os pneumócitos tipo 2 (seta preta). 20 μ g da metaloprotease BtaHF foram injetados i.v. em camundongos pela veia caudal, após 2 horas foi obtido tecido pulmonar, feito os cortes histológicos foram corados com HE e observados a diferentes aumentos. (B) 10X, (C)20X e (D) 40X.

4.17.11. Estudos histopatológicos dos efeitos da metaloprotease BtaHF em rim de camundongo

Na figura 33A (20X) é mostrado o corte histológico do rim de camundongo não tratado. Observam-se os glomérulos (G), o túbulo proximal (TP, seta preta) e distal (TD, seta branca). A metaloprotease BtaHF também produziu algumas alterações ao nível do rim de camundongo com 20µg/animal. A metaloprotease não produziu lesões aparentes na estrutura do glomerulo ou hemorragia (figura 33B, 20X), mas observou-se moderada degeneração citoplasmática do tecido renal que apresentou algumas alterações estruturais, principalmente inclusões citoplasmáticas nas células do túbulo distal e proximal (figura 33B, setas vermelhas). Com maior aumento (40X; figura 33C) confirmou-se a degeneração citoplasmática das células tubulares (setas azuis) além de inclusões citoplasmáticas (setas vermelha), e comparado com o controle, a metaloprotease produziu alteração estrutural do tecido, mas não foi observada hemorragia.

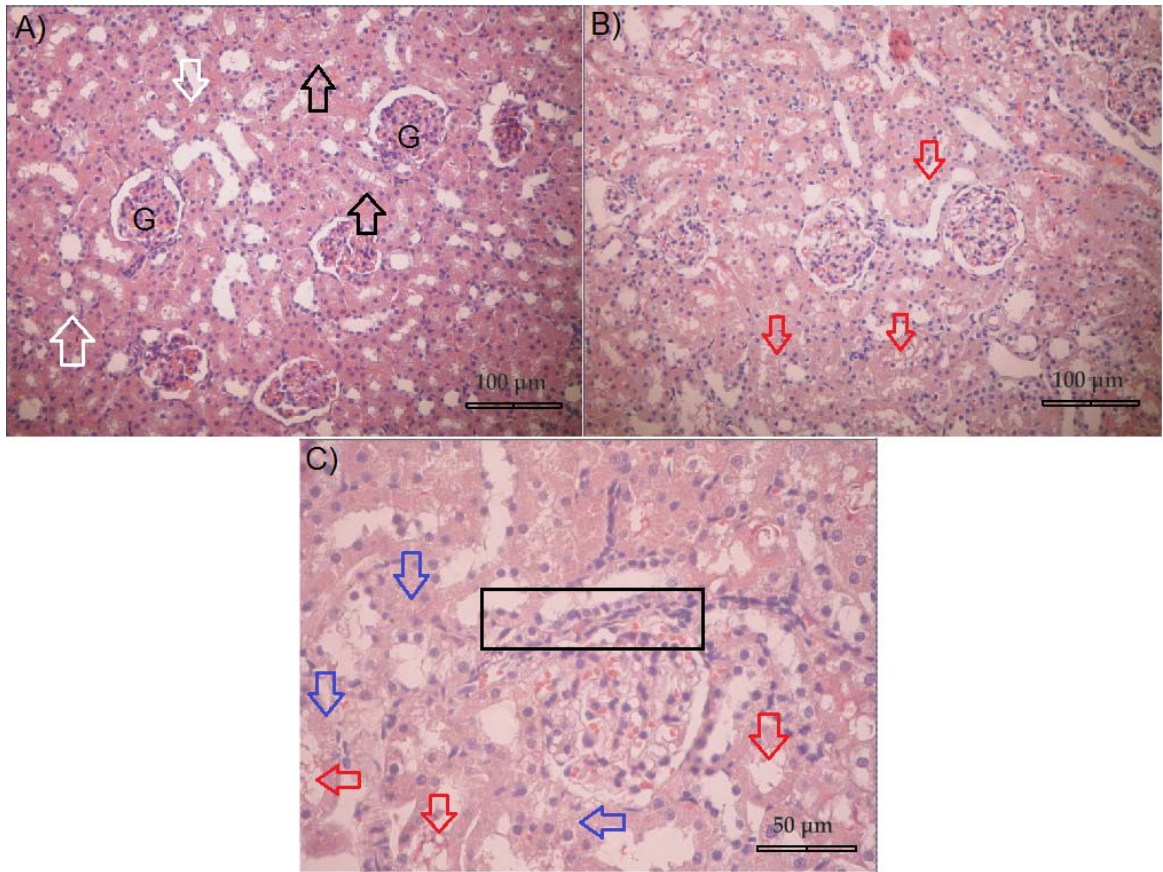


Figura 33. Microfotografias de microscopia de luz de rim de camundongo. (A) Controle (40X): estrutura do glomérulo (G) normal e a cápsula de Bowman (setas vermelhas). Pode-se observar os túbulo próximo (seta preta) e distal (seta branca). 20µg da metaloprotease BtaHF foram injetados i.v. em camundongos pela veia caudal, após 2 horas foi obtido tecido renal e feitos os cortes histológicos corados com coloração HE e observados a diferentes aumentos (B) 20X e (C) 40X: moderada degeneração citoplasmática nas células dos túbulos proximal e distal (Setas azuis). Inclusões citoplasmáticas (setas vermelhas). A mácula densa é mostrada dentro do retângulo.

4.17.12. Estudos histopatológicos dos efeitos da metaloprotease BtaHF em fígado de camundongo

Contrariamente ao observado nos pulmões e rim, a metaloprotease BtaHF não produziu nenhum efeito hepático. Na figura 34A (controle, 40X) observou-se o e parênquima hepático com estrutura normal. Nesse campo se observou duas veias centrais (VC) com eritrócitos no interior delas, sinusóides hepáticas com eritrócitos neles (setas pretas), pode-se diferenciar as células de Kupffer (setas azuis) e hepatócitos (setas brancas). Com 20 μ g/animal e após duas horas, a metaloprotease BtaHF não produziu lesões aparentes ou hemorragia no tecido hepático (figura 35B, 40X), observou-se nesse campo que as sinusóides possuem integridade estrutural normal com eritrócitos (setas pretas) assim como a veia central (VC), também, com eritrócitos, o qual é considerado normal.

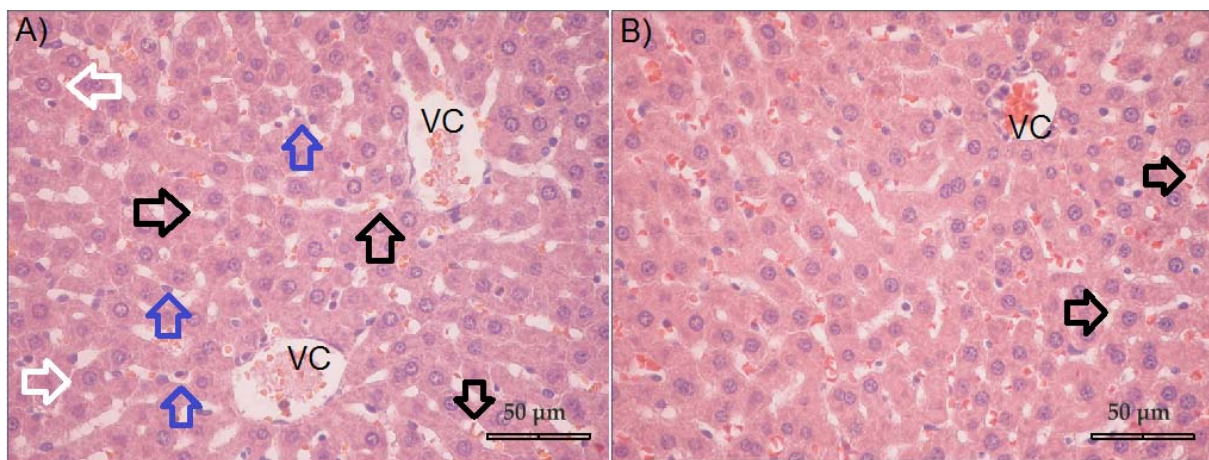


Figura 34. Microfotografias de microscopia de luz de fígado de camundongo. (A) Controle (40X): estrutura parenquimática hepática normal, mostrando as veias centrais (VC), sinusoides hepáticas (seta preta), células de Kupffer (seta azul) e hepatócitos (seta branca). (B) 20 μ g da metaloprotease BtaHF foram injetados i.v. em camundongos pela veia caudal, após 2 horas foi obtido tecido hepático e feitos os cortes histológicos corados com coloração HE e observado aumento de 40X.

4.17.13. Efeito da metaloprotease BtaHF sobre os níveis do fibrinogênio plasmático de camundongo

Os efeitos da metaloprotease BtaHF sobre os níveis do fibrinogênio plasmático foram analisados *in vivo*. A figura 35 mostra que os níveis plasmáticos do fibrinogênio foram reduzidos rapidamente de forma dose-dependente. Cinco microgramas da metaloprotease BtaHF reduziram os níveis de fibrinogênio plasmático em 55% aproximadamente, enquanto 20µg produziram uma redução de 86% num período de 15 minutos após a inoculação. Trinta minutos após a inoculação, os níveis de fibrinogênio plasmático foram zerados (tempo de coagulação > 600 segundos). Após uma hora, as duas doses de BtaHF produziram redução total da concentração de fibrinogênio plasmático, o qual não foi observada recuperação até duas horas depois da inoculação.

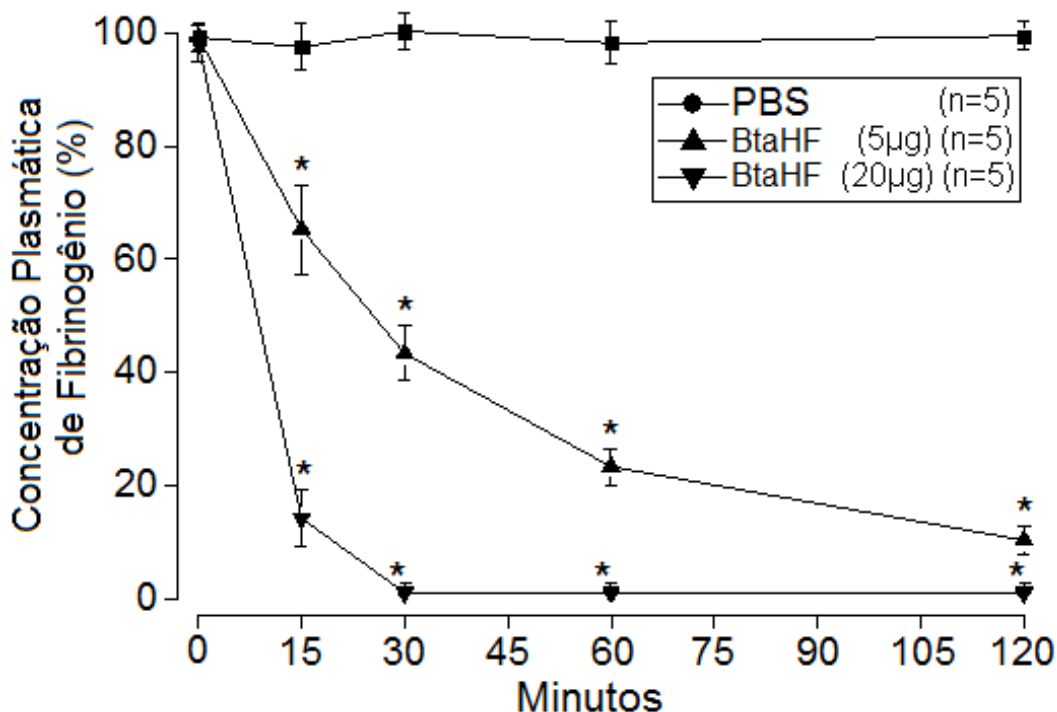


Figura 35. Níveis do fibrinogênio plasmático de camundongo após administração i.v. da metaloprotease BtaHF. PBS (●), BtaHF: 5 µg (▲) e 20 µg (▼). Os valores foram expressos como porcentagem comparado com o controle da média de três determinações ±SEM. * Diferença significativa ($p < 0,05$).

4.17.14. Efeitos *in vitro* da metaloprotease BtaHF sobre Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada (APTT) e Tempo de Protrombina (PT)

A metaloprotease BtaHF mostrou atividade pró-coagulante quando incubada com plasma citratado de camundongo. A figura 36A mostra redução significativa ($p= 0,000234$) dose-dependente do Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada. Com quantidades acima de $0,25\mu\text{g}$ da metaloprotease, o APTT foi reduzido para tempos de coagulação 8,37 e 7,57 segundos, respectivamente, indicando ativação da via intrínseca da coagulação. Por outro lado, na figura 36B observa-se que a metaloprotease BtaHF tem um efeito menos intenso sobre o Tempo de Protrombina, pois a redução do indicador aconteceu de maneira significativa com quantidades de 1 e $5\mu\text{g}$.

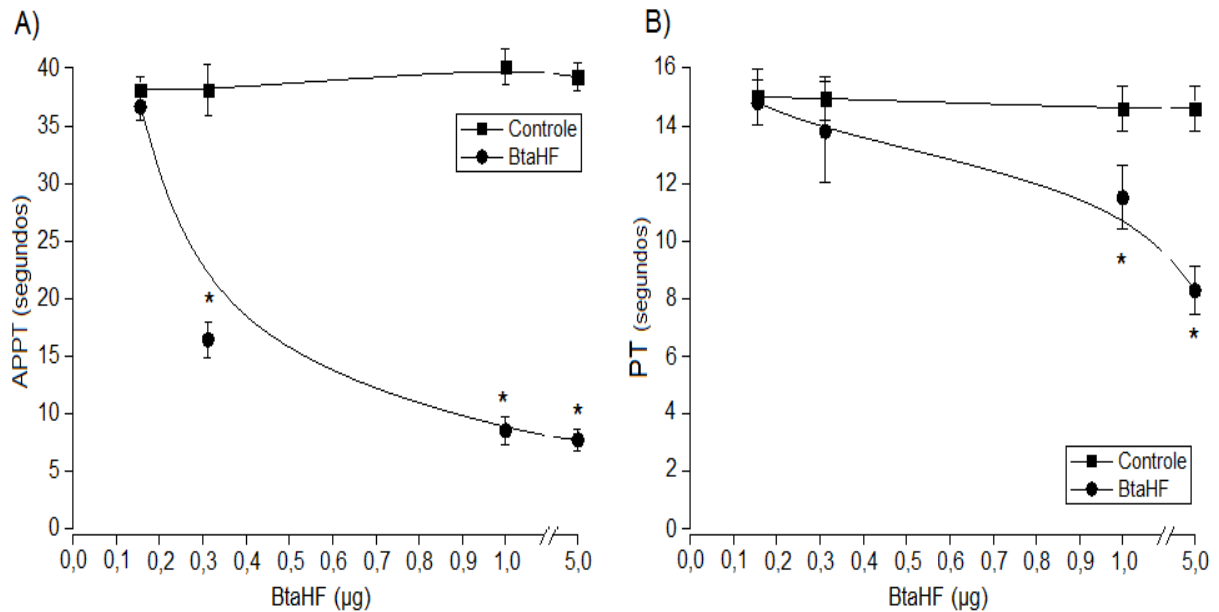


Figura 36. Efeitos pró-coagulantes da metaloprotease BtaHF. (A) Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada (APTT) e (B) Tempo de Protrombina (PT). PBS (■) ou variadas quantidades da metaloprotease ($0,25\text{--}5\mu\text{g}$; ●) foram preincubadas com plasma citratado de camundongo por 1 minuto a 37°C , logo foi determinado o APTT ou PT. Os resultados foram expressos em segundos pela média de 5 determinações \pm SEM. * Diferença significativa ($p < 0,05$).

V. DISCUSSÃO

As metaloproteases de veneno de serpentes são uma das principais famílias de proteínas que compõem os venenos ofídicos, sendo aproximadamente 32% do conteúdo total de proteínas (Álape-Giron *et al.*, 2008; Angulo *et al.*, 2008; Fox & Serrano, 2009).

Este estudo teve como objetivo avaliar as características funcionais e estruturais, assim como os efeitos locais e sistêmicos de uma metaloprotease purificada a partir do veneno bruto de *Bothriopsis taeniata*. A purificação e caracterização de metaloproteases com atividade hemorrágica a partir de venenos ofídicos foram iniciadas em 1960 com a caracterização de duas frações hemorrágicas do veneno da serpente *Trimeresurus flavoviridis* (Ohsaka *et al.*, 1960). Atualmente existem descritas na literatura acima de 200 metaloproteases de veneno de serpente, das quais quase a maioria são metaloproteases da classe P-I e P-III (Fox & Serrano, 2008).

Os métodos descritos na literatura para a purificação de metaloprotease a partir de veneno de serpente estão baseados na combinação da cromatografia líquida convencional e de alta eficiência (CLAE) (Gutiérrez *et al.*, 1995a; Berguer *et al.*, 2008; Torres-Huaco *et al.*, 2010). A combinação dos princípios cromatográficos de exclusão molecular e troca iônica é a metodologia comumente usada para a purificação de metaloproteases de veneno de serpente (Sánchez *et al.*, 1991; Gutiérrez *et al.*, 1995b; Tsai *et al.*, 2000; Gomes *et al.*, 2011), mas os princípios de afinidade (Stroka *et al.*, 2005), hidrofobicidade (Mazi *et al.*, 2004) e fase reversa (Torres-Huaco *et al.*, 2010) também foram utilizados com sucesso na purificação dessas proteínas.

No presente estudo a combinação da cromatografia convencional de exclusão molecular usando uma coluna Sephadex G-75 seguida da cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) de troca iônica utilizando uma coluna DEAE Protein-Pak, permitiu a obtenção de uma fração homogênea com atividade proteolítica e hemorrágica nomeada BtaHF.

A escolha do primeiro passo cromatográfico foi baseada na característica físico-química na qual as metaloproteases de veneno de serpente (SVMP) são classificadas, ou seja, sua massa molecular. Como foi mencionado acima, as metaloproteases que pertencem às classes P-I (20-30 kDa) e P-III (50-100 kDa) são as SVMP de maior abundância nos venenos botrópicos (Álape-Giron *et al.*, 2008; Angulo *et al.*, 2008; Calvete *et al.*, 2011), assim a diferença de massa molecular entre as duas classes é um critério importante para a escolha do primeiro passo cromatográfico.

O cromatograma de exclusão molecular (Figura 7) mostra a presença de 5 picos, nomeados Bta I até Bta V. Foi determinado que as frações Bta I e Bta II apresentam atividades proteolítica e hemorrágica, essas atividades foram inibidas pelo quelante EDTA. Esses resultados sugerem que o veneno de *Botriopsis taeniata* possui metaloproteases de alta e baixa massa molecular, as quais tem uma grande probabilidade de pertencer às classes PI e P-III.

Na literatura, a avaliação da atividade proteolítica dos venenos ofídicos, das frações isoladas e das toxinas purificadas foram realizadas pelo uso do substrato protéico caseína (Lomonte & Gutiérrez, 1983) e seus derivados, como a azocaseína (Charney & Tomarelli, 1947; Wang & Huang, 2002) ou a N’N’ dimetilcaseína (Li *et al.*, 1969; Sánchez *et al.*, 2003). Sabe-se que a caseína é um substrato protéico não específico e que as duas classes de proteases presentes no veneno de serpente (Metaloprotease e Serinoproteases) agem cataliticamente sobre ela. A discriminação entre as duas classes de proteases é feita pela utilização de inibidores sintéticos ou proteicos (Cominetti, 2007).

O objetivo do presente trabalho foi estudar as metaloproteases de baixa massa molecular. A fração Bta II, pelo tempo de retenção observado no cromatograma de exclusão molecular (Figura 7), sugere a presença de proteínas de baixa e media massa molecular. Estes dados junto a atividade proteolítica e hemorrágica observadas para a fração sugerem a presença de metaloproteases de baixa massa molecular (Classe P-I), por isso foi selecionada para as próximas etapas de purificação.

O segundo passo cromatográfico foi realizado em um sistema de alta eficiência (CLAE) de troca iônica utilizando uma coluna DEAE Protein-Pak. A fração Bta II foi resolvida em 8 picos principais, nomeados de Bta II-1 ate Bta II-8 (Figura 8). As frações Bta II-1, BtaII4 e BtaII-5 apresentaram atividade caseinolítica inibida pelo EDTA, enquanto o inibidor de serinoproteases PMSF não apresentou efeito inibitório, sugerindo que as frações são ou possuem proteases metal dependentes (Figura 9A), e a atividade caseinolítica da fração Bta II-3 foi inibida unicamente pelo inibidor específico PMSF, sugerindo a presença de ao menos uma serinoprotease (Figura 9A). Por outro lado, apenas a fração BtaII-4 apresentou atividade hemorrágica (Figura 9B).

A fração Bta II-4 obtida no segundo passo cromatográfico foi a única que apresentou uma banda homogênea em condições não-reduzidas e reduzidas (Figura 10A), enquanto, a CLAE de fase reversa em uma coluna C18 μ -Bondapak mostrou um pico simétrico, confirmando a pureza da fração BtaII-4 (Figura 10B). A fração Bta II-4 foi eluída com 57% de tampão B e com um

tempo de retenção de 40 minutos, os quais são parâmetros característicos das metaloproteases de veneno de serpente de baixa massa molecular (Álape-Giron *et al.*, 2008; Calvete *et al.*, 2011).

A partir deste ponto a fração BtaII-4 foi renomeada como BtaHF (*Bothriopsis taeniata* Hemorrhagic Factor) que possui uma massa molecular relativa de 25 kDa (Figura 10A). A massa molecular real da metaloprotease em estudo foi determinada por espectrometria de massa ESI-Q-TOF. O espectro da BtaHF mostrou um pico principal de 25968,1621 Da (Figura 11), o qual confirma o valor determinado na eletroforese em gel de poliacrilamida e é similar à massa molecular de outras metaloproteases de veneno de serpente da classe P-I como LHF-II (Sánchez *et al.*, 1991); BaP1 (Gutierrez *et al.*, 1995b) BlaH1 (Stroka *et al.*, 2005), BnP1 (Baldo *et al.*, 2008); BmooMP α -I (Bernarde *et al.*, 2008), BmHF-1 (Torres-Huaco *et al.*, 2010). A análise detalhada do espectro de massas obtido, mostra a presença de 5 picos menores, com massas muito similares ao pico principal, o qual sugere a presença de isoformas da fração BtaHF (Figura 11),

A fração BtaHF possui grande atividade proteolítica sobre azocaseína como substrato quando comparado com a atividade do veneno total (Figura 12). Além disso, a metaloprotease purificada seria a principal fração responsável pela atividade proteolítica e hemorrágica encontrada na fração Bta II, obtida do primeiro passo de purificação (Figura 9 e Figura 12).

Assim como para outras classes de enzimas, os estudos dos parâmetros cinéticos de temperatura e pH, é de suma importância dentro dos estudos da caracterização bioquímica e estruturais das SVMP. Embora Ownby e cols (1994) descreveram a existência de metaloproteases de veneno de serpente (SVMP), especialmente de baixa massa molecular, nos venenos das espécies *Crotalus ruber*, *C. molosus molosus* e várias espécies do gênero *Agkistrodon* que permanecem funcionalmente viáveis em temperaturas acima de 100 °C, as SVMP são enzimas que mostram estabilidade em faixas estreitas de temperatura, perdendo totalmente a sua atividade enzimática com temperaturas acima de 70°C (Fox & Serrano, 2009). O comportamento enzimático exibido pela fração BtaHF perante diferentes temperaturas (Figura 13) é similar ao descrito para SVMP de baixa massa molecular (Classe P-I). Está descrito na literatura que a faixa de temperatura onde essas enzimas possuem atividade enzimática ótima entre 30 e 40°C. Com temperaturas entre 50 e 70°C a atividade enzimática sofre redução significativa e é completamente inibida com temperaturas acima de 70 °C (Sánchez *et al.*, 1991; Gutiérrez *et al.*, 1995b; Bello *et al.*, 2006; Sun *et al.*, 2006; Torres-Huaco *et al.*, 2010).

O pH, assim como a temperatura, influencia a atividade enzimática das SVMP. Está descrita na literatura que a atividade enzimática ótima das SVMP de qualquer classe ocorre em pH neutro e medianamente alcalino (pH 7-8), com valores de pH acima ou abaixo dessa faixa a atividade enzimática e a atividade hemorrágica são drasticamente reduzidas (Ramos & Selistre de Araujo, 2006; Takeda *et al.*, 2012). A fração BtaHF mostra comportamento similar com outras SVMP de baixa massa molecular perante diversos valores de pH (Figura 13; Gutierrez *et al.*, 1995b; Stroka *et al.*, 2005; Bello *et al.*, 2006; Torres-Huaco *et al.*, 2010). Assim, a fração BtaHF possui atividade caseinolítica na faixa de pH de 7-9, sendo que o pH ótimo da fração está na faixa de 7-8. Com valores de pH acima de 10 e abaixo de 6 a atividade caseinolítica é reduzida (Figura 14). Os resultados mostram que a perda da atividade caseinolítica da fração BtaHF em condições ácidas é mais pronunciada quando comparada com a atividade caseinolítica em condições alcalinas (Figura 14). Esses resultados podem ser explicados devido à formação do nucleófilo hidroxida a partir da desprotonação da molécula de H₂O, que é coordenada pelo átomo de Zinco e o grupo R do ácido glutâmico no sítio catalítico, o que se torna mais difícil de acontecer em condições ácidas (Wu *et al.*, 2009). Em condições alcalinas a perda de atividade caseinolítica seria devido à perda do átomo de Zinco do sítio catalítico na forma de Zn(OH)₂ (Xu *et al.*, 2004), este último processo ocorreria mais devagarosamente em comparação com o que ocorre em condições ácidas.

Desde a década de 70 diversos autores demonstraram que a incubação dos venenos ofídicos com agentes quelantes, como EDTA, inibe completamente a atividade hemorrágica, enquanto, a atividade proteolítica é afetada por agentes quelantes e/ou inibidores específicos de serinoproteases (Friederich & Tu, 1971; Leon *et al.*, 1998; Howes *et al.*, 2007), sugerindo que as duas atividades eram produzidas total ou em parte por enzimas metal-dependentes. Assim, os estudos de inibição utilizando agentes quelantes e inibidores de serinoproteases são necessários para discriminar as atividades biológicas e enzimáticas induzidas por metaloproteases ou serinoproteases presentes nos venenos ofídicos.

Determinadas as condições de temperatura e pH ótimas para a uma ótima atividade caseinolítica da fração BtaHF, realizamos os estudos dos efeitos de inibidores. Os resultados mostram que a atividade caseinolítica da fração BtaHF é inibida completamente pelos agentes quelantes EDTA e EGTA, enquanto os inibidores de serinoproteases PMSF e SBT-I não tiveram nenhum efeito (Figura 15). Desta forma os resultados obtidos no monitoramento das etapas de purificação foram confirmados (Figura 9), demonstrando que a fração BtaHF é uma

metaloprotease. A remoção do átomo de Zinco por agentes quelantes induz uma mudança permanente na estrutura secundária de α -Hélice do sítio catalítico das metaloproteases para uma estrutura “coil” (Nikai *et al.*, 1982; Ramos & Selistre de Araujo, 2006). A atividade caseinolítica da metaloprotease BtaHF também depende do enovelamento correto de sua estrutura terciária, pois ao reduzir as pontes dissulfeto internas com o agente redutor DTT a atividade caseinolítica é inibida completamente (Figura 15).

Íons divalentes são componentes importantes dos venenos ofídicos, e agem como cofatores de proteínas como as metaloproteases de veneno de serpente. Análises estruturais mostraram que as SVMP possuem Zn^{+2} , Ca^{+2} e Mg^{+2} como cofatores em proporção de 1:1, 2:1 e 1:1 g/mol de proteína, respectivamente, assim, o íon Zn^{+2} é essencial para a atividade enzimática das SVMP (Fox & Serrano, 2009). No presente trabalho, foram estudados os efeitos de íons divalentes sobre a atividade caseinolítica da metaloprotease BtaHF. Assim como para outras metaloproteases da classe P-I, os resultados mostraram que o íon Ca^{+2} estimula a atividade caseinolítica da metaloprotease BtaHF e que é um efeito dependente da concentração do íon, atingindo efeito máximo em concentrações acima de 1 mM (Figura 16A e 16B). O íon Ca^{+2} aumenta o ordenamento estrutural da proteína ao se ligar à região que se encontra oposta ao sítio catalítico (Gomis-Ruth *et al.*, 1994), o qual produziria o aumento da atividade catalítica (Xu *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2004). Contrariamente, os íons de Zn^{+2} e Mn^{+2} , mostraram efeito inibitório sobre a atividade caseinolítica da BtaHF (Figura 16A). Estudos de dicroísmo circular (DC) mostraram que a presença do Zinco induz uma redução na região do espectro correspondente a α -hélice (Xu *et al.*, 2004) o que produziria a desestabilização da estrutura do motivo metaloprotease no sítio ativo das SVMP e, portanto, perda da atividade catalítica.

As metaloproteases de veneno de serpente possuem atividade proteolítica sobre uma grande variedade de substratos biológicos, especialmente sobre os fatores ou produtos da cascata de coagulação como o fibrinogênio e fibrina, e sobre proteínas que fazem parte da membrana basal dos capilares sanguíneos (Maruyama *et al.*, 1992; Escalante *et al.*, 2011b; Paes Leme *et al.*, 2011). As metaloproteases de veneno de serpente (SVMP) com atividade fibrinogenolítica e/ou fibrinolítica, isto é, degradação de fibrinogênio e fibrina, respectivamente, têm sido descritas na literatura (Markland, 1998; Swenson & Markland, 2005). As metaloproteases de veneno de serpente agem preferencialmente na cadeia $A\alpha$, com menor afinidade pela cadeia $B\beta$ e nenhuma atividade sobre a cadeia γ do fibrinogênio. Assim, as SVMP são classificadas com enzimas α -fibrinogenases (Markland, 1998; Swenson & Markland, 2005).

Nossos resultados mostram que a metaloprotease BtaHF tem atividade fibrigenolítica que depende da quantidade de proteína e do tempo de incubação (Figura 17 e Figura 18). A BtaHF produz degradação completa da cadeia A α do fibrinogênio em baixas quantidades (1,25 μ g, Figura 17) e com um tempo curto de incubação (30 minutos, Figura 18). Enquanto, a degradação completa da cadeia B β aconteceu com quantidades de proteína elevadas ou tempos de incubação prolongados (10 μ g e 9 horas, respectivamente, Figura 17 e Figura 18). Nossos resultados indicam claramente que a metaloprotease BtaHF mostrou preferência pela cadeia A α do fibrinogênio, o que permite classificá-la como uma α -fibrinogenase com grande afinidade pelo fibrinogênio, similar à exibida pela Batroxase (*B. atrox*, Cintra *et al.*, 2012). A BtaHF possui atividade fibrigenolítica maior quando comparada com outras metaloproteases de baixa massa molecular com atividade hemorrágica, como LHF-II (Sánchez *et al.*, 1991), BaP1 (Gutierrez *et al.*, 1995b), BaHF (Stroka *et al.*, 2005). Interessantemente, a metaloprotease em estudo não degradou a fibrina (Figura 19), mesmo com quantidades relativamente elevadas (20 μ g) e com tempo de incubação prolongado (18 horas), quando comparada com outras metaloproteases de baixa massa molecular, o que sugere que a BtaHF possui baixa afinidade pela fibrina.

Os substratos derivados do cromóforo *p*-nitroanilina são comumente usados para os estudos cinéticos da atividade catalítica de proteases. A ligação entre o cromóforo e um aminoácido, como o ácido aspártico no caso do substrato BApNA, imita a ligação peptídica, assim, quando a enzima proteolítica age sobre o substrato libera o cromóforo o qual pode ser lido em um comprimento de onda de 405nm (Erlanger *et al.*, 1961). A metaloprotease BtaHF não possui atividade sobre o substrato BApNA quando comparada com a atividade das serinoproteases Ba III-4 (*B. alternatus*, Ponce-Soto *et al.*, 2007), embora o veneno total e a fração BtaII apresentem tal atividade (Figura 20). Os resultados obtidos sugerem a presença, na fração BtaII, de ao menos uma enzima pertencente à família das serinoprotease de veneno de serpente. Segundo os estudos preliminares de atividade proteolítica (Figura 9) a fração BaII-3 pertenceria à família das serinoproteases. A inatividade da metaloprotease BtaHF perante o substrato BApNA é consistente com o comportamento de outras metaloproteases das classes P-I e P-III (Gutierrez *et al.*, 1995b; Chen *et al.*, 2008; Torres-Huaco *et al.*, 2010). Este comportamento é explicado pela especificidade na quebra da ligação peptídica das metaloproteases, o qual requer que na ligação peptídica esteja presente um aminoácido hidrofóbico na posição P1', especialmente leucina, (Yamakawa *et al.*, 1988; Ramos & Selistre de Araujo, 2006; Paes Leme *et al.*, 2011). Assim, o substrato BApNA pode ser utilizado como mais uma ferramenta para a discriminação entre

serinoproteases e metaloproteases de veneno de serpente e a verificação de que a fração BtaHF não estaria contaminada com serinoproteases.

Até agora os resultados obtidos na bioquímica, atividade enzimática sobre diferentes substratos e os estudos de inibição permitem classificar a fração BtaHF como uma metaloprotease de veneno de serpente da classe P-I. Para a confirmação da classificação sugerida para a metaloprotease BtaHF foram realizados estudos de composição de aminoácidos e determinação da sequência dos peptídeos internos da proteína. As metaloproteases de veneno de serpente da classe P-I são caracterizadas pela baixa massa molecular, entre 20 e 30 kDa, e são constituídas entre 170 e 230 aminoácidos, com o número de cisteínas entre 4 e 8, com a possível formação de 2, 3 ou 4 pontes dissulfeto (Bjarnason & Fox, 1994; Fox & Serrano, 2005). A análise de composição de aminoácidos mostrou que a metaloprotease BtaHF apresenta aproximadamente 218 aminoácidos e massa molecular teórica de 23990,99 Da que é similar a determinada por espectrometria de massas (Tabela 2). A presença de 6 resíduos de cisteína sugere a possível formação de 3 pontes dissulfetos, o qual é comparável com outras metaloproteases da classe P-I como a BaP1 (Gutierrez *et al.*, 1995b) e outras (Fox & Serrano, 2005). A BtaHF possui um número elevado de resíduos Asx (30) e Glx (18) em comparação com o número total de resíduos básicos (24 resíduos). A informação fornecida pelo comportamento da metaloprotease BtaHF perante a coluna de troca iônica do segundo passo cromatográfico, permitem deduzir que a maioria dos resíduos Asx e Glx encontram-se na forma de Asp e Glu, o que conferiria caráter ácido à proteína. O ponto isoelétrico teórico para a proteína de 5,95 confirmaria o caráter ácido da metaloprotease BtaHF.

As metaloproteases de veneno de serpente pertencem à família das reprotinas, que incluem as proteínas ADAM's, que por sua vez, são membros da superfamília das Metzincinas. Os membros dessa superfamília possuem a sequência consenso HEXGHXXGXXHD que contém o sítio catalítico e, aproximadamente 24 resíduo depois, a sequência CIM motivo "Met-turn" ou "Giro-metionina" (do qual deriva o nome da superfamília, Stöcker & Bode, 1995; Fox & Serrano, 2005, Ramos & Selistre de Araujo, 2006). Os resultados da digestão triptica da metaloprotease BtaHF foram 8 peptídeos cujas massas foram identificadas por ESI-MS (Figura 21). O sequenciamento desses peptídeos mostrou a presença do motivo metaloprotease (peptídeo 7) e do motivo "Giro-metionina" (peptídeo 2), e o estudo de homologia sequencial mostrou alta identidade sequencial com metaloproteases da classe P-I hemorrágicas como BaP1 (Watanabe *et al.*, 2003) e LHF-II (Sánchez *et al.*, 1991b), confirmando a conclusão baseada nos dados

bioquímicos e enzimáticos que a BtaHF pertence a família das metaloproteases de veneno de serpentes da classe P-I.

As metaloproteases de veneno de serpentes da família *Viperidae* produzem efeitos locais e sistêmicos. O dano no tecido local é caracterizado por hemorragia, edema, mionecrose, dermonecrose e formação de bolhas; enquanto os efeitos sistêmicos incluem hemorragia, degradação ou ativação dos fatores de coagulação e inibição da agregação plaquetária (Gutierrez & Rucavado, 2000). O presente estudo avaliou a capacidade da metaloprotease da classe P-I BtaHF em produzir hemorragia local, edema e miotoxicidade, assim como, os efeitos sistêmicos.

O veneno de *Bothriopsis taeniata* possui atividade hemorrágica com uma Dose Hemorrágica Mínima (DHM) de 5,34µg/animal (Figura 23A), a qual é considerada significativa quando comparada com a atividade hemorrágica de outras espécies dos gêneros *Bothrops*, *Crotalus* e *Lachesis* (Soto *et al.*, 1988; Gutierrez *et al.*, 1995b; Rucavado *et al.*, 1999; Selistre de Araujo, 2007). Originalmente desenhado na década de 60 (Kondo *et al.*, 1960) para quantificar a potência hemorrágica em coelhos, o experimento para determinar a dose hemorrágica mínima têm sido modificado para usar camundongos como modelo experimental (Gutierrez *et al.*, 1985). A atividade hemorrágica dos venenos ofídicos é produzida exclusivamente por metaloproteases (Gutierrez *et al.*, 2005; Escalante *et al.*, 2011b). A determinação da DHM da metaloprotease BtaHF mostrou que a atividade hemorrágica é aproximadamente 4 vezes menor, quando comparada com o veneno total (20,32µg/animal, Figura 23B) e a atividade hemorrágica esta relacionada com a atividade enzimática e o correto enovelamento da enzima, uma vez que a pré-incubação com agentes quelantes (EDTA e EGTA) e redutores (DTT) inibiram completamente a atividade hemorrágica (Figura 24).

Os dados obtidos do perfil biológico da primeira etapa de purificação sugere a presença de ao menos uma metaloprotease de alta massa molecular (Classe P-III) no veneno de *Bothriopsis taeniata* (Figura 7), a qual seria a responsável pela atividade hemorrágica do veneno dessa espécie. Os resultados de DHM para a metaloprotease BtaHF são esperados sendo que metaloproteases da classe P-I possuem atividade hemorrágica fraca quando comparada com membros da classe P-III. Isto é devido à presença dos domínios “Desintegrina-símile” e “Rico em Cisteína” na estrutura dos membros da classe SVMP P-III, os quais são fundamentais para a elevada potência hemorrágica (Bjarnason & Fox, 1995; Ramos & Selistre de Araujo, 2006; Fox & Serrano, 2009). Além disso, estudos recentes mostraram que os domínios adicionais das SVMP da classe P-III têm a função de fornecer especificidade de localização sobre parede

vascular, e catalítica sobre regiões específicas de componentes proteicos chave da membrana basal, como o domínio G2 da entactina (ponto de ligação de laminina, colágeno tipo IV e perlecan), que permitiria a desestabilização da estrutura da membrana basal da parede vascular potencializando o efeito hemorrágico. Embora, as SVMP P-I com atividade hemorrágica possuam atividade proteolítica elevada sobre outros componentes da membrana basal, como laminina, não catalisam regiões chave, como a região G2 do nidogeno, o que permitira à parede vascular manter certo grau de integridade estrutural (Figura 37; Escalante *et al.*, 2006; Baldo *et al.*, 2008; Baldo *et al.*, 2010, Escalante *et al.*, 2011a; 2011b).

Embora a atividade hemorrágica da metaloprotease BtaHF seja fraca quando comparada com o veneno total de *B. taeniata* ou com metaloproteases da classe P-III, tal atividade é comparável com outras metaloproteases da classe P-I classificadas como hemorrágicas, LHF-II (*Lachesis muta muta*, Sanchez *et al.*, 1991), BaP1 (*Bothrops asper*, Gutierrez *et al.*, 1995b), BlaH1 (*B. lanceolatus*, Stroka *et al.*, 2005), Batx-I (*B. atrox*, Patiño *et al.*, 2012), as quais possuem DHM na faixa de 10-20µg. A existência de SVMP P-I com variada potência hemorrágica ou que não produzem hemorragia, mesmo em concentrações elevadas (Neuwidase, Rodrigues *et al.*, 2000; BleucMP, Gomes *et al.*, 2011) sugere a existência de determinantes estruturais no domínio metaloprotease, podendo contribuir com a variação da atividade hemorrágica dos membros da classe P-I. Wallnoefer e cols (2010) propuseram que o “loop” que contém o motivo “Giro-metionina” em metaloproteases hemorrágicas da classe P-I é altamente flexível quando comparado com metaloproteases não hemorrágicas, o que contribuiria à maior atividade sobre diversos substratos proteicos, o que poderia explicar a diferença da atividade hemorrágica entre os membros da classe P-I (Escalante *et al.*, 2011a).

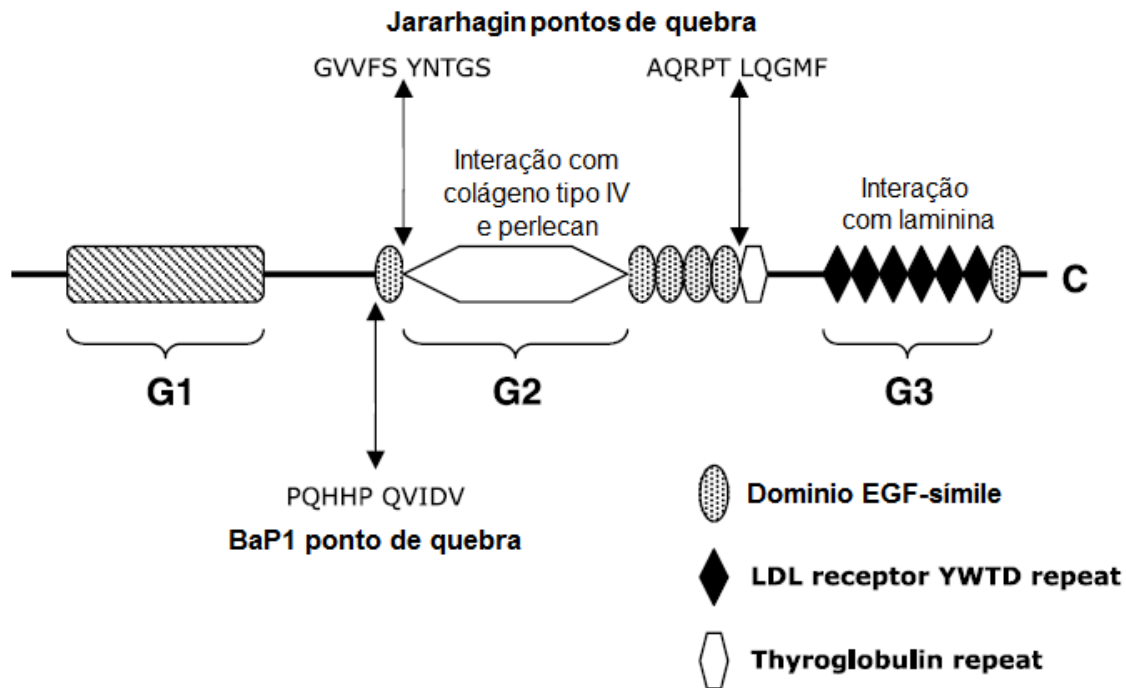


Figura 37. Atividade proteolítica e especificidade de quebra das metaloproteases Jararhagin (P-III) e BaP1 (P-I) sobre a proteína da membrana basal nidogênio (adaptado de Escalante *et al.*, 2006).

Os efeitos inflamatórios induzidos pelos venenos botrópicos, são produzidos pela ação de SVMP e PLA₂ (Gutierrez & Rucavado, 2000; Teixeira *et al.*, 2005). A SVMP P-I BaP1 foi a primeira metaloprotease purificada na qual foi reportado o efeito edematogênico no modelo coxim plantar de camundongo (Gutierrez *et al.*, 1995b), desde então, a relevância da atividade das SVMP no efeito pro-inflamatório dos venenos ofídicos é evidente (Teixeira *et al.*, 2005; Zychar *et al.*, 2008). A BtaHF possui alta atividade edematogênica no modelo coxim plantar de camundongo, a qual é dose e tempo dependente (Figura 25). Ainda com baixas doses (2,5 µg/animal) a metaloprotease produz efeito edematogênico. O efeito edematogênico foi máximo para todas as doses testadas após 3 horas da injeção. A dose dependência da atividade edematogênica da metaloprotease BtaHF foi observada ao longo do experimento. Seis horas após a injeção da metaloprotease o edema começou a declinar, após 9 horas o edema produzido com doses de 2,5 e 5µg reduziu significativamente ($p = 0,0159$), enquanto com dose de 10µg o edema ainda foi significativo. Finalmente, após 24 horas não foi observado efeito edematogênico, embora com a dose de 10µg, a pata que recebeu o tratamento mostrou ainda aumento do diâmetro. Esse aumento se mostrou suave ao tato, sem turgência pelo qual não foi considerado como edema. Pré-incubação com o agente quelante EDTA e o agente redutor DTT inibiram a

atividade edematogênica exibida pela metaloprotease BtaHF, de maneira similar à atividade hemorrágica, o que sugere relação com a atividade proteolítica assim como do correto envelhecimento da enzima (Figura 26).

A atividade edematogênica da metaloprotease BtaHF é similar em intensidade e durabilidade à exibida por SVMP hemorrágicas da classe P-I, como BaP1 (Gutierrez *et al.*, 1995b) e LHF-II (Rucavado *et al.*, 1999). Por outro lado, o edema exibido por SVMP P-I que possuem baixa ou nenhuma atividade hemorrágica, como Leucorolysin a (Gremsky *et al.*, 2007), BjussuMP-II (Marcussi *et al.*, 2007) e BthMP (Gomes *et al.*, 2009), é menos intenso e tem curta duração. Embora existam diferenças na intensidade e durabilidade da atividade edematogênica produzida por SVM P-I hemorrágicas e não hemorrágicas, os mecanismos de ação que produzem essa atividade é similar. Um primeiro mecanismo é o aumento da permeabilidade da parede vascular devido à degradação de proteínas da membrana basal, como laminina e colágeno tipo IV, o que produziria o extravasamento de plasma para os tecidos adjacentes (Rodriguez *et al.*, 2001; Gremsky *et al.*, 2006; Escalante *et al.*, 2011a). Um segundo mecanismo envolveria o recrutamento de leucócitos (especialmente neutrófilos), degranulação de mastócitos e a indução de citocinas pró-inflamatórias como IL-1 β , IL-6, e TNF- α , assim como a ativação do sistema complemento. Estes mecanismos estariam ligados à atividade proteolítica das SVMP P-I, já que são inibidos pela pré-incubação com agentes quelantes (Rucavado *et al.*, 1999; Rodriguez *et al.*, 2001; Rucavado *et al.*, 2002; Fernandes *et al.*, 2006; Lopes *et al.*, 2009; Zychar *et al.*, 2010).

Miotoxicidade e mionecrose são outros efeitos locais que as SVMP produzem, os quais são secundários, produto da hipóxia tissular devido à hemorragia (Gutierrez & Rucavado, 2000). A metaloprotease BtaHF não produziu miotoxicidade no músculo gastrocnêmio quando injetados em doses de 20 e 30 μ g/animal, enquanto 5 μ g do veneno total de *B. taeniata* produz miotoxicidade significativa (Figura 27). Interessantemente, SVMP P-I com ou sem atividade hemorrágica, mostraram atividade miotóxica moderada quando injetados em músculo gastrocnêmio de camundongo. Embora, os efeitos miotóxicos são produzidos com elevadas quantidades de toxina SVMP P-I hemorrágicas, a quantidade de toxina foi tipicamente duas ou três vezes a dose hemorrágica mínima (Gutierrez *et al.*, 1995b; Rucavado *et al.*, 1999; Patiño *et al.*, 2010) enquanto, SVMP P-I não hemorrágicas como Neuwidase (Rodriguez *et al.*, 2001), BjussuMP-II (Marcussi *et al.*, 2007) e BnP1 (Baldo *et al.*, 2008) produziram miotoxicidade com doses na faixa de 100-200 μ g/animal.

Embora a metaloprotease BtaHF não tenha sido capaz de induzir miotoxicidade nas doses de 20 e 30µg/animal, nossos resultados dos estudos de citotoxicidade usando a linhagem celular C2C12, claramente mostram que a metaloprotease foi capaz de induzir citotoxicidade em forma dose-dependente (Figura 28B-F). As mudanças morfológicas observadas nas células C2C12 e a elevação de LDH no meio de cultura (Figura 29) foram compatíveis com o processo de apoptose. A citotoxicidade observada produzida pela metaloprotease em estudo foi devido a perda da ancoragem das células no meio de cultura (Figura 30), o que induziria as células iniciar o processo de apoptose/anoikis (Brenes *et al.*, 2010). O mecanismo de citotoxicidade exibida por outras metaloproteases é decorrente da hipótese do desprendimento celular. Em baixas concentrações, metaloproteases como leucorolysin-a (Gremsky *et al.*, 2007), balthergin (Gay *et al.*, 2007), Jararhagin e BnP1 (Baldo *et al.*, 2008) exibem o mecanismo acima descrito sobre diversas linhagens celulares. Efeitos citotóxicos diretos das metaloproteases sobre células são produzidos com elevadas concentrações de proteína (Gremsky, *et al.*, 2007). Importante ressaltar que o efeito citotóxico produzido pelas metaloproteases pode ser aumentado sinergicamente pela ação de PLA₂ (Bustillo *et al.*, 2012), assim, a miotoxicidade exibida pelo veneno total de *Bothriopsis taeniata* poderia ser resultado do efeito combinado das atividades de fosfolipases A₂ e metaloproteases, dentre elas a BtaHF, presentes na composição do veneno dessa serpente.

Estudos histológicos do efeito da metaloprotease BtaHF sobre o músculo gastrocnêmio de camundongo confirmaram nossos resultados sobre a atividade hemorrágica e edematogênica da metaloprotease em estudo (Figura 31B-D). A BtaHF não induziu nenhuma alteração da estrutura das fibras musculares nas doses estudadas, o que confirma os dados de miotoxicidade. No entanto, pode-se observar que os efeitos locais principais produzidos pela metaloprotease BtaHF são hemorragia e pró-inflamatórios, os quais mostraram ser dose dependentes (Figura 31B-D). A BtaHF induz processos inflamatórios a baixas doses, principalmente pelo recrutamento de neutrófilos e pela formação de edema, o qual seria produzido pela degradação parcial da parede vascular (Figura 31B-C retângulos). Essas observações histológicas estão de acordo com os resultados obtidos no modelo coxim plantar de camundongo. Com 10 e 20µg de BtaHF pode se observar que a infiltração de neutrófilos e o edema é significativa (Figura 31B-D). Por outro lado, a hemorragia foi observada unicamente com doses de 10 e 20µg (Figura 31C-D), o que sugeriria que o efeito pró-inflamatório seria a função primária nos efeitos locais induzido pela metaloprotease BtaHF.

Os efeitos locais apresentados pela BtaHF são corroborados em parte pela literatura para metaloproteases P-I com atividade hemorrágica. Portanto, hemorragia e efeitos pró-inflamatórios são efeitos comuns observados após a injeção no músculo gastrocnêmio de camundongo de BaP1 (Rucavado *et al.*, 1995), LHF-II (Rucavado *et al.*, 1999), BthMP (Gomes *et al.*, 2009). No entanto, em metaloproteases não hemorrágicas como BleucMP (Gomes *et al.*, 2011) e Neuwidase (Rodriguez *et al.*, 2001) o efeito pró-inflamatório foi a principal observação, ainda que neuwidase, produza hemorragia com doses de 200µg. Contrariamente, a metaloprotease BtaHF não induz necrose das fibras musculares, um efeito que todas as metaloproteases da classe P-I acima nomeadas mostraram, obtendo esse efeito somente com elevadas doses de toxina, o que indicaria que a mionecrose e miotoxicidade não seria um efeito no qual as SVMP P-I estariam envolvidas considerando a composição do veneno ofídico.

Envenenamentos induzidos por serpentes da família Viperidae são associados com marcante hemorragia local e sistêmica. A nível sistêmico, as alterações mais importantes são perturbação da hemostasia sanguínea, insuficiência renal e respiratória aguda, choque e sepsis (White, 2005). As metaloproteases de veneno de serpentes possuem papel importante nas alterações sistêmicas observadas nos acidentes ofídicos. O principal efeito sistêmico produzido pelas SVMP é a hemorragia sistêmica de variada intensidade, o qual depende de fatores como: 1) a sua capacidade hemorrágica intrínseca; 2) resistência à atividade inibitória de proteínas plasmáticas como as macroglobulinas; 3) especificidade devido à presença dos domínios desintegrina-simile e rico em cisteína e 4) a habilidade de interferir com os mecanismos de hemostase sanguínea (Escalante *et al.*, 2003).

Com as considerações acima descritas, os resultados mostraram que a SVMP da classe P-I BtaHF possui a capacidade de produzir hemorragia moderada no tecido pulmonar (Figura 32 B-D). A alteração produzida no tecido pulmonar pela BtaHF é consistente com a descrita para outras metaloproteases da classe P-I como neuwidase (*Bothrops neuwidii*, Rodriguez *et al.*, 2001) e da classe P-III como jararhagina (*B. jararaca*, Escalante *et al.*, 2003) e baltergin (*B. alternatos*, Gay *et al.*, 2009). Assim, a hemorragia observada poderia ser devido à exposição da microvasculatura pulmonar à toxina após injeção intravenosa. Diferente das metaloproteases P-III, com dose de 20µg, a BtaHF não produziu “spots” hemorrágicos na superfície pulmonar e a intensidade da hemorragia observada na análise histológica é bem menor quando comparada com as SVMP da classe P-III jararhagina e baltergina (Escalante *et al.*, 2003; Gay *et al.*, 2009). A hemorragia foi acompanhada por congestão do septo alveolar assim como infiltrado inflamatório

o que produziu notável redução do espaço alveolar (Figura 32D). A diferença da SVMP P-I neuwidase, a BtaHF produz hemorragia pulmonar em doses 10 vezes menor, o qual estaria associado à potência hemorrágica exibidas pelas toxinas. A diferença de outras metaloproteases da classe P-I que são inibidas pela α_2 -macroglobulina (Baramova *et al.*, 1990; Estevão-Costa *et al.*, 2000) é que a metaloprotease BtaHF poderia não ser inibida por essa ou outras proteínas plasmáticas, o qual poderia explicar seu efeito hemorrágico sistêmico.

Ao mesmo tempo, foram analisados os efeitos de BtaHF sobre o tecido renal e hepático. E contrariamente ao encontrado no tecido pulmonar, a metaloprotease não produz hemorragia em nenhum dos tecidos analisados (Figura 33 e Figura 34). Análise detalhada dos cortes histológicos do tecido renal mostrou que embora não houvesse hemorragia, quando comparada com o controle (Figura 33A), a estrutura geral do tecido renal encontra-se alterada (Figura 33B). A presença de inclusões citoplasmáticas nas células que conformam os túbulos contornado proximal e distal, seriam consistentes com citotóxicidade (Figura 33C). É interessante que em altas doses neuwidase não produz efeitos sobre o tecido renal (Rodriguez *et al.*, 2001), o que sugere a existência de determinantes estruturais no domínio metaloprotease que confira especificidade por tecidos determinados. Esta hipótese parece possível ao analisar os cortes histológicos do tecido hepático, onde BtaHF não produziu nenhuma alteração tecidual (Figura 34B). No entanto, a SVMP P-I BleucMP (*B. leucurus*, Gomes *et al.*, 2011) produz desorganização do tecido, além de moderado infiltrado inflamatório em doses nas quais BtaHF não produz hemorragia.

Os venenos ofídicos possuem toxinas com variado efeito sobre o sistema hemostático sanguíneo, incluindo efeitos pró e anticoagulantes e interação com plaquetas que alteram a normal formação do tampão plaquetário (Isbister, 2009). Esses efeitos produzem um quadro clínico conhecido como coagulopatia destrutiva induzida por veneno (Venom-Induced Consumptive Coagulopathy, VICC; Isbister, 2009), que é clinicamente caracterizada pela prolongação dos testes de APTT e PT, e hipofibrinogemia aguda (White, 2005). É conhecido que os venenos ofídicos contêm proteases (SVMP e SVSP) com atividade defibrinante e pro-coagulante. As SVMP exercem efeitos sobre a hemostase sanguínea, agindo diretamente sobre a cascata de coagulação pela ativação ou degradação de fatores da coagulação ou pela interação com plaquetas (White, 2005; Isbister, 2009). Assim foi investigado o efeito da metaloprotease BtaHF sobre a coagulação sanguínea. BtaHF produz rápida queda dos níveis de fibrinogênio plasmático após injeção intravenosa, a qual é dose dependente (Figura 35). Com baixa dose de toxina (5 μ g) a queda dos níveis de fibrinogênio plasmático até valores quase não detectáveis foi

de aproximadamente 1 hora, enquanto, com dose hemorrágica (20 μ g) a queda dos níveis de fibrinogênio até zero, aconteceu meia hora após a inoculação. Esse efeito permaneceu durante todo tempo de experimentação. Estes dados são previsíveis de acordo com a atividade fibrinogenolítica mostrada pela metaloprotease BtaHF (Figura 17 e Figura 18). A defibrigenação, assim como a incoagulabilidade sanguínea induzida pela BtaHF teria um efeito rápido e potente, logo após a toxina circular na corrente sanguínea. A defibrigenação é um dos principais efeitos produzidos por metaloproteases da classe P-I independentemente se apresentam atividade hemorrágica, o consumo total do fibrinogênio plasmático acontece após uma hora (Bernarde *et al.*, 2009; Gomes *et al.*, 2009; Gomes *et al.*, 2011), enquanto SVMP P-III como jarharagina não produzem nenhuma alteração nos valores de fibrinogênio (Escalante *et al.*, 2003), sugerindo que a incoagulabilidade sanguínea produzida pelo consumo do fibrinogênio seria um efeito produzido principalmente pelas SVMP P-I.

O dano aos vasos sanguíneos pode resultar em hemorragia, e é evitado pela hemostasia sanguínea que envolve um processo complexo que acontece em três fases: 1) ativação da hemostasia primária (formação do tampão plaquetário primário); 2) ativação da hemostasia secundária (a formação da rede de fibrina para a estabilização do tampão plaquetário primário) e 3) dissolução do coágulo (fibrinólise) (Lippi & Favalaro, 2008). A formação da rede de fibrina é essencial para a correta formação do coágulo sanguíneo e envolve muitas conversões coordenadas cálcio dependente de proenzimas, terminando na ativação da trombina que é encarregada de transformar o fibrinogênio em fibrina (Davie *et al.*, 1991; Lippi & Favalaro, 2008). O Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada (APPT) e Tempo de Protrombina (PT) são os testes comumente utilizados mundialmente para determinar qualitativamente e quantitativamente o normal funcionamento da cascata de coagulação. Ambos testes podem determinar anormalidades na via comum da cascata de coagulação, no entanto, o APTT verifica a função da “via intrínseca” da coagulação e o PT verifica a função da “via extrínseca” (Bajaj & Joist, 1999; Lippi & Favalaro, 2008).

As metaloproteases de veneno de serpente da classe P-I (White, 2005; Isbister, 2009; Sajevic *et al.*, 2011), como a BtaHF, exercem *in vitro* efeitos pró-coagulantes, assim como foi demonstrado em resultados de APTT e PT. A BtaHF reduz o APTT (Figura 36A) e PT (Figura 36B) de forma dose-dependente, sugerindo que a proteína pode estar agindo na via comum da cascata de coagulação. Já foram descritos na literatura SVMP da classe P-I que ativam a protrombina (Modesto *et al.*, 2005; Senis *et al.*, 2006; Berger *et al.*, 2008), no entanto, as SVMP

da classe P-IIIId RVVX (*Daboia russelli*) e VLFXA (*Vipera lebetina*) são os únicos membros dessa família de proteínas descritos como ativadores da via intrínseca de coagulação (Fator X, Sajevic *et al.*, 2011). Assim, os resultados dos níveis plasmáticos do fibrinogênio, APTT e PT sugerem que a metaloprotease BtaHF é fator importante na produção do quadro VICC induzido pelo veneno de *B. taeniata* (Torrez *et al.*, 2010).

Os resultados obtidos no presente estudo oferecem uma visão geral dos efeitos biológicos produzidos pela metaloprotease BtaHF e permitem sugerir o seu papel na patogênese induzida pelo veneno de *B. taeniata*. Assim, a BtaHF tem papel importante no dano local induzindo efeitos pró-inflamatórios agudos como edema, mediante o relaxamento da parede vascular por degradação parcial, da ação de citocinas pró-inflamatórias e da hemorragia induzida por esta proteína. No contexto do veneno total de *B. taeniata*, os efeitos locais induzidos pela BtaHF agiriam sinergicamente com os produzidos por proteínas como PLA₂ o que conduziria a rápida imobilização e captura da presa.

A nível sistêmico a metaloprotease BtaHF teria o papel de manter a hemorragia produzida por metaloproteases da classe P-III presentes no veneno de *B. taeniata*. A manutenção da hemorragia pelo rápido consumo de fatores de coagulação como fibrinogênio e a ativação da cascata de coagulação o que produziria o quadro clínico de incoagulabilidade sanguínea (VICC), contribuindo, também, na produção de hemorragia sistêmica. Assim, a BtaHF seria a protagonista de severos danos sistêmicos que induziriam a eventual morte da presa por choque hipovolêmico (hemorragia severa) e falha pulmonar aguda.

Sob a luz de nossos resultados e da informação presente na literatura podemos sugerir que as funções principais das metaloproteases da classe P-I no envenamento ofídico estão relacionadas a indução de processos inflamatórios e a inibição da hemostasia normal para a manutenção da hemorragia produzida pelas metaloproteases da classe P-I.

VI. CONCLUSÕES

1- Utilizando metodologias otimizadas de purificação através de dois passos cromatográficos (exclusão molecular e HPLC de troca iônica), foi possível purificar uma nova metaloprotease de veneno de serpente da classe P-I partir do veneno total de *Bothriopsis taeniata*, denominada BtaHF, com um alto grau de pureza, homogeneidade molecular e sem perda da atividade biológica.

2- BtaHF possui uma massa molecular de 25968,16 Da, de caráter ácido, e presença de 6 resíduos cisteína. Peptídeos trípticos analisados por espectrometria de massa apresentaram homologia e alta identidade à outras SVMP P-I de veneno de serpente.

3- BtaHF apresentou atividade enzimática ótima em condições medianamente alcalinas e na faixa de 30° e 40°C e requer a presença de Ca^{2+} . A proteína mostra ser dependente do átomo de Zinco para sua atividade enzimática e biológica. A BtaHF possui atividade α -fibrinogenolítica.

4- BaHF produz efeitos locais como hemorragia e edema, mas não induz miotoxicidade embora possua atividade citotóxica.

5- A BtaHF produz efeitos sistêmicos, ao induzir hemorragia e inflamação no tecido pulmonar, assim como efeitos citotóxicos moderados no tecido renal.

6- A BtaHF produz incoagulabilidade sanguínea pelo consumo e/ ou ativação dos fatores da cascata de coagulação.

VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alape-Girón, A., Sanz, L., Escolano, E., Flores-Díaz, M., Madrigal, M., Sasa, M. and Calvete, J. J. (2008). Snake Venomics of the Lancehead Pitviper *Bothrops asper*: Geographic, Individual, and Ontogenetic Variations. *Journal of Proteome Research*. Vol. 7: pags3556–3571.
- Andrews, R. K., Berndt, M. C. (2000). Snake venom modulators of platelet adhesion receptors and their ligands. *Toxicon*. Vol.38: pags775-791.
- Angulo, A., Escolano, J., Lomonte, B., Gutiérrez, J. M., Sanz, L. and Calvete, J. J. (2008). Snake Venomics of Central American Pitvipers: Clues for Rationalizing the Distinct Envenomation Profiles of *Atropoides nummifer* and *Atropoides picadoi*. *Journal of Proteome Research*. Vol. 7: pags708-719.
- Azevedo, L.H., Eduardo, F.P., Moreira, M.S., Eduardo, C.P., Marques, M.M. (2006). Influence of Different Power Densities of LILT on Cultured Human Fibroblasts Growth. A pilot study. *Lasers Med Sci*. 21(2): pags86–89.
- Bajaj, S. P. and Joist H. (1999). New insights into how blood clots: Implications for the use of APTT and PT as coagulation screening test and monitoring of anticoagulant therapy. *Seminars of Thrombosis and Hemostasis*. Vol 25: pags407-418.
- Baldo, C., Tanjoni, I., León, I. R., Batista, I. F. C., Della-Casa, M. S., Clissa, P. B., Weinlich, R., Lopes-Ferreira, M., Lebrun, I., Amarante-Mendes, G. P., Rodrigues, V. M., Perales, J., Valente, R. H., Moura-da-Silva, A. M. (2008). BnP1, a novel P-I metalloproteinase from *Bothrops neuwiedi* venom: Biological effects benchmarking relatively to jararhagin, a P-III SVMP. *Toxicon*, Vol. 51: pags 54-65.
- Baldo, C., Jamora, C., Yamanouye, N., Zorn, T. M., Moura-da-Silva, A. M. (2010). Mechanisms of Vascular Damage by Hemorrhagic Snake Venom Metalloproteinases: Tissue Distribution and *In Situ* Hydrolysis. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. Vol. 4: pags727-.
- Baramova, E. N., Shannon, J. D., Bjarnason, J. B., Gonias, S. L., Fox, J. W. (1990). Interaction of hemorrhagic metalloproteinases with human 2-macroglobulin. *Biochemistry*. Vol. 29: pags1069–1074.
- Baker, B. J., Wongvibulsin, S., Nyborg, J. and Tu, A. T. (1995). Nucleotide sequence encoding the snake venom fibrinolytic enzyme atroxase obtained from a *Crotalus atrox* venom gland cDNA library. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. Vol. 317: pags357-364.

- Bello, C.A., Hermogenes, A. L. N., Magalhaes, A., Veiga, S. S., Gremski, L. H., Richardson, M., Eladio F. Sanchez, E. F. (2008). Isolation and biochemical characterization of a fibrinolytic proteinase from *Bothrops leucurus* (white-tailed jararaca) snake venom. *Biochimie*. Vol. 88: pags189–200.
- Berger, M., Pinto, A. F. M., Guimarães, J. A. (2008). Purification and functional characterization of bothrojaractivase, a prothrombin-activating metalloproteinase isolated from *Bothrops jararaca* snake venom. *Toxicon*. Vol. 51: pags488-501.
- Bernarde, C. P., Santos-Filho, N. A., Costa, T. R., Gomes, M. S. R., Torres, F. S., Costa, J., Borges, M. H., Richardson, M., dos Santos, D. M., de Castro Pimenta, A. M., Homsibrandeburgo, M. I., M. Soares, A. M., de Oliveira, F. (2008). Isolation and structural characterization of a new fibrin(ogen)olytic metalloproteinase from *Bothrops moojeni* snake venom. *Toxicon*. Vol. 51: pags574–584.
- Björnason, J. B. and Fox, J. W. (1994). Hemorrhagic metalloproteinases from snake venoms. *Pharmacology and Therapeutics*. Vol. 62: pags325-372.
- Bidlingmeyer, B. A., Cohen, S. A. and Tarvin, T. L. (1984), Rapid analysis of amino acids using pre-column derivatization. *Journal of Chromatographic*. Vol. 33: pags93-104.
- Bradford, M. M. A. (1976). A rapid sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of Protein-Dye-Bonding. *Analytical Biochemical*. Vol. 72: pags248-254.
- Braud, S., Bon, C., Wisne, A. (2000). Snake venom proteins acting on hemostasis. *Biochimie*. Vol. 82: pags851–859.
- Brenes, O., Munoz, E., Roldan-Rodriguez, R., Diaz, C. (2010). Cell death induced by *Bothrops asper* snake venom metalloproteinase on endothelial and other cell lines. *Exp. Mol. Pathol*. Vol.88: pags424–432.
- Bustillo, S., Gay, C. C., García Denegri, M. E., Ponce-Soto, L. A., Bal de Kier Joffé, E., Acosta, O., Leiva, L. C. (2012). Synergism between baltergin metalloproteinase and Ba SPII RP4 PLA2 from *Bothrops alternatus* venom on skeletal muscle (C2C12) cells. *Toxicon*. Vol. 59: pags338–343
- Calvete J. J., Sanz, L., Pérez, A., Borges, A., Vargas, A. M., Lomonte, B., Angulo, Y., Gutiérrez, J. M., Chalkidis, C.M. (2011). Snake population venomomics and antivenomics of *Bothrops atrox*: Paedomorphism along its transamazonian dispersal and implications of geographic venom variability on snakebite management. *Journal of Proteomics*. 74: pags510 – 527.

- Campbell, J.A., Lamar, W.W. (2004). *The Venomous Reptiles of the Western Hemisphere*. 2 volumes. Comstock Publishing Associates, Ithaca and London. pp870.
- Castro H. C., Zingali, R. B., Albuquerque, M. C., Pujol-Luz, M. and Rodrigues, C. R. (2004). Snake venom thrombin-like enzymes: from reptilase to now. *Cellular and Molecular Life Sciences*. Vol. 61: pags843-856.
- Charney, J. and Tomarelli, R. M. (1947). A colorimetric method for the determination of the proteolytic activity of duodenal juice. *The Journal of Biological Chemistry*. Vol. 171: pags501-505.
- Chen, H-S., Tsai, H-Y., Wang, Y-M., Tsai, I-H. (2008). P-III hemorrhagic metalloproteinases from Russell's viper venom: Cloning, characterization, phylogenetic and functional site analyses. *Biochimie*. Vol. 90: pags1-13.
- Chowdhury, M. A. R., Miyoshi, S. C. and Shinoda, S. (1990). Purification and characterization of a protease produced by *Vibrio mimicus*. *Infection and immunity*. Vol. 58: pags4159-4162.
- Cintra, A.C.O., De Toni, L.G.B., Sartim, M. A., Franco, J. J., Caetano, R. C., Murakami, M. T., Sampaio, S.V. (2012). Batroxase, a new metalloproteinase from *B. atrox* snake venom with strong fibrinolytic activity. *Toxicon*. Vol. 60: pags70–82.
- Clissa, P. B., Laing, G. D., Theakston, R. D., Mota, I., Taylor, M. J., Moura-da-Silva, A. M. 2001. The effect of jararhagin, a metalloproteinase from *Bothrops jararaca* venom, on proinflammatory cytokines released by murine peritoneal adherent cells. *Toxicon*. Vol. 39: pags1567-1573.
- Cominetti, M. R. (2007). Caracterização da atividade proteolítica de toxinas e uso de inibidores, in: Selistre de Araújo, H. S; Ferreira de Souza, D. H. (Eds.), *Métodos em Toxinologia: toxinas de Serpentes*. EdUFSCAR. São Carlos. Brazil. pags45-51.
- Damico, D.C., Lilla, S., de Nucci, G., Ponce-Soto, L.A., Winck, F.V., Novello, J.C., Marangoni, S. (2005). Biochemical and enzymatic characterization of two basic Asp49 phospholipase A2 isoforms from *Lachesis muta muta* (Surucucu) venom. *Biochimica et Biophysica Acta*. Vol. 1726: pags75–86.
- Davie, E. W., Fujikawa, K. and Kisiel, W. (1991). *The Coagulation Cascade: Initiation, Maintenance and Regulation*. *Biochemistry*. Vol. 30: pags10363-10370.
- Dennis, E. A. (2000). Phospholipase A₂ in eicosanoid generation. *American Journal of Respiration and Critical Care Medicine*. Vol. 161: S32-5.

- Du, X. Y. and Clemetson, K. J. (2002). Snake venos L-amino acid oxidases. *Toxicon*. Vol. 40: pags659-665.
- Erlanger B. F., Kokowsky, N., Cohen W. (1961).The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. Vol. 95: pags271-278.
- Escalante, T., Núñez, J., Moura da Silva, A., Rucavado, A., Theakston, R. D. G. and Gutiérrez, J. M. (2003). Pulmonary hemorrhage induced by jararhagin, a metalloproteinase from *Bothrops jararaca* snake venom. *Toxicology and Applied Pharmacology*. Vol. 193: pags17–28.
- Escalante, T., Shannon, J., M. Moura-da-Silva, A. M., Gutiérrez, J. M., Fox, J. W. (2006). Novel insights into capillary vessel basement membrane damage by snake venom hemorrhagic metalloproteinases: A biochemical and immunohistochemical study. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. Vol. 455: pags144–153.
- Escalante, T., Ortiz, N., Rucavado, A., Sanchez, E.F., Richardson, M., Fox, J. W., Gutiérrez, J. M. (2011a). Role of Collagens and Perlecan in Microvascular Stability: Exploring the Mechanism of Capillary Vessel Damage by Snake Venom Metalloproteinases. *PLoS ONE*. Vol. 6(12): pagse28017-e28017.
- Escalante, T., Rucavado, A., Fox, J. W., Gutiérrez, J. M. (2011b). Key events in microvascular damage induced by snake venom hemorrhagic metalloproteinases. *Journal of Proteomics*. Vol. 74: 1781-1794.
- Estevao-Costa, M. I., Diniz, C. R., Magalhaes, A., Markland, F. S., Sanchez, E. F., 2000. Action of metalloproteinases mutalysin I and II on several components of the hemostatic and fibrinolytic systems. *Thrombosis Research*. Vol. 99: pags363–376.
- Fernandes, C. M., Zamuner, S. R, Zuliani, J. P., Rucavado, A., Gutiérrez, J. M., Teixeira C. F. (2006). Inflammatory effects of BaP1 a metalloproteinase isolated from *Bothrops asper* snake venom: Leukocyte recruitment and release of cytokines. *Toxicon*. Vol. 47: pags549–559.
- Fox, J. W. and Serrano, S. M. T. (2005). Structural considerations of the snake venom metalloproteinases, key members of the M12 reprotolysin family of metalloproteinases. *Toxicon*. Vol. 45: pags969-985.

- Fox, J. W. and Serrano, S. M. T. (2008). Insights into and speculations about snake venom metalloproteinase (SVMP) synthesis, folding and disulfide bond formation and their contribution to venom complexity. *The FEBS Journal*. Vol. 275: pags3016–3030.
- Friederich, C. and Tu, A. (1971). Role of metals in snake venoms for hemorrhagic, esterase and proteolytic activities. *Toxicon*. Vol. 20: pags1549-1556.
- Fox, J. W. and Serrano, S. M. T. (2009). Timeline of key events in snake venom metalloproteinase research. *Journal of Proteomics*. Vol. 72: pags200 – 209.
- Fry, B. G., Vidal, N., Norman, J. A., Vonk, F. J., Scheib, H., Ramjan, S. F. R., Kuruppu, S., Fung, K., Hedges, B., Richardson, M. K., Hodgson, W. C., Ignjatovic, V., Summerhayes, R. and Kochva, E. (2006). Early evolution of the venom system in lizards and snakes. *Nature*. Vol. 439: pags584-588.
- Gay, C. C., Leiva, L. C., Marunāk, S., Teibler, P., Acosta de Pérez, O. (2005). Proteolytic, edematogenic and myotoxic activities of a hemorrhagic metalloproteinase isolated from *Bothrops alternatus* venom. *Toxicon*. Vol. 46: pags546–554.
- Gay, C. C., Maruñak, S. L., Teibler, P., Ruiz, R., Acosta de Pérez O. C., Leiva, L. C. (2009). Systemic alterations induced by a *Bothrops alternatus* hemorrhagic metalloproteinase (baltergin) in mice. *Toxicon*. Vol. 53: pags53-59.
- Gené, J. A., Roy, A., Rojas, G., Gutit?rrez, J. M. and Cerdas, L. (1989) Comparative study on coagulant, defibrinating, fibrinolytic and fibrinogenolytic activities of Costa Rican crotaline snake venoms and their neutralization by a polyvalent antivenom. *Toxicon*. Vol. 27: pags841-848.
- Gomes, M. S., Mendes, M. M., de Oliveira, F., de Andrade, R. M., Bernardes, C.P., Hamaguchi, A., de Alcântara, T.M., Soares, A.M., Rodrigues, V.M., Homs-Brandeburgo, M. I. (2009). BthMP: a new weakly hemorrhagic metalloproteinase from *Bothrops moojeni* snake venom. *Toxicon*. Vol. 53(1): pags24-32.
- Gomes, M. S., de Queiroz, M. R; Mamede, C, C, N; Mendes, M. M; Hamaguchi, A; Homs-Brandeburgo, M. I; Sousa, M. V; Aquino,E. N; Castro, M. S; de Oliveira, F; Rodrigues, V. M. (2011). Purification and functional characterization of a new metalloproteinase (BleucMP)from *Bothrops leucurus* snake venom. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C* Vol. 153: pags290–300.
- Gomis-Rüth, F.X., Kress, L.F., Kellermann, J., Mayr, I., Lee, X., Huber, R., Bode, W. 1994. Refined 2.0 Å X-ray crystal structure of the snake venom zinc-endopeptidase adamalysin

- II. Primary and tertiary structure determination, refinement, molecular structure and comparison with astacin, collagenase and thermolysin. *Journal Molecular Biology*. Vol. 239: pags513-544.
- Grams, F., Huber, R., Kress, L. F., Moroder, L., Bode, W. (1993). Activation of snake venom metalloproteinases by a cysteine switch-like mechanism. *FEBS Journal*. Vol. 335: pags76-80.
- Gremski, L.H., Chaim, O. M., Paludo, K. S. Y., Sade, Y. B., Otuki, M. F., Richardson, M., Gremski, W., Sanchez, E. F., Veiga S. S. (2007) Cytotoxic, thrombolytic and edematogenic activities of leucurolysin-a, a metalloproteinase from *Bothrops leucurus* snake venom. *Toxicon*, Vol. 50: pags120-134.
- Gutiérrez, J. M., Gene, J. A., Rojas, G., Cerdas, L. (1985). Neutralization of proteolytic and hemorrhagic activities of Costa Rican snake venom by a polyvalent antivenom. *Toxicon*. Vol. 23: pags887-893.
- Gutierrez, J. M. and Lomonte, B. (1995a). Phospholipase A₂ Myotoxins From Bothrops Snake Venoms. *Toxicon*, Vol. 33(11): pags. 1405-1424.
- Gutierrez, J. M., Romero, M., Diaz, C., Borkow, G. and Ovadia, M. (1995b). Isolation and characterization of a metalloproteinase with weak hemorrhagic activity from the venom of the snake *Bothrops asper* (terciopelo). *Toxicon*. Vol. 33: pags19-29.
- Gutiérrez, J. M., Romero, M., Núñez, J., Chaves, F., Borkow, G., Ovadia, M. (1995c). Skeletal muscle necrosis and regeneration after injection of BaH1, a hemorrhagic metalloproteinase isolated from the venom of the snake *Bothrops asper* (terciopelo), *Experimental and Molecular Pathology*. Vol. 62: pags28–41.
- Gutiérrez, J. M., Rucavado, A. (2000). Snake venom metalloproteinases: Their role in the pathogenesis of local tissue damage. *Biochimie*. Vol. 82: pags841–850.
- Gutiérrez, J. M. (2002). Comprendiendo los venenos de serpientes: 50 años de investigaciones en América Latina. *Revista de Biología Tropical*. Vol. 50: pags377-394.
- Gutiérrez, J. M., Rucavado, A., Escalante, T., Díaz, C. (2005). Hemorrhage induced by snake venom metalloproteinases: biochemical and biophysical mechanisms involved in microvessel damage. *Toxicon*. Vol. 45: pags997–1011.
- Isbister, G. K. (2009). Procoagulant Snake Toxins: Laboratory Studies, Diagnosis, and Understanding Snakebite Coagulopathy. *Seminars of Thrombosis and Hemostasis*. Vol. 35: pags93–103.

- Hati, R., Mitra, P., Sarker, S. and Bhattacharyya, K. K. (1999). Snake Venom Hemorrhagins. *Critical Reviews in Toxicology*. Vol. 29: pags1–19.
- Henrikson, R. L. & Meredith, S. C. (1984). Amino acid analysis by reverse phase high-performance liquid chromatography: precolumn derivatization with phenylthiocyanate. *Analytical Biochemistry* 13: p.65-72.
- Hite, L. A., Shannon, J. D., Björnason, J. B. and Fox, J. W. (1992). Sequence of a DNA clone encoding zinc metalloproteinase hemorrhagic toxin e from *Crotalus atrox*: evidence for signal, zymogen and disintegrin-like structures. *Biochemistry*. Vol. 31: pags6203-6211.
- Howes, J.-M., Theakston, R. G. D; Laing, G. D. (2007). Neutralization of the haemorrhagic activities of viperine snake venoms and venom metalloproteinases using synthetic peptide inhibitors and chelators. *Toxicon*. Vol. 49: pags734–739.
- Iwanaga, S., Oshima, G., Suzuki, T. (1976). Proteinases from the venom of *Agkistrodon halys blomhoffi*. *Methods in Enzymology*. Vol. 45: pags459-68.
- Jia, L. G., Wang, X. M., Shannon, J. D., Björnason, J. B., Fox, J. W. (1997). Function of disintegrin-like/cysteine-rich domains of atrolysin A. Inhibition of platelet aggregation by recombinant protein and peptide antagonists. *Journal of Biological Chemistry*. Vol. 272: pags13094–13102.
- Kalluri, R. (2003). Basement membranes: structure, assembly and role in tumor angiogenesis. *Nature Reviews Cancer*. Vol. 3: pags422–433.
- Kamiguti, A. S., Zuzel, M. and Theakston, R. G. D. (1998). Snake venom metalloproteinases and disintegrins: interactions with cells. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. Vol. 31: pags853-862.
- Karpati, G., Carpenter, S., Melmed, C., Eisen, A. A. (1974). Experimental ischemic myopathy, *Journal of Neurological Science*. Vol. 23: pags129–161.
- Keeling, W. B., Armstrong, P. A., Stone, P. A., Bandyk, D. F. and Shames, M. L. (2005) Overview of Matrix Metalloproteinases in the Pathogenesis and Treatment of Abdominal Aortic Aneurysms. *Vascular and Endovascular Surgery*. Vol. 39(6): pags
- Kini R. M. (2003); Excitement ahead: structure, function and mechanism of snake venom phospholipase A₂ enzymes. *Toxicon*. Vol. 42(8): pags827-840.
- Kini, R. M., Zhang, C. Y. and Tan, B. K. H. (1997). Pharmacological activity of the interdomain segment between metalloproteinase and disintegrin domains. *Toxicon*. Vol. 35(4): pags529-535.

- Koh, D. C. I., Armugam, A. and Jeyaseelan, K. (2006). Snake venom components and their applications in biomedicine. Cellular and Molecular Life Sciences. Vol. 63: pags3030–3041.
- Kondo, H., Kondo, S., Ikezawa, H., Murate, R., Ohsaka, A., 1960. Studies on the quantitative method for determination of hemorrhagic activity of Habu snake venom. Japan Journal of Molecular Science Biol. Vol. 13: pags43–51.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. Nature. Vol. 227: pags680–685.
- León, G., Estrada, R., Chaves, F., Rojas, G., Ovadia, M., Gutiérrez, J.M. (1998). Inhibition by CaNa₂EDTA of local tissue damage induced by *bothrops asper* (terciopelo) venom: application in horse immunization for antivenom production. Toxicon. Vol. 36(2): pags321-331.
- Lin, Y., Means, G. E. and Feeney, R. E. (1969). The Action of Proteolytic Enzymes on N, N-DimethylProteins: BASIS FOR A MICROASSAY FOR PROTEOLYTIC ENZYMES. The Journal of Biological Chemistry. Vol. 244(4): pags789-793.
- Lippi, G. and Falavero, E. J. (2008). Activated Partial Thromboplastin Time: New Tricks for an Old Dogma. Seminars of Thrombosis and Hemostasis. Vol 34: pags604–611.
- Li, Y., Means, G. E. and Feeney, R. E. (1969). The Action of Proteolytic Enzymes on N, N-DimethylProteins: basis for a microassay for proteolytic enzymes. The Journal of Biological Chemistry. Vol. 244: pags789-793.
- Li, R., Zhu, R., Wu, J., Wang, W., Lu, Q. and Clemetson, K. J. (2008). L-amino acid oxidase from *Naja atra* venom activates and binds to human platelets. Acta Biochimica Biophysica Sinica. Vol. 40: pags19-26.
- Lomonte, B. and Gutierrez, J. M. (1983). Proteolytic activity of snake venoms of Costa Rica on casein. Revista de Biología Tropical. Vol. 31: pags37-40.
- Lomonte, B., Angulo, Y., Calderón. (2003). An overview of lysine-49 phospholipase A₂ myotoxins from crotalid snake venoms and their structural determinants of myotoxic action. Toxicon. Vol. 42: pags885–901.
- Lopes, D.S., Baldo, C., Oliveira, C.F., Alcântara, T.M., Oliveira, J.D., Goullart, L.R., Hamaguchi, A., Honsi-Brandeburgo, M.I., Moura-da-Silva, A.M., Clissa, P.B., Rodrigues, V.M., 2009. Characterization of inflammatory reaction induced by

- neuwiedase, a P-I metalloproteinase isolated from *Bothrops neuwiedi* venom. *Toxicon* 54, 42–49.
- Lopes-Martins, R. A. B., Marcos, R. L., Leonardo, P. S., Prianti, Jr.A. C., Muscará, M. N., Aimbire, F., Frigo, L., Iversen, V. V., Bjordal, J.M. (2006). Effect of low-level laser (Ga-Al-As 655 nm) on skeletal muscle fatigue induced by electrical stimulation in rats. *Journal of Applied Physiology*. Vol. 101: pags283–288.
- Lu, Q., Clemetson, J. M. and Clemetson, J. (2005). Snake venom and hemostasis. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. Vol. 3: pags1791-1799.
- Marcussi, S; Bernardes, C. P; Santos-Filho, N. A; Mazzi, M. V; Oliveira, C. Z; Izidoro, L. F. M; Fuly, A. L; Magro, A. J; Braz, A. S. K; Fontes, M. R. M; Giglio, J. G; Soares, A. M. (2007). Molecular and functional characterization of a new non-hemorrhagic metalloprotease from *Bothrops jararacussu* snake venom with antiplatelet activity. *Peptides*. Vol. 28: pags2328-2339.
- Markland, F. S. (1998). Snake Venoms and the Hemostatic System. *Toxicon* 36: 1749-1800
- Maruyama, M., Sugiki, M., Yoshida, E., Shimaya, K., Mihara, H. (1992). Broad substrate specificity of snake venom fibrinolytic enzymes: possible role in haemorrhage. *Toxicon*. Vol. 30(11): pags1387-1397.
- Matsui, T., Fujimura, Y., Titani, K. (2000) Snake venom proteases affecting hemostasis and thrombosis. *Biochimica et Biophysica Acta*. Vol. 1477: pags146-156.
- Mazzi, M. V., Marcussi, S., Carlos, G. B., Stábelic, R. G., Franco, J. J., Ticli, F. K., Cintra, C. O. A., França, S. C., Soares, A. M., Sampaio, S. V. (2004). A new hemorrhagic metalloprotease from *Bothrops jararacussu* snake venom: isolation and biochemical characterization
- McDiarmid, R. W., Campbell, J. A. and Touré, T. A. (1999). Snake species of the world. Vol. 1. Herpetologists' League, 511 pp.
- McLean, R. L., Massaro, E.J., Elliot, W.B., Olivera, B.M. (1971). A comparative study of the homology of certain enzymes in elapide venoms. *Comparative Biochemistry and Physiology*. Vol. 39B: pags1023-1037.
- Michalany, J. Técnica histologica em anatomia patologica. São Paulo: Ed. Pedagógica e Universitária. 1980. 277p.
- Ministério de Saúde. (2001). Manual de Diagnóstico e Tratamento de Acidentes por Animais Peçonhentos. Ministério de Saúde & FUNASA. Brasília. Brasil.

- Ministério de Saúde. (2008). ACIDENTES OFÍDICOS. Guia de Vigilância Epidemiológica: Caderno 14. Ministério de Saúde. Brasil.
- Modesto, J. C., Junqueira-de-Azevedo, I. L., Neves-Ferreira, A. G., Fritzen, M., Oliva, M. L., Ho, P. L., Perales, J., Chudzinski-Tavassi, A. M. (2005). Insularinase A, a prothrombin activator from *Bothrops insularis* venom, is a metalloprotease derived from a gene encoding protease and disintegrin domains. *Biological Chemistry*. Vol. 386: pags589-600.
- Montecucco, C., Gutierrez, J. M., and Lomonte, B. (2008). Cellular pathology induced by snake venom phospholipase A₂ myotoxins and neurotoxins: common aspects of their mechanisms of action. *Cellular and Molecular Life Sciences*. Vol. 65: pags2897 – 2912.
- Moura-da-Silva, A. M., Ramos, O. H. P., Baldo, C., Niland, S., Hansen, U., Ventura, J. S., Furlan, S., Butera, D., Della-Casa, M. S., Tanjoni, I., Clissa, P. B., Fernandes, I., Chudzinski-Tavassi, A. M., Eble, J. A. (2008). Collagen binding is a key factor for the hemorrhagic activity of snake venom metalloproteinases. *Biochimie*. Vol. 90: pags484-492.
- Nikai, T., Ishizaki, H., Tu, A. and Sugihara, H. (1982). Presence of zinc in proteolytic hemorrhagic toxin isolated from *Agkistrodon acutus* venom. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*. Vol. 72: pags103-106.
- Ohsaka, A., Ikesawa, H., Kondo, H., Kondo, S., Uchida, N. (1960). Hemorrhagic activities of habu snake venom and their relations to lethal toxicity, proteolytic activities and other pathological activities. *Brazilian Journal of Experimental Pathology*. Vol. 41: pags478-486.
- Ownby, C. L., Nikai, T., Imai, K., Sugihara, H. (1990). Pathogenesis of hemorrhage induced by bilitoxin, a hemorrhagic toxin isolated from the venom of the common cantil (*Agkistrodon bilineatus bilineatus*), *Toxicon*. Vol. 28: pags837–846.
- Ownby, C., Colberg, T. R. and Li, Q. (1994). Presence of heat-stable hemorrhagic Toxins in snake venoms. *Toxicon*, Vol. 32: pags945-954.
- Paes Leme, A. F., Escalante, T., Pereira, J. G., Oliveira, A. K., Sanchez, E. F., Gutiérrez, J. M., Serrano, S. M., Fox, J. W. (2011). High resolution analysis of snake venom metalloproteinase (SVMP) peptide bond cleavage specificity using proteome based peptide libraries and mass spectrometry. *Journal of Proteomics*. Vol. 74(4): pags401-410.

- Paludo, K. S., Gremski, L. H., Veiga, S. S., Chaim, O. M., Gremski, W., Buchi, D. F., Nader, H. B., Dietrich, C. P., Franco, C. R. C. (2006). The effect of brown spider venom on endothelial cell morphology and adhesive structures. *Toxicon* 47 (8): pags844–853.
- Patiño, A. C., Pereañez, J. A., Núñez, V., Benjumea, D. M., Fernandez, M., Rucavado, A., Sanz, L., Calvete, J. J. (2010). Isolation and biological characterization of Batx-I, a weak hemorrhagic and fibrinogenolytic PI metalloproteinase from Colombian *Bothrops atrox* venom. *Toxicon*. Vol. 56(6): pags936-943.
- Pereira, A. N., Eduardo, C. P., Matson, E., and Marques, M. M. (2002). Effect of low-power laser irradiation on cell growth and procollagen synthesis of cultured fibroblasts. *Lasers Surgery and Medicine*. 31: pags263–267.
- Ponce-Soto, L. A., Bonfim, V. L., Novello, J. C., Navarro Oviedo, R., Yarlequé Chocas, A. and Marangoni, S. (2007). Isolation and Characterization of a Serine Protease, Ba III-4, from Peruvian *Bothrops atrox* venom. *The Protein Journal*, Vol. 26(6): pags 387-394.
- Porto, B. N., Tellib, C. A., Dutra, T. P., Alves, L. S., Bozza, M. T., Fin, C. A., Thiesen, F. V., Renner, M. F. (2007). Biochemical and biological characterization of the venoms of *Bothriopsis bilineata* and *Bothriopsis taeniata* (Serpentes: Viperidae). *Toxicon* 50: 270-277.
- Ramos, O. H. P., Carmona, A. K., Selistre-de-Araujo, H. S. (2003). Expression, refolding, and in vitro activation of a recombinant snake venom prometalloprotease. *Protein Expression and Purification*. Vol. 28: pags34–41.
- Ramos, O. H. P., Selistre de Araujo H. S. (2004). Comparative analysis of the catalytic domain of hemorrhagic and non-hemorrhagic snake venom metallopeptidases using bioinformatic tools. *Toxicon*. Vol. 44: pags529–538.
- Ramos, O. H. P., Selistre de Araujo H. S. (2006). Snake venom metalloproteases — structure and function of catalytic and disintegrin domains. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*. Vol. 142: pags328–346.
- Rodrigues, V. M., Soares, A. M., Guerra-Sá, R., Rodrigues, V., Fontes, M. R. M. and Giglio, J. R. (2000). Structural and functional characterization of Neuwiedase, a nonhemorrhagic fibrin(ogen)olytic metalloprotease from *Bothrops neuwiedi* snake venom. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. Vol. 381(2): pags213–224.
- Rodrigues, V. M., Soares, A. M., Andrião-Escarso, S. H., Franceschi, A. M., Rucavado, A., Gutiérrez, J. M., Giglio, J. R. (2001). Pathological alterations induced by neuwiedase, a

- metalloproteinase isolated from *Bothrops neuwiedi* snake venom. *Biochimie*. Vol. 83: págs 471-479.
- Rucavado, A., Lomonte, B., Ovidia, M., Gutiérrez, J. M. (1995). Local tissue damage induced by BaP1, a metalloproteinase isolated from *Bothrops asper* (Terciopelo) snake venom. *Experimental and Molecular Pathology*. Vol. 63: pags186-199.
- Rucavado, A., Flores-Sánchez, E., Franceschi, A., Magalhaes, A., Gutiérrez, J. M. (1999). Characterization of the local tissue damage induced by LHF-II, a metalloproteinase with weak hemorrhagic activity isolated from *Lachesis muta muta* snake venom. *Toxicon*. Vol. 37: pags1297-312.
- Rucavado, A., Escalante, T., Teixeira, C.F., Fernandes, C.M., Diaz, C., Gutierrez, J.M. (2002). Increments in cytokines and matrix metalloproteinases in skeletal muscle after injection of tissue-damaging toxins from the venom of the snake *Bothrops asper*. *Mediators Inflamm*. Vol. 11: pags121-128.
- Sajevic, T., Leonardi, A., Krizaj, I. (2011). Haemostatically active proteins in snake venoms. *Toxicon*. Vol. 57: pags627–645.
- Sales, P. B. V., Santoro, M. L. (2008). Nucleotidase and DNase activities in Brazilian snake venoms. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*. Vol. 147: 85–95.
- Sánchez, E. F., Magalhães, A., Mandelbaum, F. R., Diniz, C. R. (1991). Purification and characterization of the hemorrhagic factor II from the venom of the Bushmaster snake (*Lachesis muta muta*). *Biochimica et Biophysica Acta*, Vol. 1074: pags347-356.
- Sánchez, E. F., Cordeiro, M. N., de Oliveira, E. B., Juliano, L., Prado, E. S. and Diniz, C. R. (1995). Proteolytic specificity of two Hemorrhagic factors, LHF-I and LHF-II, isolated from the venom of the bushmaster snake (*Lachesis muta muta*). *Toxicon*. Vol. 33: pags1061-1069.
- Sánchez, E. F., Souza, C. T., Bello, C. A., Richardson, M., Oliveira, E. B., Magalhaes, A. (2003). Resolution of isoforms of mutalysin II, the metalloproteinase from bushmaster snake venom. *Toxicon*. Vol. 41: pags1021–1031.
- Savage, B., Cattaneo, M. and Ruggeri, Z. M. (2001). Mechanisms of platelet aggregation. *Current Opinion in Hematology*. Vol. 8: pags270–276.
- Selistre de Araújo, H. S. (2007). Atividade hemorrágica de toxinas, in: Selistre de Araújo, H. S; Ferreira de Souza, D. H. (Eds.), *Métodos em Toxinología: toxinas de Serpentes*. EdUFSCAR. São Carlos. Brazil. pags45-51

- Senis, Y. A., Kim, P. Y., Fuller, G. L. J., García, A., Prabhakar, S., Wilkinson, M. C., Brittan, H., Zitzmann, N., Wait, R., Warrell, D. A., Watson, S. P., Kamiguti, A. S., Theakston, R. D. G., Nesheim, M., Laing, G. D. (2006). Isolation and characterization of cotiaractivase, a novel low molecular weight prothrombin activator from the venom of *Bothrops cotiara*. *Biochimica et Biophysica Acta*. Vol. 1764: pags863–871.
- Shimokawa, K., Jia, L. G., Wang, X. M., Fox, J. W. (1996). Expression, activation, and processing of the recombinant snake venom metalloproteinase, proatrolysin E. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. Vol. 335: pags283–294.
- Smolka, M. B., Marangoni, S., Oliveira, B. and Novello, J. C. (1998). Purification and partial characterization of a Thrombin-like enzyme, Balterobin, from the venom of *Bothrops alternatus*. *Toxicon*. Vol. 36: pags1059-1063
- Soto, J. G., Perez, J. C. and Minton, S. A. (1988). Proteolytic, hemorrhagic and hemolytic activities of snake venoms. *Toxicon*, Vol. 26: pags875-882.
- Stroka, A., Donato, J. L., Bon, C., Hyslop, S., Lôbo de Araújo, A. (2005). Purification and characterization of a hemorrhagic metalloproteinase from *Bothrops lanceolatus* (Fer-de-lance) snake venom. *Toxicon*. Vol. 45: pags411–420.
- Ströcker, W. and Bode, W. (1995). Structural features of a superfamily of zinc-endopeptidases: the metzincins. *Current Opinion in Structural Biology*. Vol. 5: pags383-390.
- Suhr, S. M. and Kim, D. S. (1996). Identification of the snake venom substance that induces apoptosis. *Biochemistry and Biophysics Research Communications*. Vol. 224(1): pags134-9.
- Sun, M-Z., Liu, S., Greenaway, F. T. (2006). Characterization of a fibrinolytic enzyme (ussurenase) from *Agkistrodon blomhoffii ussurensis* snake venom: Insights into the effects of Ca²⁺ on function and structure. *Biochimica et Biophysica Acta*. Vol. 1764: pags1340–1348.
- Swenson, S., Markland Jr, F. S. (2005). Snake venom fibrin(ogen)olytic enzymes. *Toxicon*. Vol. 45: pags1021–1039.
- Takeya, H., Onikura, A., Nikai, T., Sugihara, H. and Iwanaga, S. (1990). Primary structure of a hemorrhagic metalloproteinase, HT-2, isolated from the venom of *Crotalus ruber ruber*. *Journal of Biochemistry*. Vol. 108: pags711-719.

- Teixeira, C. F. P., Fernandes, C. M., Zuliani, J. P., Zamuner, S. F. (2005). Inflammatory effects of snake venom metalloproteinases. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. Vol. 100: pags181-184.
- Torres-Huaco, F. D., Ponce-Soto, L.A., Martinz-de-Souza, D., Marangoni, S. (2010). Purification and Characterization of a New Weak Hemorrhagic Metalloproteinase BmHF-1 from *Bothrops marajoensis* Snake Venom. *Protein Journal*. Vol. 29: pags407–416.
- Torrez, P. Q., Duarte, M. R., França, F. O. S., Figueiredo, L., Abati, P., Campos, L. R., Pereira de Oliveira Pardal, P., Quiroga, M., Mascheretti, M. and Boulos, M. (2009). Primeiro registro de acidente pela jararaca estrela (*Bothriopsis taeniata*) no Brasil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. Vol. 42: pags342-344.
- Trummal, K., Vija, H., Subbi, J., Siigur, J. (2000). MALDI-TOF mass spectrometry analysis of substrate specificity of lebetase, a direct-acting fibrinolytic metalloproteinase from *Vipera lebetina* snake venom. *Biochimica et Biophysica Acta*. Vol. 1476: pags331-336.
- Tsai, I-H., Wang, Y-M., Chiang, T-Y., Chen, Y-L., and Huang, R-J. (2000). Purification, cloning and sequence analyses for pro-metalloprotease-disintegrin variants from *Deinagkistrodon acutus* venom and subclassification of the small venom metalloproteases. *European Journal of Biochemistry*. Vol. 267: pags1359-1367.
- Tu, A. T. (1991) *Reptile Venoms and Toxins: Handbook of Natural Toxins*. Vol. 5. New York. Macel Dekker. Inc.
- Wang, W. J., Huang, T. F. (2002). Purification and characterization of a Novel metalloproteinase, Acurhagin, from *Agkistrodon acutus* venom. *Thrombosis and Haemostasis* Vol. 87: pags641–50.
- Watanabe, L., Shannon, J. D., Valente, R. H., Rucavado, A., Alape-Giron, A., Kamiguti, A. S., Theakston, R. D., Fox, J. W., Gutierrez, J. M. and Arni, R. K. (2003). Amino acid sequence and crystal structure of BaP1, a metalloproteinase from *Bothrops asper* snake venom that exerts multiple tissue-damaging activities. *Protein Science*. Vol. 12: pags2273-2281.
- White, J. (2005). Snake venoms and coagulopathy. *Toxicon*. Vol. 45: pags951–967.
- Wu, E. L., Wong, K. Y., Zhang, X., Han, K., Gao, J. (2009). Determination of the Structure Form of the Fourth Ligand of Zinc in Acutolysin A Using Combined Quantum Mechanical and Molecular Mechanical Simulation. *The Journal of Physical Chemistry B*. Vol. 113: pags2477-2485.

- Xu, X., Liu, X-H., Wu, B., Liu, Y., Liu, W-Q., Xie Y-S., Liu Q-L.. (2004). Metal-ion- and ph-induced conformational changes of Acutolysin D from *Agkistrodon acutus* venom probed by fluorescent spectroscopy. *Biopolymers*, Vol. 74: pags336–344.
- Zhang; J; Chen, Z; He, Y. and Xu. X. (1984). Effect of calcium on proteolytic activity and conformation of hemorrhagic toxin I from five pace snake (*Agkistrodon acutus*) venom. *Toxicon*, Vol. 22: pags 931-935.
- Zychara, B. C., Castro Jr, N. C., Marcelino, J. R., Gonc-alves, L. R. C. (2008). Phenol used as a preservative in Bothrops antivenom induces impairment in leukocyte–endothelial interactions. *Toxicon*. Vol. 51: pags1151–1157.

VIII.- ANEXO

8.1.- Hierarquia Taxonómica de *Bothriopsis taeniata* (WAGLER 1824)

Reino: Animalia

Phylum: Chordata

Subphylum: Vertebrata

Classe: Reptilia

Ordem: Squamata

Subordem: Serpentes

Infraorden: Alethinophidia

Superfamília: Colubroidea

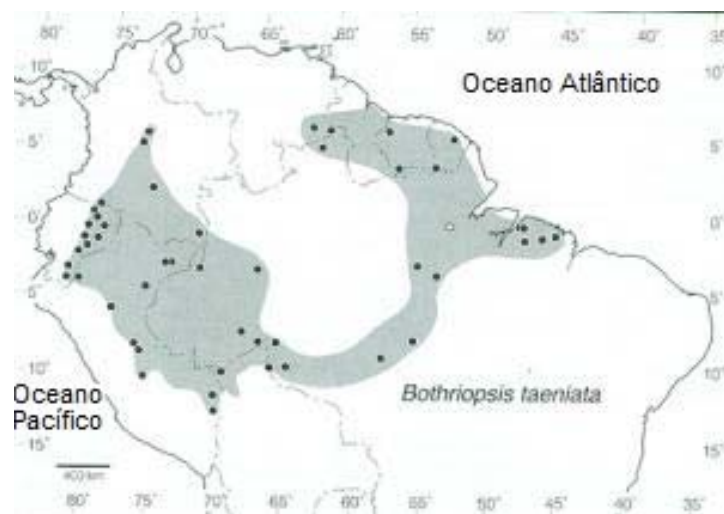
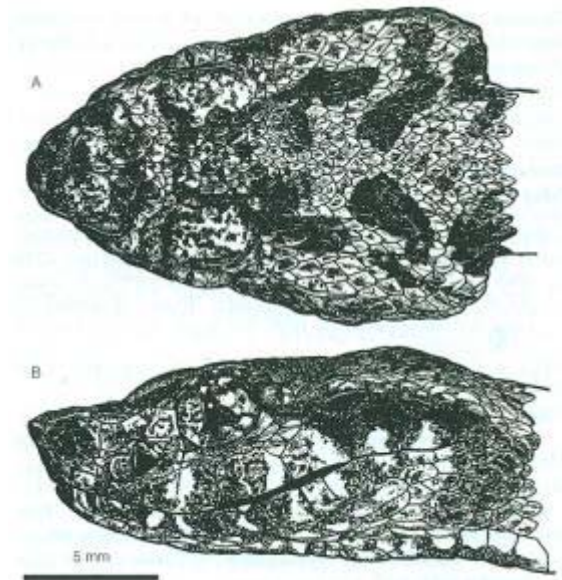
Família: Viperidae

Subfamília: Crotalinae

Gênero: *Bothriopsis* (Wagler, 1824).

Espécie: *Bothriopsis taeniata* (Wagler, 1824).

8.2.- *Bothriopsis taeniata* e sua distribuição na América do Sul



DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins que o conteúdo de minha dissertação de Mestrado/tese de Doutorado intitulada "Caracterização dos efeitos locais e sistêmicos da metaloprotease BtaHF purificada a partir do veneno total de *Bothriopsis taeniata*":

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


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

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

(x) CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais , projeto No. 1836-1, Instituição: Universidade Estadual de Campinas.

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

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


Aluno: Frank Denis Torres Huaco


Orientador: Sérgio Marangoni

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

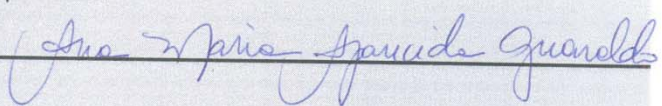
(X) Deferido () Indeferido

Carimbo e assinatura

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

() Deferido () Indeferido

Carimbo e assinatura


Profa. Dra. ANA MARIA APARECIDA GUARALDO
Presidente da CEUA/UNICAMP



UNICAMP



CEEA/Unicamp

Comissão de Ética na Experimentação Animal
CEEA/Unicamp

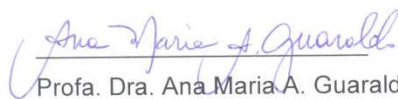
CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 1836-1, sobre "Análise comparativa dos efeitos biológicos induzidos por metaloproteases isoladas a partir do veneno de *Bothriopsis taeniata* e *Bothrops marajoensis*", sob a responsabilidade de Prof. Dr. Sérgio Marangoni / Frank Denis Torres Huaco, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal – CEEA/Unicamp em 04 de maio de 2009.

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº 1836-1, entitled "Comparative analysis of biological effects induced by metalloproteinases isolated from *Bothriopsis taeniata* and *Bothrops marajoensis* snake venom", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - Unicamp) on May 4, 2009.

Campinas, 04 de maio de 2009.



Profa. Dra. Ana Maria A. Guaraldo
Presidente



Fátima Alonso
Secretária Executiva

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

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

Estrategia para o estudo de metaloproteases BtaHF purificada a partir do veneno de *Bothriopsis taeniata*.

