



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

AUGUSTO VILCA QUISPE

**“Caracterização Estrutural e Funcional de uma Serinoprotease TLBm,
isolada a partir do veneno total de *Bothrops marajoensis*”**

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)

e aprovada pela Comissão Julgadora.

Orientador: Prof. Dr. Sergio Marangoni

Co-Orientador: Prof. Dr. Luis Alberto Ponce Soto

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

Campinas, 2008

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP

V711c

Vilca Quispe, Augusto

Caracterização estrutural e funcional de uma serinoprotease TLBm, isolada a partir o veneno total de *Bothrops marajoensis* / Augusto Vilca Quispe. – Campinas, SP: [s.n.], 2008.

Orientador: Sergio Marangoni.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Serinoprotease. 2. *Bothrops marajoensis*. 3. Cromatografia líquida de alta eficiência. 4. Enzima trombina “like”. I. Marangoni, Sergio. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

(pbg/ib)

Título em inglês: Structural and functional characterisation of a serine proteinase TLBm, isolated starting from the *Bothrops marajoensis* whole venom.

Palavras-chave em inglês: Serine proteases; *Bothrops marajoensis*; HPLC (chromatography); Thrombin like enzyme.

Área de concentração: Bioquímica.

Titulação: Mestre em Biologia Funcional e Molecular.

Banca examinadora: Sergio Marangoni, Fernanda Ramos Gadelha, Edson Antunes.

Data da defesa: 27/11/2008.

Programa de Pós-Graduação: Biologia Funcional e Molecular.

Campinas, 27 de novembro de 2008

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Sergio Marangoni (Orientador)


Assinatura

Profa. Dra. Fernanda Ramos Gadelha


Assinatura

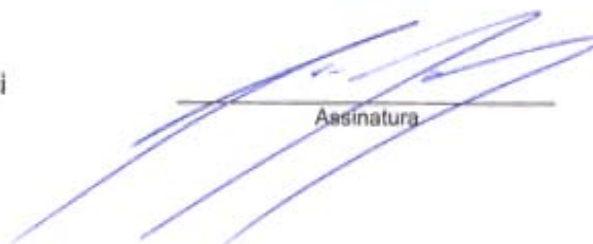
Prof. Dr. Edson Antunes

Assinatura

Prof. Dr. Claudio Chrysostomo Werneck

Assinatura

Profa. Dra. Elen Cristina Teizem Landucci



Assinatura

Dedicatória

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

Agradecimentos

Ao meu orientador, Prof. Dr. Sérgio Marangoni, pela confiança, pelo incentivo e pela orientação durante a realização deste trabalho. Agradeço muito por ter me aceitado como seu aluno.

Ao meu amigo e co-orientador Luis, por sua ajuda, pois só através dela estou aqui concluindo este trabalho. Muito obrigado!

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

Às professoras Dra. Fernanda Ramos Gadelha e Dra. Elen Cristina Teizem Landucci, por terem aceitado o convite para participar da minha banca examinadora.

Aos meus amigos e colegas do Laboratório de Química de Proteínas: Vera, Frey, Frank, Salomon e a todos meus amigos da Bioquímica.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela concessão da Bolsa de Mestrado.

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

Índice

Lista de Abreviações	viii
Resumo	ix
Abstract	xi
1. INTRODUÇÃO	01
1.1 Uma visão geral dos acidentes com serpentes	01
1.2. Enzimas Trombina “like”	02
1.3. Epidemiologia dos acidentes por serpentes peçonhentas no Brasil ...	04
A. Oxidorredutases	05
B. Hidrolases	06
C. Glicosidasas	07
D. Lipases	07
E. Proteases	07
1.4. Serinoproteases	09
1.5. <i>Bothrops marajoensis</i>	09
2.1. OBJETIVO GERAL	11
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	11
3. MATERIAIS E MÉTODOS	12
3.1. Veneno e reagentes	12
3.2. Cromatografia líquida de alta eficiência–fase reversa (HPLC-FR)	12
3.3. Atividade proteolítica	12
3.4. Eletroforese em SDS-PAGE	13
3.5. Análise de espectrometria de massa (MALDI-Tof)	14
3.6. Cinética enzimática	14
3.6.1. Efeito da concentração do substrato	14
3.6.2. Efeito da temperatura	15
3.6.3. Efeito do pH	15
3.7. Inibição da atividade serinoprotease por PMSF (fenilmetilsulfonil fluoreto)	16
3.8. Atividade fibrinogenolítica	16
3.9. Degradação do fibrinogênio	17
3.10. Análise de composição de aminoácidos	17
3.11. Determinação da seqüência N–terminal	18
3.12. Estudo de homologia seqüencial	18

3.13. Atividade hemorrágica	18
3.14. Determinação da atividade inflamatória	19
3.15. Determinação da dose letal 50% (DL ₅₀) intracerebroventricular (i.c.v.)	19
3.16. Determinação da Agregação Plaquetária	19
3.17. Análise Estadística	21
4. RESULTADOS	23
4.1. Purificação de uma fração com atividade trombina “like” isolada a partir de veneno total de <i>Bothrops marajoensis</i> em HPLC de fase reversa	23
4.2. Atividade proteolítica da trombina “like” TLBm	24
4.3. Análise de espectrometria de massa (MALDI-Tof) da trombina “like” TLBm	25
4.4. Estudos da atividade cinética da trombina “like” TLBm procedente do veneno total de <i>Bothrops marajoensis</i>	26
4.4.1. Efeito da concentração do substrato	26
4.4.2. Efeito da temperatura	28
4.4.3. Efeito do pH na atividade proteolítica da trombina “like” TLBm	29
4.5. Efeito inibitório da atividade proteolítica	30
4.6. Atividade fibrinogenolítica da trombina “like” TLBm	31
4.7. Degradação do fibrinogênio pela ação da trombina “like” TLBm e sua análise via SDS-PAGE	32
4.8. Análise de Composição de Aminoácidos (Pico-Tag) Waters	33
4.9. Estudo da região N-terminal e estudo de homologia seqüencial da trombina “like” TLBm	34
4.10. Caracterização farmacológica da serinoprotease com atividade trombina “like” TLBm procedente de <i>Bothrops marajoensis</i>	35
4.10.1. Determinação da atividade hemorrágica	35
4.10.2. Determinação da atividade inflamatória	36
4.10.3. Determinação da dose letal 50% (DL ₅₀) intracerebroventricular (i.c.v.)	37
4.10.4. Determinação da Agregação Plaquetaria	38
5. DISCUSSÃO	39
6. CONCLUSÕES	47
7. COMUNICAÇÕES EM CONGRESSOS	48
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	49
9. ANEXOS	58

Lista de Abreviações

μ - Bondapak C18	Coluna de HPLC com n-octadecil como base da fase estacionária
ACD	Citrato Acido Dextrose
DL ₅₀	Dose letal para provocar a morte a pelo menos 50% da população em estudo
DL-BA _p NA	N α -BENZOIL-DL-ARGINIL <i>p</i> -NITROANILIDA
DMSO	Dimetilsulfóxido
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
FB	Fibrinogênio bovino
HPLC-RP	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência - Fase Reversa
I.C.V.	Intracerebroventricular
kDa	kiloDalton
K _M	Constante de Michaelis-Menten
MALDI-Tof	Ionização/Dessorção de Matriz Assistida por Laser - Tempo-de-Vôo
PBS	Tampão fosfato em salina
pH	potencial hidrogeniônico
PITC	Fenilisotiocianato
PL	Plaquetas lavadas
PMSF	FenilMetilSulfonil fluoreto
<i>p</i> -NA	<i>p</i> -nitroanilina
PPP	Plasma pobre em plaquetas
PRP	Plasma rico em plaquetas
SBT1	Inibidor de tripsina de soja
SDS-PAGE	Eletroforese em Gel de poliacrilamida em presença de Dodecil Sulfato de Sódio
TEMED	N,N,N',N'-Tetrametilenodiamino
TFA	Ácido Trifluoracético
TLBm	Trombina "like" <i>Bothrops marajoensis</i>
TLEs	Enzima trombina "like"
Tris-HCl	Tris (hidroximetil) aminometane Hidrochloride
V _{max}	Velocidade máxima

Resumo

Muitas das toxinas isoladas e estudadas em seus efeitos biológicos precisam ser reavaliadas à luz de metodologias otimizadas em HPLC e confirmadas por espectrometria de massas, devido à possível presença de algum componente não estudado. No caso da serpente *Bothrops marajoensis*, são valorizados os estudos sobre essa espécie devido aos poucos trabalhos realizados, provavelmente por se tratar de uma espécie restrita e rara encontrada na ilha de Marajó, no Pará, e posteriormente em alguns locais litorâneos do Maranhão, aparentemente endêmica.

A reprodutibilidade da atividade biológica, através dos efeitos farmacológicos, só é possível com a utilização de frações quimicamente homogêneas que mantenham a integridade da função biológica.

No presente trabalho, foi purificada uma nova serinoprotease TLBm, com atividade trombina “like” em um único passo cromatográfico em um sistema de HPLC de fase reversa, com um alto grau de pureza e homogeneidade molecular, sem perda da atividade biológica.

A nova serinoprotease foi caracterizada fisico-quimicamente, revelando uma massa molecular de 33332,5 Da por Espectrometria de Massa (MALDI-Tof). Por outro lado, mostrou uma atividade proteolítica perante o substrato cromogênico DL-BA_pNA, assim como foi capaz de evidenciar uma atividade fibrinogenolítica frente ao fibrinogênio bovino e hidrolisar a cadeia alfa (α) e beta (β), comportando-se como uma trombina “like” tipo A e B.

Os estudos da atividade cinética mostraram que a serinoprotease com atividade trombina “like” possui um comportamento michaeliano frente ao substrato DL-BA_pNA, registrando as constantes cinéticas de $V_{max} = 2,3 \times 10^{-1}$ nmoles *p*-NA/Lt/min e o $K_M = 0,52 \times 10^{-1}$ M. Os estudos do efeito da temperatura sobre a atividade catalítica revelaram que a serinoprotease TLBm apresenta uma ótima atividade em torno de 38°C e um pH de 8,0.

Para confirmar o caráter trombina “like” da TLBm, esta foi inibida pela ação do fenilmetilsulfonil fluoreto (PMSF) e outros inibidores, através dos quais a atividade foi reduzida em mais de 50% (69,89±1,5 %). A análise de composição de aminoácidos mostrou que a serinoprotease TLBm trata-se de uma proteína de caráter ácido ao

apresentar um elevado número de aminoácidos ácidos, assim como uma boa quantidade de aminoácidos hidrofóbicos, o que garante a estabilidade conformacional da proteína. A presença de 12 cisteínas sugere a possível presença de 6 pontes dissulfeto.

A seqüência N-terminal da serinoprotease com atividade trombina “like” TLBm mostrou um alto grau de homologia seqüencial (55,9 a 79,4 %). No entanto, existem algumas substituições nos aminoácidos (S)12→(H)12 e (V)15→(L)15, os quais poderiam estar relacionados à diferença na atividade biológica estudada aqui ou em outras atividades, o que faria da TLBm uma serinoprotease particular.

Com relação ao estudo das atividades biológicas, a TLBm mostrou-se desprovida de atividade hemorrágica, o que é característico desta família de proteínas e reforça a afirmação de esta ser uma serinoprotease. A TLBm apresentou também baixa capacidade inflamatória (edematogênica) e uma alta concentração na letalidade (DL₅₀) intracerebroventricular (i.c.v), evidenciando que a toxina não contribui significativamente com a letalidade do veneno total.

A serinoprotease com atividade trombina “like” TLBm tem a propriedade de induzir a agregação plaquetária em plasma rico em plaquetas (PRP) e esse efeito é inibido na presença do PMSF.

Abstract

Many of the isolated and studied toxins in their biological effects need to be revalued, to the light of methodologies optimized in HPLC and confirmed by Mass Spectrometry, due to the possible presence of some component which has not been studied. In the case of the serpent *Bothrops marajoensis*, its results are valuable due to the fact that there are few works accomplished probably because the treating of a restricted and rare species found at the island of Marajó, in Pará, and later in some coastal places of Maranhão, which seem endemic.

The reproduction of the biological activity, through the pharmacological effects, is only possible with the use of chemically homogeneous fractions so that they maintain the integrity of the biological function.

In the present work a new serineprotease was purified with activity thrombin like TLBm in a Chromatography step in a system of HPLC of reverse phase, with a high degree of purity and molecular homogeneity, without loss of the biological activity.

A new serineprotease was characterized physical-chemically revealing a molecular mass of 33332,5 Da by a Mass Spectrometry (MALDI-Tof), on the other hand, it did show an proteolytic activity before the substratum chromogenic DL-BA ρ NA, as well as it was capable to evidence an fibrinogenolytic activity in front of the bovine fibrinogen, and hydrolise the alpha (α) and beta (β) chain which behaved as a thrombin like A and B types.

The studies of the kinetic activity showed that the serineprotease with activity thrombin like, possesses a michaeliano behavior in front of the substratum DL-BA ρ NA registering the kinetic constants of $V_{\max} = 2,3 \times 10^{-1}$ nmoles ρ -NA/Lt/min and the $K_M = 0,52 \times 10^{-1}$ M respectively. The studies of the effect of the temperature under the catalytic activity, revealed that the serineprotease TLBm was capable to show a great activity around 38°C and a pH of 8,0.

To confirm the character thrombin like of TLBm, it was inhibited by the action of the fenilmetilsulfonil fluoride (PMSF) and other inhibitors, where the activity was reduced in more of the 50% ($69,89 \pm 1,5\%$). The analysis of composition of amino acids showed that the serineprotease TLBm is a character protein acid when presenting a high number of acid amino acids, as well as a good amount of amino acids hydrophobic that

guarantees the conformational stability of the protein. The presence of 12 cisteinas suggests the possible presence of 6 dissulfeto bridges.

The N-terminal sequence of the serineprotease with activity thrombin like TLBm, showed a high degree of sequential homology (55,9 to 79,4%). However there are some substitutions in the following amino acids: (S)12→(H)12 and (V)15→(L)15 which could be related with the difference in the biological activity studied here or with other activities, which would make TLBm a private serineprotease.

The studies of biological activity such an as hemorrhage, reveal that the serineprotease is completely deprived which is known is already of this family of proteins. On the other hand the studies of the inflammatory effect (oedematogenic) reveal that the serineprotease possesses a low inflammatory capacity and finally it displays a high concentration in the lethality (DL_{50}) intracerebroventricular (i.c.v.) showing that the toxin doesn't contribute significantly with the lethality of the total poison.

The serineprotease with thrombin like activity has the property of inducing the platelet aggregation in platelets-rich plasma (PRP), and that effect is inhibited in the presences of the PMSF.

1. INTRODUÇÃO

Interferências com aspectos do sistema hemostático humano são um tema comum associado aos venenos de serpentes, abrangendo as famílias Hydrophidae, Elapidae, Viperidae e Crotalidae de serpentes venenosas em maior ou menor grau (Meier e Stocker, 1995). Isto é refletido na importância de coagulopatias clínicas, como consequência dos acidentes com serpentes (em todos os continentes, exceto na Antártica, onde não há serpentes). No entanto, enquanto as coagulopatias podem ser importantes em humanos picados por serpentes, nem sempre os efeitos do veneno são responsáveis pela morbidez ou pela mortalidade; ainda podem atuar sinergicamente com outros fatores do veneno, em prejuízo da saúde humana. Semelhantemente deveria ser lembrado que os humanos não são presas naturais das serpentes venenosas e alguns componentes do veneno que teriam efeito na presa poderiam certamente causar diferentes efeitos em humanos (White, 2005).

1.1 Uma visão geral dos acidentes com serpentes

Globalmente os acidentes com serpentes venenosas estão estimados por afetar mais de 2,5 milhões de humanos anualmente, sendo que mais de 100.000 morrem (Chippaux, 1998). A responsabilidade de morbidez e mortalidade é maior nos trópicos rurais (Lalloo *et al.*, 1995; Laing *et al.*, 1995; Warrel *et al.*, 1999), mas não estão limitadas às áreas tropicais rurais mais pobres. Há evidências de que algumas das serpentes venenosas mais perigosas estão invadindo áreas urbanas e colocando novos grupos de humanos em risco de forma significativa (Melgarejo e Aguiar, 1995; Revault, 1995).

Muitos efeitos farmacológicos estão presentes no envenenamento de humanos por serpentes, mas somente alguns são de maior significância clínica (White, 2004a), quais sejam, (1) paralisia flácida; (2) miólise sistêmica; (3) coagulopatias e hemorragias; (4) dano e falha renal; (5) cardiotoxicidade; (6) injúria do tecido local no lugar da picada. Cada uma dessas pode causar um número de efeitos secundários, com morbidez e mortalidade potencial. Algumas espécies de serpentes podem mostrar atividade em uma ou mais dessas categorias, embora raramente em todos as seis. No passado se tinha a idéia de que uma única espécie de serpente causaria efeitos locais e/ou hemorrágicos, enquanto os elapídios causariam efeitos puramente sistêmicos e não

hemorrágicos. Esta suposição é inteiramente incorreta. Alguns dos piores casos de danos no tecido local são causados por acidentes de elapídeos (Cobras Asiáticas e Africanas) (Warrell, 1995a; Warrell, 1995b), enquanto algumas crotálicas (exemplo: Cascavel Sul-americana) causam efeitos locais mínimos (Fan e Cardoso, 1995). Similarmente, algumas víboras podem causar paralisia ou miólise, enquanto alguns elapídeos causam severas coagulopatias (White, 2004a; White, 2004b; White, 2004c; Warrell, 1995a; Warrell, 1995b; White, 1995).

São mais de 200 espécies conhecidas de venenos de serpentes classificadas dentro de 5 famílias: Elapidae, Viperidae, Crotalidae, Hydrophidae e Colubridae (Matsui *et al.*, 2000). Os venenos são secretados e armazenados em glândulas venenosas. As serpentes usam o veneno para imobilizar e ajudar a digerir a presa, tornando-se uma forma de defesa. Em acidentes com serpentes, o veneno é injetado dentro da vítima, causando danos em muitas vias fisiológicas (Lu *et al.*, 2005).

Os venenos de serpentes do gênero *Bothrops* provocam alterações da hemóstase no indivíduo inoculado (Acosta de Perez *et al.*, 1996). As substâncias responsáveis por este efeito são enzimas do tipo trombinas que atuam sobre o fibrinogênio convertendo-o em fibrina. Estruturalmente pertencem à família das serinoproteases (Ouyang *et al.*, 1992), e a este grupo pertencem também a tripsina, a quimiotripsina e a elastase. Estas enzimas possuem no seu sítio ativo um resíduo de serina que desempenha um papel crucial no processo catalítico e, ao redor, uma região molecular característica para cada tipo de serinoproteases, o que lhe dá a especificidade como enzima proteolítica (Mathews e Van Holde, 1998).

As proteínas de veneno que afetam os fatores de coagulação podem ser classificadas como as que atuam em fatores coagulantes que incluem os ativadores FV, ativadores FX, ativadores de protrombina e enzimas trombina “like” (TLEs); fatores anticoagulantes que incluem proteínas ligadas FIX/X, ativadores de proteína C, inibidores de trombina e fosfolipase A₂; e os que atuam no fibrinólise, que incluem enzimas fibrinolíticas e ativadores de plasminogênio.

1.2 Enzimas Trombina “like”

Os venenos de serpentes que contêm TLEs (Thrombin-like enzymes) são amplamente distribuídos em vários gêneros de serpentes (*Agkistrodom*, *Bothrops*,

Lachesis e *Trimeresurus*), assim como em víboras verdadeiras (*Bitis* e *Cerastes*) e nos colubrídeos *Dispholidus typus* (Pirkle, 1998).

Os venenos de serpentes contêm uma variedade de enzimas proteolíticas, como as enzimas trombina “like”, que são responsáveis por vários efeitos farmacológicos, como a transformação de fibrinogênio em fibrina (Meier e Stocker, 1991; Zhang *et al.*, 1998; Castro *et al.*, 2004), ativando o fator V de coagulação (Kisiel, 1979; Tokunaga *et al.*, 1988) e a proteína C no plasma (Kisiel *et al.*, 1987), liberando cininas de cininogênios (Petretski *et al.*, 2000) e clivando componentes do complemento C3 (Tambourgi *et al.*, 1994; Yamamoto *et al.*, 2002). Algumas dessas proteínas podem contribuir com efeitos nocivos que podem causar mionecrose, distúrbios na coagulação sangüínea, choque cardiovascular, mioglobinúria e liberação de mediadores endógenos, tais como a bradicinina (kini, 2005).

Até hoje, mais de 30 seqüências de trombina “like” têm sido determinadas com um alto grau de similaridade. O domínio catalítico, incluindo os resíduos da tríade catalítica (His₅₇, Asp₁₀₂ e Ser₁₉₅) e os sítios específicos S1 (Asp₁₈₉) e S2 (Gly₂₁₆), são as regiões mais importantes conservadas. No entanto, elas mostram pouca similaridade com a trombina de mamífero (Castro *et al.*, 2004).

Como a trombina, as enzimas trombina “like”, especificamente, catalisam clivagens limitadas de fibrinogênio e permitem a coagulação do fibrinogênio. Baseado na relação de liberação de fibrinopeptídios A e B, as enzimas trombina “like” podem ser classificados em três grupos, venombin A, venombin B e venombin AB (Markland, 1998).

Os venenos de serpentes das famílias Crotalidae e Viperidae, além das hemorraginas, contêm muitas outras proteases como aquelas que atuam na cascata de coagulação sangüínea (Kornalik, 1990). No Brasil, os estudos a respeito destas proteases com ação na coagulação sangüínea têm sido realizados principalmente com as serpentes peçonhentas dos gêneros *Bothrops* e *Crotalus*.

Várias enzimas isoladas de venenos de serpentes possuem atividade tipo trombina que clivam as moléculas de fibrinogênio encontradas no plasma, transformando-as diretamente em fibrina (Smolka *et al.*, 1998; Ponce-Soto, *et al.*, 2007). O agente principal do sistema fibrinolítico é a plasmina, a qual possui capacidade de degradação da rede de fibrina (Figura 1).

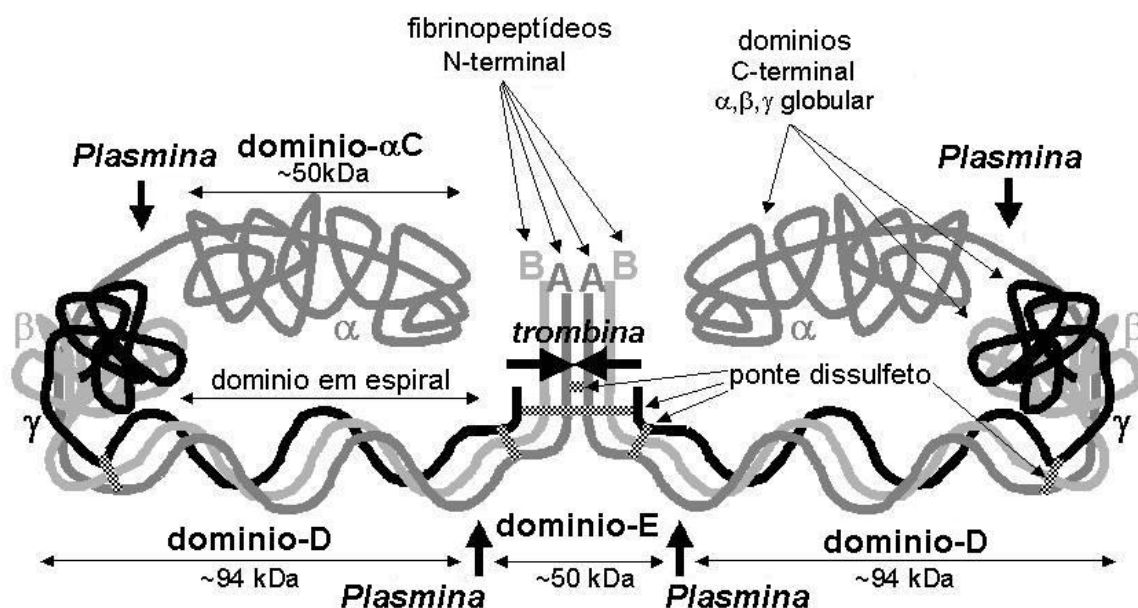


Figura 1. Degradação do fibrinogênio (Zaganelli *et al.*, 1996).

1.3 Epidemiologia dos acidentes por serpentes peçonhentas no Brasil.

Foram notificados à Secretaria de Saúde do Estado do Ceará, no período de 1992 a 1995, 688 acidentes causados por serpentes peçonhentas (média anual de 172 casos), com coeficiente de incidência variando entre 0,9 e 5,8 por 100.000 habitantes. Dentre 473 casos em que houve referência ao gênero da serpente, 88,3% foram por *Bothrops*, 10,6% por *Crotalus*, 0,8% por *Micrurus* e 0,2% por *Lachesis* (Feitosa *et al.*, 1997).

Os acidentes ofídicos constituem sério problema de saúde pública, especialmente para aquelas que moram nos países tropicais (World Health Organization, 1981; Bucarechi *et al.*, 2001; Pardal *et al.*, 2004).

Existem aproximadamente três mil espécies de serpentes em todo o mundo, sendo que apenas 410 são consideradas perigosas para o homem (Barraviera, 1993). Segundo Barraviera (1994), no Brasil, encontram-se 256 espécies de serpentes catalogadas, sendo 69 de espécies peçonhentas, das quais 32 pertencem ao gênero *Bothrops* família viperidae, 6 ao gênero *Crotalus* família Crotalidae, 2 ao gênero *Lachesis* família Viperidae e 29 ao gênero *Micrurus* família Elapidae.

Os acidentes causados por serpentes do gênero *Bothrops* mostram um quadro clínico bastante característico decorrente da ação combinada dos componentes

presentes no seu veneno: ações proteolíticas, coagulantes e hemorrágicas. As manifestações locais caracterizam-se pelo aparecimento de equimoses, bolhas e sangramentos no ponto da picada, acompanhados ou não de mionecrose e de enfartamento ganglionar regional. Entre as manifestações sistêmicas, podem ocorrer hemorragias à distância, como gengivorragias, epistaxes, hematêmese e hematuria; em alguns casos podem ocorrer ainda hipotensão arterial, hemorragias intensas e insuficiência renal aguda (Cardoso, 1997).

Os venenos de serpentes apresentam-se como uma mistura heterogênea e complexa, contendo substâncias simples como íons (magnésio, cálcio e zinco) – por exemplo, o magnésio e o zinco são importantes íons para a ação das principais metaloproteases do veneno, como as hemorraginas –; e substâncias complexas (enzimas e proteínas). A ação de algumas enzimas proteolíticas, fosfolipases A₂ e neurotoxinas potencializam o efeito tóxico do veneno, principalmente as neurotoxinas que atuam em sinergismo, aumentando a ação tóxica (Kini, 2003).

Segundo Varanda and Giannini (1994), os venenos de serpentes são ricos em substâncias farmacológica e bioquimicamente ativas. Sua composição química varia de espécie para espécie e sua ação depende da natureza dos elementos presentes e da interação biológica entre estes elementos.

Os componentes do veneno parecem ter proporções comuns e similares dentro da mesma família de serpentes, isto é, neurotoxinas (que agem sobre o sistema nervoso) são geralmente encontradas no veneno das famílias Hydrophidae e Elapidae, enquanto que toxinas hemorrágicas e mionecróticas no veneno das Crotalidae e Viperidae (Matsui *et al.*, 2000).

De todas as enzimas descritas, muitas são de natureza hidrolítica, 12 são comumente encontradas em proporções variadas nos diferentes grupos de serpentes e as restantes estão distribuídas de forma pontual (Matsui *et al.*, 2000). Classicamente as enzimas hidrolíticas são agrupadas em cinco classes principais: Oxidorredutases, Fosfatases, Glicosidases, Lipases e Proteases (Tu, 1991).

A. Oxidorredutases

A L-Amino ácido oxidase (LAAO) é uma flavoproteína que catalisa a deaminação oxidativa da L-amino ácido ao correspondente α -ceto ácido com liberação de peróxido de hidrogênio e amônia. Os venenos de serpentes são ricos em LAAO e algumas têm

sido isoladas e caracterizadas (Du e Clemetson, 2002; Suhr e Kim, 1996; Stiles *et al.*, 1991; Sun *et al.*, 2003; Stabeli *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2003). As LAAO são responsáveis pela cor amarela dos venenos secos. Desde o final do último século, as LAAO têm sido de interesse para os bioquímicos, fisiologistas e médicos devido aos seus efeitos em várias células, incluindo principalmente células de câncer, plaquetas e organismos microbianos (Li *et al.*, 1994; Suhr e Kim, 1996; Du e Clemetson, 2002).

B. Hidrolases

São consideradas deste grupo fosfatases, fosfodiesterases, endonucleases e 5-nucleotidases. As mais conhecidas são as fosfodiesterases, que são largamente utilizadas no seqüenciamento ou na caracterização de oligonucleotídeos e polinucleotídeos (Aird, 2002). A 5-nucleotidase é uma enzima específica encontrada na maioria dos venenos de serpentes, e é mais instável do que as fosfodiesterases (Cousin e Bon, 1999).

A importância das proteínas fosfatases deve-se à 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, como por exemplo alterações no metabolismo de carboidratos, bem como em eventos carcinogênicos (Serres *et al.*, 2000).

Proteínas fosfatases 1 e 2A pertencem ao grupo das fosfatases, que desfosforilam resíduos de treonina e serina. Em células de mamíferos, aproximadamente 90% da atividade de proteína fosfatase está relacionada com a presença das fosfatases 1 e 2A. As fosfatases serina/treonina são holoenzimas que apresentam uma subunidade catalítica juntamente com uma subunidade regulatória, que modulam a atividade enzimática ou determinam a localização das enzimas (Serres *et al.*, 2000).

As fosfatases são divididas em duas categorias, de acordo com o pH ótimo para a atividade enzimática: as fosfatases ácidas, que possuem um pH ótimo em torno de 5,0 e 6,0, e as fosfatases alcalinas, com um pH ótimo em torno de 8,8 a 9,0. Atualmente esta classificação não é determinada apenas pela faixa de pH, mas também por outras

características relacionadas com o mecanismo da reação que catalisam, como por exemplo, especificidade quanto ao substrato e sensibilidade a inibidores, ajudando a diferenciar estas duas classes de enzimas (Serres *et al.*, 2000).

C. Glicosidases

Estas enzimas têm a função de facilitar a difusão das toxinas do veneno para dentro do tecido das vítimas (Aird, 2002). Dentre estas enzimas, temos as α -amilases, as NAD nucleotidases e a hialuronidase. A hialuronidase é uma enzima que catalisa a reação de hidrólise do ácido hialurônico, um mucopolissacarídeo presente na pele, nos tecidos conectivos e nos tendões.

D. Lipases

Dentre as lipases, destaca-se o grupo das fosfolipases e as acetilcolinesterases. As fosfolipases A_2 são as enzimas mais comumente encontradas nos venenos de serpentes, as mais estudadas do ponto de vista bioquímico e biológico e têm importante papel na digestão de lipídios (Kini, 2003).

As Fosfolipases A_2 são enzimas largamente distribuídas na natureza, podendo ser encontradas em bactérias, plantas e tecidos de mamíferos (pulmão, fígado, baço, coração, eritrócitos, plaquetas e leucócitos polimorfonucleares). No entanto, as mais conhecidas e estudadas são aquelas encontradas nos tecidos pancreáticos de mamíferos e nos venenos de serpentes e insetos (Denis, 2000).

E. Proteases

As proteases não são responsáveis pela ação letal dos venenos, mas podem causar outros tipos de efeitos danosos, 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 de protease e, em algumas delas, domínios adicionais. Essas proteases agem degradando proteínas que compõem a membrana basal subjacente das células endoteliais dos capilares (Hati *et al.*, 1999).

As famílias de serpentes Crotalidae e Viperidae contêm, além das hemorraginas, muitas outras proteases, como aquelas que atuam na cascata de coagulação sangüínea (Kornalik, 1990). No Brasil, os estudos a respeito destas proteases com

ação na coagulação sangüínea têm sido realizados principalmente com as serpentes peçonhentas do gênero *Bothrops* e *Crotalus*.

As enzimas proteolíticas ou proteases são enzimas que catalisam a clivagem de ligações peptídicas de proteínas. Essas proteases adquiriram um alto grau de especialização durante sua evolução biológica, restringindo seu mecanismo de ação sobre ligações peptídicas específicas (Barrett e Rawlings, 1995).

Muitos processos biológicos são regulados pela ação de proteases, por exemplo, coagulação do sangue e fibrinólise, a liberação de proteínas hormonais de precursores moleculares, o transporte de proteínas secretoras através da membrana, ativação do sistema de complemento, fertilização, germinação e controle da digestão proteolítica (Wenzel e Tschesche, 1995; Declerk e Imren, 1994).

As enzimas proteolíticas são indispensáveis para os processos fisiológicos em animais, mas se não forem adequadamente controladas, podem representar um risco devido ao seu potencial catalítico, destruindo componentes protéicos celulares e teciduais. Devido a isso, o equilíbrio entre as enzimas e seus inibidores é um fator essencial para a manutenção de um estado fisiológico normal (Neurath, 1993). O mecanismo básico de regulação para estas enzimas envolve a ativação de precursores de proteases inativos (zimogênios) por proteólise limitada com inibidores protéicos específicos (Phillips e Fletterick, 1992; Neurath, 1993).

De acordo com a natureza dos seus sítios ativos, as proteases compreendem as serinoproteases I e II, cisteinoproteases, metaloproteases I e II e aspartilproteases, como está apresentado na tabela 1 (Neurath, 1984).

Tabela 1. Classificação das proteases de acordo com a natureza dos sítios ativos.

Família	Proteases representativas	Componentes do sítio ativo
Serinoproteases I	Quimiotripsina, tripsina, elastase, calicreínas.	Asp ₁₀₂ , Ser ₁₉₅ , His ₅₇
Serinoproteases II	Subtilisina	Asp ₃₂ , Ser ₂₂₁ , His ₆₄
Cisteinoproteases	Papaína, actinidina, catepsinas B e H de fígado de rato.	Cys ₂₅ , His ₁₅₉ , Asp ₁₅₈
Aspartilproteases	Penicilopepsina, pepsina e renina.	Asp ₃₃ , Asp ₂₁₃
Metaloproteases I	Carboxipeptidase bovina A e B.	Zn, Glu ₂₇₀ , Tyr ₂₄
Metaloproteases II	Termolisina.	Zn, Glu ₁₄₃ , Tyr ₂₃

Fonte: Neurath, H. (1984)

1.4 Serinoproteases

A classe de enzimas mais bem estudada e bem caracterizada é a das serinoproteases, tendo como exemplo a quimiotripsina, a elastase e a tripsina, sendo esta a mais estudada. Essas enzimas apresentam elevado grau de homologia e mecanismo de catálise semelhante, embora apresentem diferenças acentuadas quanto à especificidade por substratos (Duffon, 1990).

As serinoproteases são assim denominadas por possuírem um mecanismo catalítico comum que envolve um resíduo de Ser particularmente reativo presente no sítio ativo (catalítico). As serinoproteases incluem enzimas digestivas de procariontes e de eucariontes, e proteínas mais especializadas que participam no desenvolvimento da coagulação sangüínea, nas inflamações e em vários outros processos (Halfon e Craik, 1998).

Alguns mecanismos de catálise enzimática foram propostos para as serinoproteases, sendo mais aceito o mecanismo da dupla transferência de prótons do resíduo Ser₁₉₅ para o resíduo His₅₇, e em seguida para o resíduo Asp₁₀₂, precisamente os aminoácidos que compõem o sítio ativo das serinoproteases. O resultado dessa transferência é a formação de uma carga negativa parcial que será a responsável pela catálise enzimática propriamente dita, que ocorre através de um ataque nucleofílico aos radicais carbonila dos resíduos de arginina e lisina dos substratos susceptíveis à tripsina (Barrett e Rawlings, 1995).

1.5 *Bothrops marajoensis*

No gênero *Bothrops*, no Brasil, incluem-se as espécies *B. alternatus*, *B. atrox*, *B. bilineatus*, *B. brazili*, *B. castelnaudii*, *B. cotiara*, *B. erythromelas*, *B. iglesiassi*, *B. insularis*, *B. itapetiningae*, *B. jararaca*, *B. jararacussu*, *B. marajoensis*, *B. moojeni*, *B. neuwidi*, *B. pirajai* e *B. pradoi*. A espécie *B. marajoensis* é encontrada e se distribui desde os estados do Sul até o Distrito Federal. *B. marajoensis*, como o nome indica, foi encontrada primeiro na Ilha de Marajó, no Pará, e posteriormente em alguns locais litorâneos do Maranhão; porém, *B. marajoensis*, assim como *B. itapetiningae*, *B. muriciensis*, *B. pirajai*, *B. pradoi*, e *B. itapetiningae* são consideradas espécies raras ou restritas em sua distribuição (Underwood, 1967; Romano-Hoge, 1990).

Tabela 2. Hierarquia Taxonômica

Reino	Animalia
Filo	Chordata
Subfilo	Vertebrata
Classe	Reptilia Laurenti, 1768
Ordem	Squamata Opperl, 1811
Subordem	Serpentes Linnaeus, 1758
Infraordem	Alethinophidia Nopcsa, 1923
Família	Viperidae Opperl, 1811
Subfamília	Crotalinae Opperl, 1811
Gênero	<i>Bothrops</i> Wagler, 1824
Espécie	<i>Bothrops marajoensis</i> Hoge, 1966

Fonte: McDiarmid, *et. al.*, (1999)

2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolvimento de uma metodologia com menor número de etapas para purificação de uma nova serinoprotease presente no veneno de *Bothrops marajoensis* e caracterizá-la bioquímica e farmacologicamente.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 2.21 Purificar uma serinoprotease a partir do veneno total de *Bothrops marajoensis* utilizando metodologia cromatográfica em sistema HPLC de fase reversa.
- 2.22 Caracterizar físico-quimicamente a serinoprotease através de eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS–PAGE), espectrometria de massa (MALDI–TOF), atividade proteolítica, atividade fibrinogenolítica, inibição da atividade serinoprotease na presença de PMSF.
- 2.23 Caracterizar farmacologicamente a serinoprotease isolada a partir do veneno total de *Bothrops marajoensis*, através da atividade hemorrágica, edematogênica, atividade letal (DL₅₀) e agregação plaquetária.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Veneno e reagentes

O veneno total de *Bothrops marajoensis* foi obtido do Serpentário Proteínas Bioativas Ltda (Fazenda Boa Esperança, Batatais, São Paulo-Brasil).

Foram utilizados camundongos da linhagem SWISS, com peso entre 18-20 g, fornecidos pelo Biotério Central da Unicamp. Os animais foram mantidos em gaiolas abastecidas com água e ração, em ambiente com temperatura e iluminação controladas (12 horas com luz e 12 horas sem luz). Todos os experimentos foram feitos de acordo com as normas estabelecidas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal – COBEA, protocolo N° 1085-2.

Todos os produtos químicos utilizados foram de grau HPLC, grau seqüência ou de alto grau de pureza, obtidos da Sigma- Aldrich Brasil, Merk e Bio Rad.

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

A fração com atividade serinoprotease foi purificada em uma coluna analítica para HPLC de Fase Reversa. O sistema cromatográfico utilizado foi HPLC–PDA 991 (Waters); equipado com duas bombas Waters modelo 510/B, um injetor automático de amostras U6K com um “loop” de 2,0 mL e uma coluna analítica μ -Bondapak C-18 (0,78 X 30 cm) previamente equilibrada com ácido trifluoroacético 0,1%, pH 3,5 (Tampão A). A eluição das amostras foi realizada através de um gradiente linear com acetonitrila 66% + TFA 1% (Tampão B), 5 μ g de veneno total previamente dissolvido em 200 μ L de TFA 0,1% foi aplicado em cada corrida, sendo eluídas as frações a um fluxo constante de 1mL/min. A concentração das frações eluídas foi monitorada pela alteração da absorbância em 280 nm. Estas frações coletadas foram liofilizadas imediatamente e estocadas a -20°C.

3.3 Atividade proteolítica

O substrato sintético N α -BENZOIL-DL-ARGINIL *p*-NITROANILIDA (DL–BA p NA) foi utilizado para a dosagem da atividade proteolítica da amostra. Este substrato tem sido empregado para medir a atividade amidásica para enzimas proteolíticas, tais como tripsina, quimiotripsina, fator Xa, calicreína plasmática humana, trombina e plasmina humana. Este substrato, peptídeo derivado de *p*-nitroanilina, tem sido amplamente

utilizado principalmente pela alta sensibilidade fotométrica na absorvância de 405 nm da *p*-nitroanilina liberada após hidrólise enzimática, segundo o método de Erlanger, *et al.*, (1961) modificado por Ponce-Soto *et al.*,(2007).

Para a determinação da atividade proteolítica da amostra, foi usado o substrato cromogênico sintético BApNA modificado para 96 poços da placa de Elisa (Ponce-Soto *et al.*, 2007). Este substrato foi dissolvido em DMSO (50mg/mL) e 10 µL desta solução foi misturado em 1 mL de tampão (Tris-HCl, 10 mM, CaCl₂ 10 mM, NaCl 100 mM, pH=7.8) que foi a solução substrato cromogênico (0,1M).

A mistura para o ensaio da atividade proteolítica conteve 45µL de tampão (Tris-HCl 10 mM, CaCl₂ 10 mM, NaCl 100 mM, pH=7.8), 180µL de solução de substrato cromogênico BApNA (0,1M), 15 µL de água e 5 µL da amostra, com volume final de 245 µL. Após a adição de 5 µL da amostra em teste, a mistura foi colocada em um meio de incubação, por 30 minutos, a 37°C, e as absorvâncias foram lidas em intervalos de 10 minutos. A atividade enzimática foi baseada no aumento da absorvância após 20 minutos, através da liberação do cromóforo *p*-nitroanilina, que é detectado na absorvância de 405 nm. O ensaio foi realizado em triplicata e a reação lida a 405nm em um VERSA Max microplate reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA).

3.4 Eletroforese em SDS-PAGE

A eletroforese em gel de poliacrilamida foi realizada segundo a metodologia descrita por Laemmli (1970); feita às placas de géis de poliacrilamida (SDS-PAGE) descontínuos, apresentando um gel de concentração de 5% e gel de corrida de 12,5%; preparados a partir de uma solução de acrilamida estoque 30% e bis N,N, metileno-bisacrilamida 0,8% (30% T, 0,8%C) (Bio Rad Labs. Richmond, CA, USA), dissolvidos em água deionizada pelo sistema Milli-Q (Millipore-Waters Co.).

O gel de corrida foi preparado utilizando-se o tampão Tris-HCl 1,0 M, pH 8,8 contendo 0,2% de SDS para solubilização das amostras, 0,1% de N-N-N-N-Tetrametiletilenediamina (TEMED) e 0,01% de persulfato de amônio para polimerização. Após a polimerização deste, foi preparado o gel superior (gel de concentração) com 5% de acrilamida em tampão Tris-HCl 1,0 M, pH 6,8; SDS 0,2%, TEMED 0,1% e persulfato de amônio 0,01%.

As amostras (10 a 50 μ g de proteína) foram diluídas no tampão de amostra (Tris-HCl 0,08 M pH 6,8, SDS 0,02 M, glicerol 0,1 M e azul de bromofenol 0,01 M). A redução das amostras foi feita com Ditioneitol (DTT), em uma concentração final de 0,1 M.

A eletroforese SDS-PAGE foi realizada em sistema duplo de placas "Mighty Small SE 250" (Hofer Scientific Instruments), em tampão de corrida (Tris-HCl 0,025M; glicina 0,192 M com SDS 1 mM pH 8,3). Tanto as amostras quanto os marcadores foram dissolvidos no tampão de amostra (Tris-HCl, 0,075M, pH 6,8; 10% de Glicerol; 4% de SDS; 0,001% de Bromofenol).

A corrida eletroforética foi realizada usando-se uma amperagem constante de 30 mA, durante 90 minutos. Foram usados como padrão os seguintes marcadores de massa molecular, obtidos da Pharmacia: fosforilase b (94 kDa), albumina sérica bovina (67 kDa), ovalbumina (43 kDa), anidrase carbônica (30 kDa), inibidor de tripsina de soja (20 kDa), lisozima (14 kDa).

Após a corrida eletroforética, o gel foi corado com Coomassie Blue R-250 (0,05%). O gel foi embebido em solução corante por 12 horas. Em seguida, o excesso de corante do gel foi lavado com solução descorante (ácido acético 7%) e finalmente interrompeu-se a reação com adição de água.

3.5 Análise de espectrometria de massa (MALDI-Tof)

A massa molecular da serinoprotease de *B. marajoensis* foi analisada por Espectrometria de Massa utilizando um Voyager DE PRO MALDI-TOF (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). 1 μ L da amostra em TFA 0,1% é misturada em 2 μ L da matriz. A matriz foi preparada com ácido α -ciano-4-hidroxi-cinamico (Sigma), 60% acetonitrila e 0.1% v/v TFA e a massa foi analisada sob as condições seguintes: aceleração de voltagem 25 kV, o laser ajustado a 2890 mJ/cm², em 300 ns e o modo de análise foi linear.

3.6 Cinética enzimática

3.6.1 Efeito da concentração do substrato

Para a determinação do efeito da concentração do substrato da serinoprotease TLBm, foi usado o substrato cromogênico sintético BA ρ NA modificado para 96 poços da

placa de Elisa (Ponce-Soto *et al.*, 2007). Esse substrato foi dissolvido em DMSO (50mg/mL) e dessa solução 10 μ L foram misturados em 1 mL de tampão (Tris-HCl, 10 mM, 10 mM CaCl₂, 100 mM NaCl, pH=7.8), que foi a solução substrato (0,1M).

A solução padrão de ensaio conteve 45 μ L de tampão (Tris-HCl 10 mM, CaCl₂ 10 mM, NaCl 100 mM, pH 7.8), 180 μ L de substrato (0,1M), 15 μ L de água e 5 μ L da serinoprotease TLBm, com um volume final de 245 μ L. Depois de colocar a enzima (5 μ L), a mistura foi incubada durante 40 minutos, a 37°C. A atividade enzimática foi baseada no aumento da absorbância, através da liberação do cromóforo *p*-nitroanilina que foi detectado na absorbância de 405 nm. A atividade foi expressa como a velocidade de reação (*V*), e foi calculada baseada na *p*-nitroanilina liberada após a catálise. O ensaio foi realizado em triplicata e a reação foi lida na absorbância em 405 nm em um VERSA Max microplate reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA).

3.6.2 Efeito da temperatura

O experimento para a observação do efeito da temperatura sobre a atividade serinoprotease TLBm foi realizado segundo o método descrito no item 3.6.1, como ensaio padrão contendo 180 μ L de substrato, 15 μ L de água deionizada, 45 μ L de tampão (Tris-HCl 10 mM, CaCl₂ 10 mM, NaCl 100 mM, pH 8,0) e 5 μ L de TLBm. A temperatura variou de 25-45 °C, foi mantida por 40 minutos e lida em seguida a 405 nm. O ensaio foi realizado em triplicata e a reação lida em seguida a 405 nm em um VERSA Max microplate reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA).

3.6.3 Efeito do pH

O experimento do efeito do pH sobre a atividade serinoprotease foi realizado em tampões preparados com diferentes valores de pH (4,0–10,0), sendo que a determinação da atividade serinoprotease e a concentração da enzima foram idênticas às usadas no item 3.6.1. Os tampões utilizados neste 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. O ensaio foi realizado em triplicata e a reação lida a 405nm em um VERSA Max microplate reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA).

3.7 Inibição da atividade serinoprotease

A atividade específica da serinoprotease TLBm frente aos diferentes inibidores foi calculada seguindo o mesmo protocolo para a determinação da atividade proteolítica no item 3.3. A serinoprotease TLBm foi diluída em tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 7,4 na proporção de 1mg/mL e foi pré-incubada com o inibidor PMSF (5mM) por 15 min a 37°C antes de acrescentar ao meio de reação. As proporções da enzima serinoprotease TLBm com o inibidor estão em 1:1 (v/v), após isso, a amostra pré-incubada foi colocada no meio de reação e a velocidade expressa em quantidades de produto formado de *p*-nitroanilina liberado após a catálise.

Assim como o PMSF, também foi testado perante os inibidores EDTA (5mM) dissolvido em água deionizada (agente quelante de diversos íons metálicos), SBT1 (5µg/µL) (possui a habilidade de inibir a tripsina e a quimiotripsina) dissolvido em tampão Tris-HCl 0,05M, pH 7,8 e Soro de *Didelphis marsupialis* (1mg/mL) (agente neutralizante do veneno botrópico) dissolvido em tampão Tris-HCl 0,05M, pH 7,8. Todos esses inibidores também foram feitos nas mesmas condições que o PMSF com proporções da enzima serinoprotease TLBm com o inibidor em 1:1 (v/v), os ensaios realizados em triplicata e as reações lidas a 405 nm em um VERSA Max microplate reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA).

3.8 Atividade fibrinogenolítica

A medida quantitativa foi realizada pelo método descrito por Ware and Seegers (1949), modificado conforme descrito.

Para a determinação da atividade fibrinogenolítica da amostra, utilizamos fibrinogênio bovino na concentração de 2 mg/mL (0,2%) dissolvidos em Tris HCl 0,1 M pH 7,4. A fração purificada TLBm e as outras frações obtidas foram diluídas em tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 7,4 na proporção de 1mg/mL.

A mistura para o ensaio da atividade coagulante conteve 900µL da solução de fibrinogênio (0,2%), 100µL de CaCl₂ (10mM) e 20 µL da amostra, com volume final de 1020 µL.

A atividade coagulante foi determinada medindo-se o tempo de coagulação em tubos de ensaio de vidro ao primeiro sinal da formação da rede de fibrina visível, após a adição de 20 µL da amostra sobre a solução de fibrinogênio previamente incubado com

CaCl₂ 10 mM a 37°C durante 10 minutos (m/v, em função de proteínas coaguláveis), em tampão Tris-HCl 0,1M pH 7.4. O tempo máximo da reação para a formação da rede de fibrina foi de 2 minutos, uma vez que neste intervalo existe uma relação retilínea entre os inversos dos tempos de coagulação e as respectivas concentrações protéicas. O ensaio foi realizado em triplicata.

3.9 Degradação do fibrinogênio

Esta atividade foi ensaiada em gel descontínuo de Poliacrilamida (SDS-PAGE) como estabelecido por Laemmli (1970) e Ouyang and Teng (1976). 160 µL da solução de fibrinogênio (0,2%) (2 mg/mL tampão Tris-HCl 0,01M; NaCl 0,1M; CaCl₂ 10 mM pH 7,8) foram misturados a 15 µL da solução de amostra TLBm (1mg/mL água milliQ) e foram adicionados 230 µL de água deionizada.

Esta mistura, contendo a solução de fibrinogênio com as amostras, foi incubada por diferentes períodos de tempo: 0 Hrs, 0:30 Hrs, 1 Hr, 2 Hrs, 3 Hrs, 6 Hrs, 12 Hrs, 24 Hrs e 36 Hrs.

Após estes tempos, as reações foram interrompidas com 300 µL de uma solução contendo 8,5 M Uréia, 10% β-Mercaptoetanol, 2% SDS; 0,002 M EDTA; 0,02 M Tris-HCl pH 8,0, para depois serem ensaiadas em SDS-PAGE segundo a metodologia descrita no item 3.4.

3.10 Análise de composição de aminoácidos

A análise de composição de aminoácidos foi realizada no analisador automático de aminoácidos PICO-TAG (Sistema Waters) seguindo-se a metodologia descrita por Henrikson e Meredith (1984). A proteína purificada (30 µg) foi hidrolisada a 105°C por 24 horas em 6M de HCl (grau de seqüenciamento) contendo 1% de fenol (w/v). O hidrolisado reagiu com 20 µL da solução de derivatização (etanol:triethylamina:água:fenilisotiocianato, 7:1:1:1, v/v) durante uma hora, à temperatura ambiente. Os aminoácidos derivatizados (PTC aminoácidos) das amostras foram identificados através da cromatografia em HPLC em uma coluna de fase reversa C-18 de acordo com o tempo de retenção dos PTC-aminoácido padrão. Os PTC aminoácidos foram identificados no analisador automático de PTH aminoácidos modelo 120 A (Applied Biosystem) de acordo com o tempo de retenção e as áreas dos picos dos 20

PTH aminoácidos padrão. Para estimativa da composição global, a análise de composição de aminoácidos foi realizada de acordo com método descrito por Herinkson e Meredith (1984).

3.11 Determinação da seqüência N-terminal

A seqüência de aminoácidos foi obtida pelo seqüenciamento da região N-terminal da proteína reduzida e carboximetilada.

O seqüenciamento automático da região N-terminal dos peptídios foi feito em um seqüenciador automático modelo Procise 991 (Applied Biosystem). Os feniltioidantoinaminiácidos foram identificados por comparação com aqueles tempos de retenção dos 20 feniltioidantoinaminiácidos padrão, onde são identificados por comparação com os tempos de retenção, eluídos em 14°C de um sistema de microgradiente e identificados em detector Perkin Elmer serie 200–UV/Vis. Os peptídios contendo Cys foram identificados como feniltioidantoin carboximetil cisteína marcada e confirmada por contagem radioativa (Beckman model L-8 250) (Ponce-Soto *et al.*, 2006).

3.12 Estudo de homologia seqüencial

A seqüência N-terminal de serinoprotease foi pesquisada quanto à sua homologia com outras serinoproteases de seqüências conhecidas usando os serviços eletrônicos BLAST–NCBI (Altschul *et al.*, 1990) e BLITZ EMBL (Collins e Coulson, 1990).

3.13 Atividade hemorrágica

A determinação da atividade hemorrágica foi realizada seguindo a metodologia descrita por Ownby *et al.* (1984).

Prepara-se uma solução estoque da serinoprotease TLBm (1 mg/mL) a partir da qual se preparam soluções de 5, 20, 40, 80 µg/100µL. Essas soluções foram inoculadas via intradérmica (0,1 mL) na região dorsal de camundongos previamente depilados, aos grupos de 4 camundongos de 18 a 20 gr de peso. Após 2 horas de aplicada a inoculação, os animais foram sacrificados e a pele rebatida. A área hemorrágica foi determinada medindo-se os diâmetros cruzados, obtendo-se a média; determina-se

como Dose Hemorrágica Mínima aquela dose de amostra capaz de induzir um diâmetro de hemorragia de 10 mm.

3.14 Determinação da atividade inflamatória

A determinação da atividade inflamatória ocasionada por ação da serinoprotease TLBm foi realizada seguindo a metodologia descrita por Levy (1969), em grupos de 4 camundongos (18-20g).

O edema de pata foi induzido injetando 50 μ L das diferentes soluções de TLBm dentro do tecido subplantar da pata traseira direita.

Para o presente experimento, foi utilizada uma solução estoque da serinoprotease TLBm inicial de 400 μ g/mL (20 μ g/50 μ L) dissolvidas em PBS. Depois foram feitas diluições seriadas, tomando-se 500 μ L da primeira e misturando-se com 500 μ L de PBS (10 μ g/50 μ L), até se alcançar a concentração de 2,5 μ g/50 μ L.

A pata esquerda recebeu 50 μ L de PBS, como controle.

Após a inoculação da serinoprotease TLBm, foram feitas leituras em intervalos de tempo de 0 minuto, 30 minutos, 1 hora, 3 horas, 6 horas e 24 horas. A espessura do edema produzido foi medida usando um micrômetro com relógio analógico para medidas externas (tipo compasso ODI-20).

3.15 Determinação da dose letal 50% (DL₅₀) intracerebroventricular (i.c.v.)

Várias doses da serinoprotease TLBm (0,5 μ g, 1 μ g, 5 μ g, 10 μ g e 20 μ g) foram dissolvidas em 10 μ L de PBS, as quais foram injetadas pela rota intracerebroventricular (i.c.v.) em grupos de 5 camundongos (18-20g) sob condições de anestesia com éter, usando-se microseringas Hamilton (Gutiérrez *et al.*, 1986; Ozcan *et al.*, 2007). Um grupo controle recebeu injeção com PBS como grupo controle negativo e a sobrevivência dos animais foi avaliada 24 horas após, sendo utilizado o método de Probits para o cálculo da DL₅₀ (World Health Organization, 1981).

3.16 Determinação da Agregação plaquetária

O método de Born (1963) foi utilizado para a dosagem da agregação plaquetária que visa a quantificar a formação dos agregados plaquetários *in vitro* quando estimuladas as plaquetas.

Para este ensaio foram coletados 10 mL de sangue de 10 camundongos com 8 semanas de idade com pesos de aproximadamente 20 g, previamente anestesiados com halotano. O sangue foi coletado da aorta abdominal usando uma agulha número 25 montada em uma seringa de poliestireno contendo 1 volume de ACD (Citrato trisódico dihidratado 85 mM, ácido cítrico monohidratado 66.6 mM e D(+)glucose anidro 111 mM) para 6 volumes de sangue. A quantidade de sangue obtido de cada camundongo com peso de 20 g foi de 1mL, aproximadamente.

Para a preparação dos estudos da agregação plaquetária, o sangue total foi colocado em banho maria a 37°C por 30 minutos. Depois foi imediatamente centrifugado o sangue a 180g por 10 minutos, à temperatura ambiente. Logo, gentilmente foi transferido o plasma rico em plaquetas (o sobrenadante) a outro tubo de poliestireno usando uma pipeta plástica.

Após a retirada do plasma rico em plaquetas (PRP) para outro tubo plástico, obteve-se o plasma pobre em plaquetas (PPP) pela centrifugação do mesmo tubo da coleta a 1500g por 10 min. A centrífuga usada foi Fanem Excelsa 204-NR (FANEM - São Paulo - Brasil).

Essas centrifugações e a conservação das amostras foram feitas em tubos vedados para evitar a perda de CO₂, que eleva o pH, interferindo nas curvas de agregação plaquetária.

O PRP foi mantido à temperatura ambiente por 30 minutos antes de começar o ensaio, mas as alíquotas foram esquentadas em 37°C (isto leva 2 minutos) antes de pôr a enzima serinoprotease TLBm, Ristocetina ou a serinoprotease+TLBm na cubeta do agregômetro para o teste e registro da agregação plaquetária.

A medida de agregação foi realizada usando-se um agregômetro de plaquetas de um canal (Agregômetro de Plaquetas PA-04, Qualiterm Eletrônica, Brasil).

Antes de começar o ensaio, o agregômetro foi previamente calibrado com PRP no mínimo de transmitância e com PPP no máximo de transmitância. Esse ajuste é automático. Com isso, foi possível determinar uma amplitude para o registro de agregação deste plasma.

A determinação da agregação plaquetária foi realizada com solução de Ristocetina (1mg/mL) como controle positivo, a enzima serinoprotease TLBm (1mg/mL) e a mesma TLBm pré-incubado com PMSF (5mM) (volumen 1/1) como controle negativo.

3.17 Análise Estatística

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

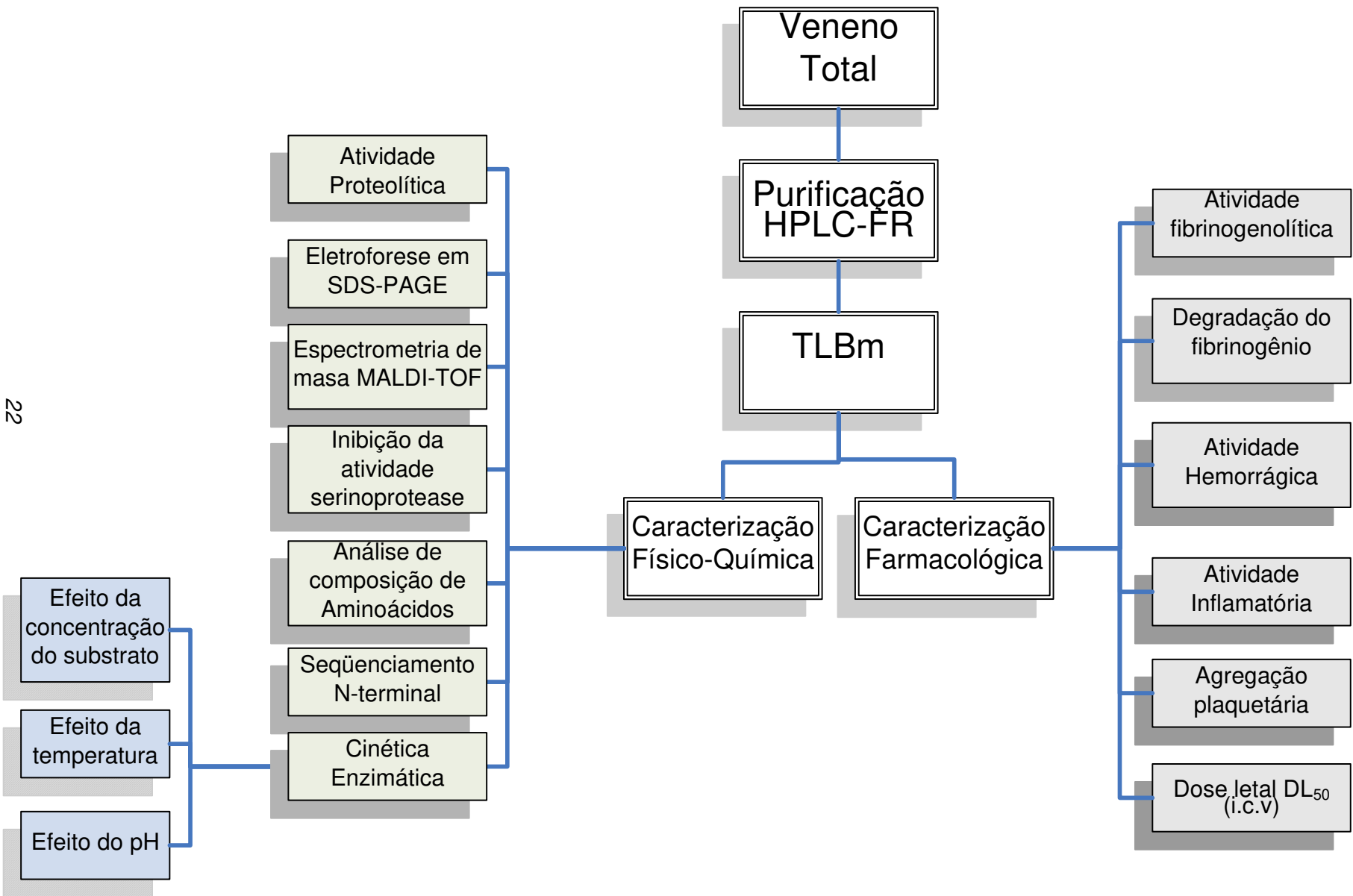


Figura 2. Fluxograma da Caracterização Estrutural e Funcional de uma Serinoprotease isolada a partir do veneno total de *Bothrops marajoensis*.

4. RESULTADOS

4.1 Purificação de uma fração com atividade trombina “like” isolada a partir de veneno total de *Bothrops marajoensis* em HPLC de fase reversa.

A figura 3 mostra o perfil cromatográfico do veneno total em uma coluna analítica μ -Bondapak C-18 (Waters), acoplada a um sistema de HPLC de fase reversa. Foram detectados 18 picos e o monitoramento do perfil da atividade biológica com relação à atividade proteolítica e coagulante foi realizado em todas as frações eluídas, sendo que a fração denominada de TLBm foi a que apresentou atividade enzimática serinoprotease com característica trombina “like”. Essa fração foi eluída no tempo de retenção aos 43 ± 0.5 min., sendo aos 65% do tampão B.

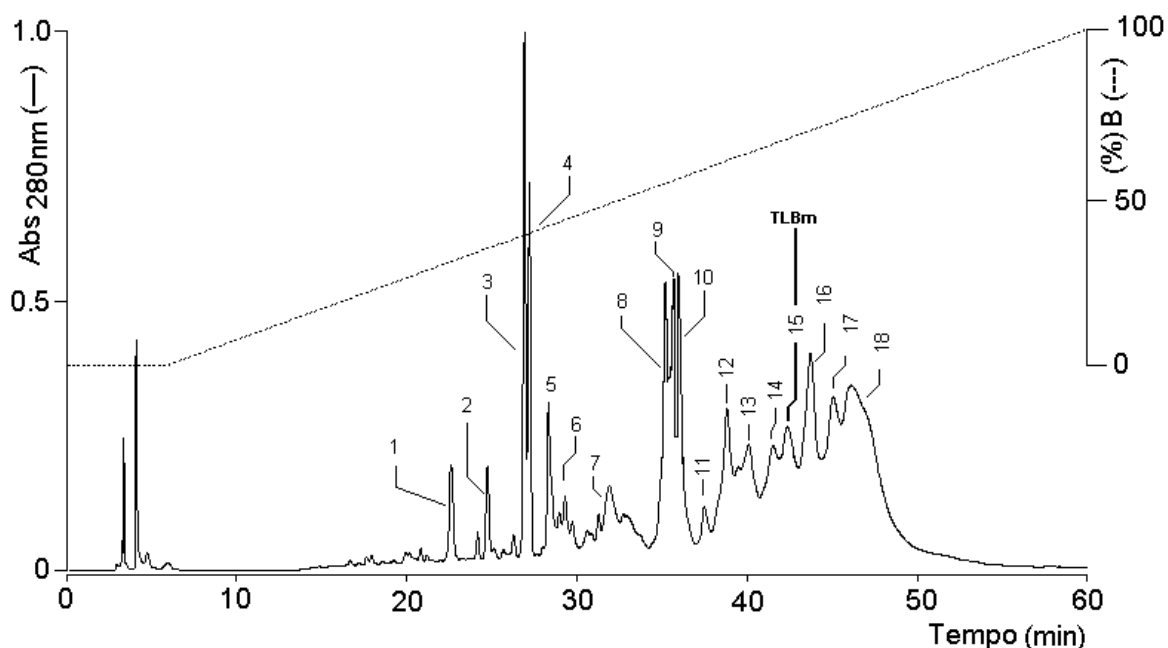


Figura 3 Cromatografia em sistema HPLC-fase reversa em uma coluna analítica C-18 μ -Bondapak (Waters), equilibrada em solução de TFA (ácido trifluoroacético 0,1% pH 3,5 solvente A). 5mg de veneno total foi aplicado em cada corrida. A proteína TLBm (fração 15) foi eluída usando um gradiente linear contínuo de concentração do tampão B (Acetonitrila 66%, TFA 0,1%). O perfil cromatográfico foi monitorado na absorbância de 280 nm. As frações foram eluídas em um fluxo constante de 1 mL/min. Gráfico representativo de 20 corridas cromatográficas.

4.2 Atividade proteolítica da trombina “like” TLBm

O substrato cromogênico utilizado DL-BA_pNA foi usado em uma solução 0,1 M para dosagem das frações (1 mg/mL); 20 µL da amostra foram colocados em um meio de incubação que contém 1000 µL de uma solução de substrato previamente dissolvido em DMSO como solução estoque para ser utilizado na proporção de 1/10 (10 µL) em tampão Tris-HCl 10 mM, 10 mM CaCl₂, 100 mM NaCl, pH 7.8, mais 250 µL de tampão para um volume final de 1350 µL.

Os resultados evidenciam que a fração 15 é correspondente à trombina “like” de *B. marajoensis*, sendo o único que mostrou uma atividade catalítica frente ao substrato cromogênico DL-BA_pNA, com uma leitura de absorbância de 0,15 em um comprimento de onda a 410 nm de acordo com a figura 4.

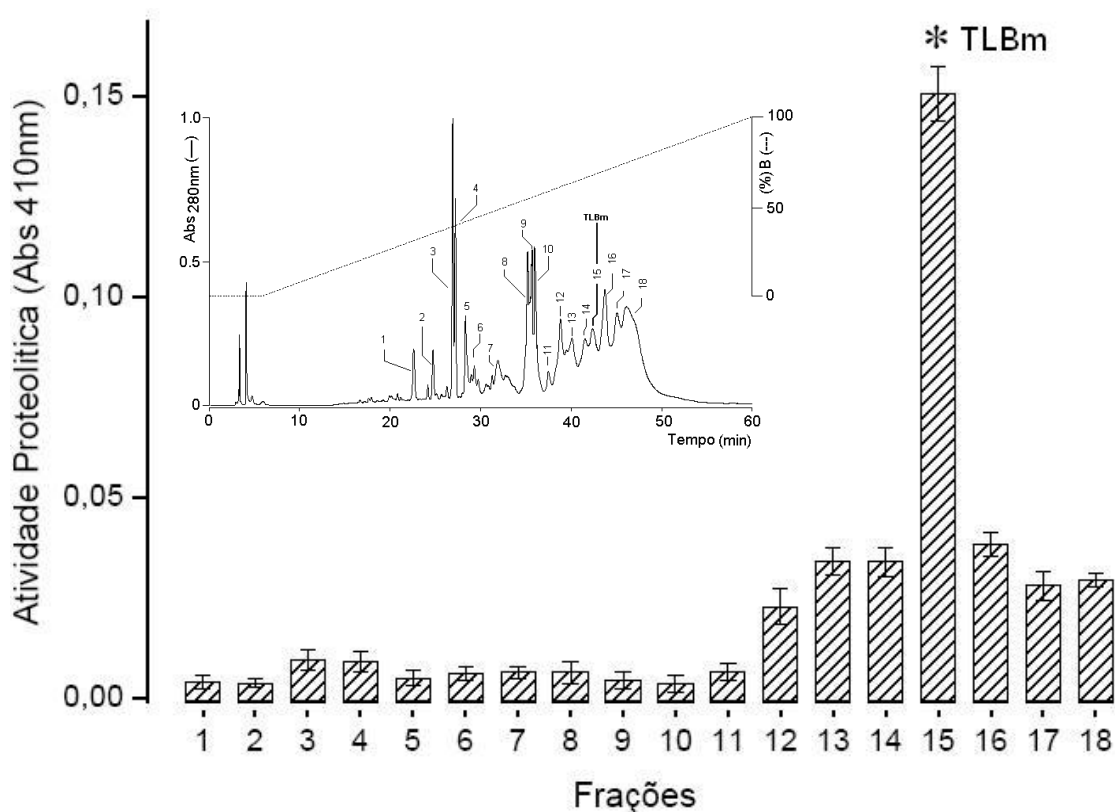


Figura 4. Determinação do perfil da atividade proteolítica das frações obtidas da cromatografia do veneno total de *B. marajoensis* em Cromatografia HPLC-fase reversa. Foram usados 54mM de substrato cromogênico DL-BA_pNA por 20 µg de amostra. O perfil da atividade proteolítica foi monitorado na absorbância de 410 nm. (*) serinoprotease TLBm. Os ensaios da atividade proteolítica foram feitos por triplicata. (n=3)

4.3 Análise de espectrometria de massa (MALDI-Tof) da trombina “like” TLBm

A serinoprotease com atividade trombina “like” de *B. marajoensis* apresenta uma massa molecular de 33.332,5 Da (Figura 5). A determinação da massa molecular real mostra que não existe diferença significativa entre a massa determinada por eletroforese em SDS-PAGE (dados não mostrados).

Através desta análise, pode-se constatar a pureza da fração serinoprotease com atividade trombina “like” de *B. marajoensis* obtida a partir da cromatografia em HPLC de fase reversa.

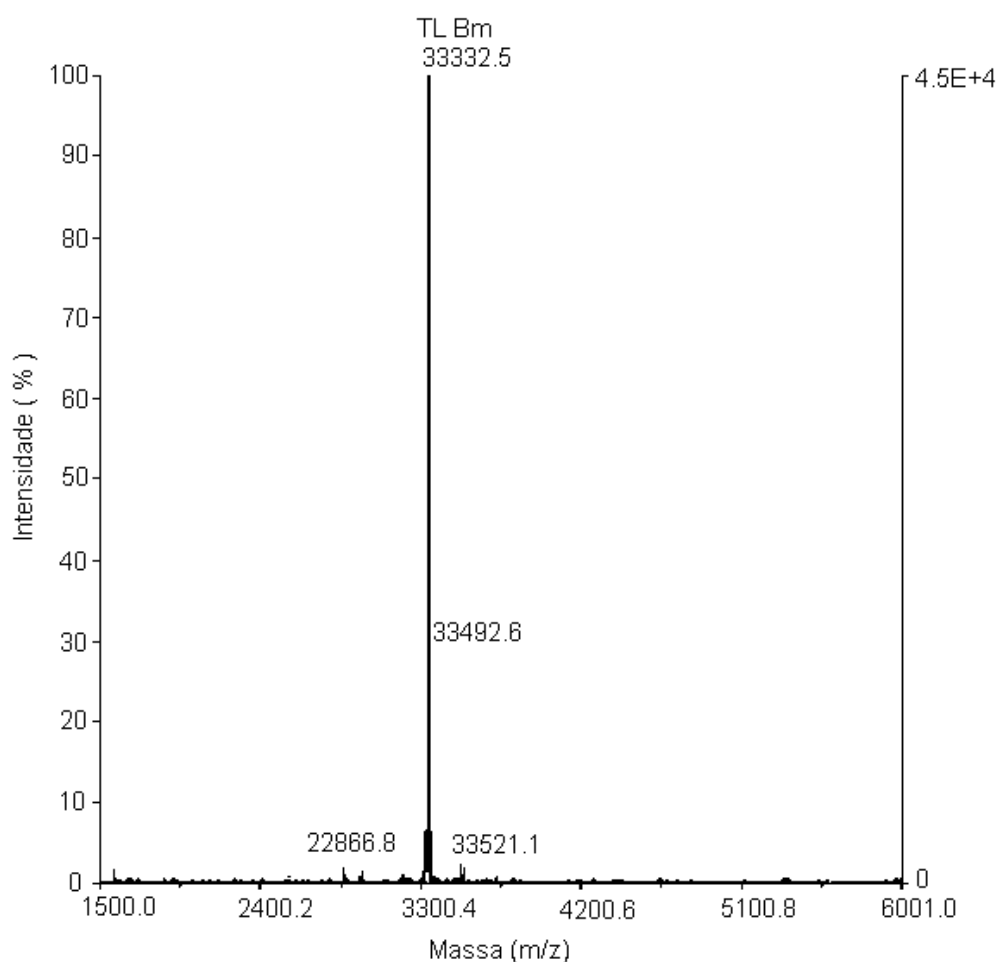


Figura 5 A massa molecular da fração trombina “like” TLBm de *B. marajoensis* é determinada por Espectrometria de Massa sendo de 33.332,5 Da. 1 μ L da amostra em TFA 0,1% é misturada em 2 μ L da matriz e analisada nas condições de aceleração de voltagem 25 kV, o laser ajustado a 2890 mJ/cm^2 , em 300 ns e o modo de análise é linear.

4.4 Estudos da atividade cinética da Trombina “like” TLBm procedente do veneno total de *B. marajoensis*

A medida da atividade enzimática proteolítica foi determinada nas condições de ensaio descritas no método 3.5 utilizando o substrato cromogênico sintético DL-BApNA.

4.4.1 Efeito da concentração do substrato

Os resultados em nossas condições experimentais mostram que a trombina “like” TLBm tem um comportamento michaeliano conforme ilustrado na figura 6.

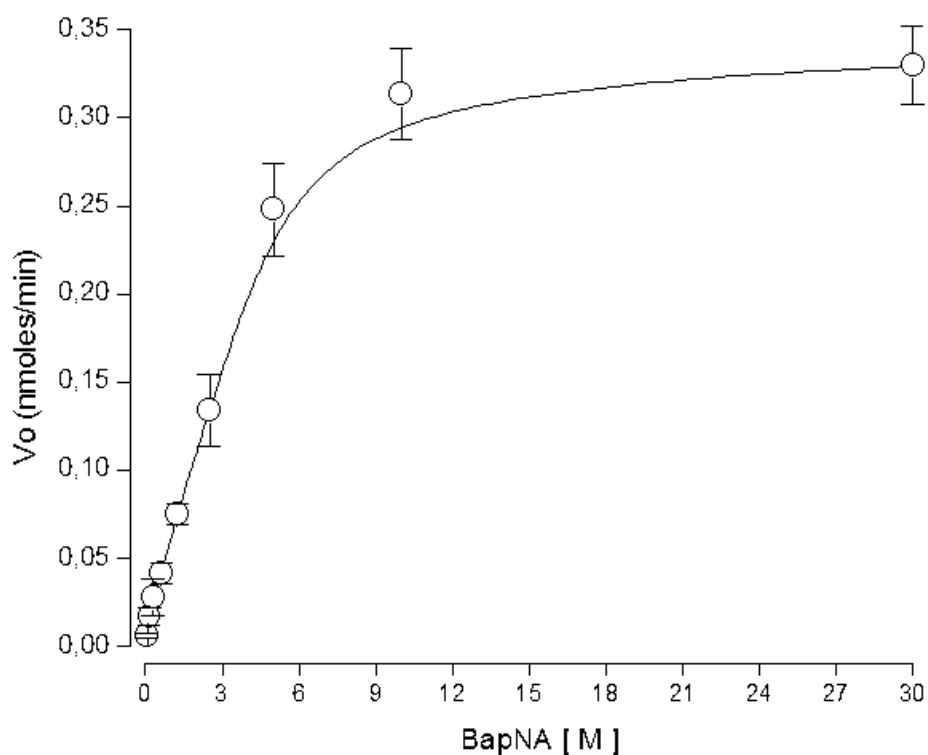


Figura 6. Efeito da concentração do substrato na atividade proteolítica da trombina “like” TLBm. As concentrações empregadas na determinação do efeito da concentração do substrato foram: 0,078; 0,156; 0,312; 0,625; 1,25; 2,5; 5; 10 e 30M de BApNA. Depois foi incubada durante 40 minutos a 37°C. A leitura de absorvância foi monitorada em 405 nm. A atividade é expressa como a velocidade de reação (V_o) e é calculada baseada na *p*-nitroanilina liberada após catálise. Os experimentos foram realizados em triplicata e as barras representam o desvio padrão.

Na análise da re-gráfica empregando o método de Lineweaver-Burk (duplos recíprocos), foi possível calcular as constantes cinéticas de K_M e V_{max} . Assim, os valores obtidos foram: $V_{max} = 2,3 \times 10^{-1}$ nmoles p -NA/Lt/min e o $K_M = 0,52 \times 10^{-1}$ M respectivamente, tal como se pode apreciar na figura 7.

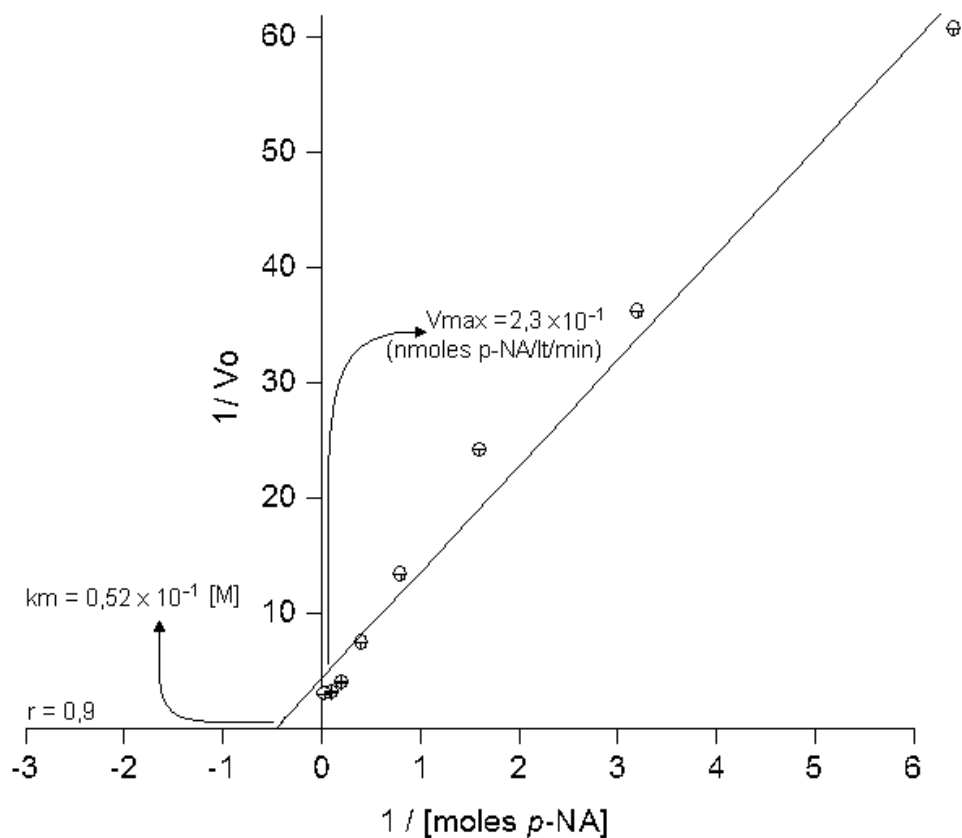


Figura 7. Gráfico do efeito da concentração do substrato na atividade proteolítica da trombina “like” TLBm empregando o método de Lineweaver-Burk (duplos recíprocos). Os valores encontrados para as constantes cinéticas de V_{max} e K_M foram calculados estabelecendo o grau de regressão e correlação (linearidade da reta), entre os inversos da velocidade ($1/V_{max}$) e os inversos ($1/K_M$) da concentração do substrato. Os experimentos foram realizados em triplicata e as barras representam o desvio padrão.

4.4.2 Efeito da temperatura

O efeito da temperatura na atividade proteolítica foi determinado incubando a serinoprotease com atividade trombina “like” em diferentes temperaturas (25 – 45°C). A atividade da enzima a 37°C foi considerada como ótima, tal como se mostra na figura 8.

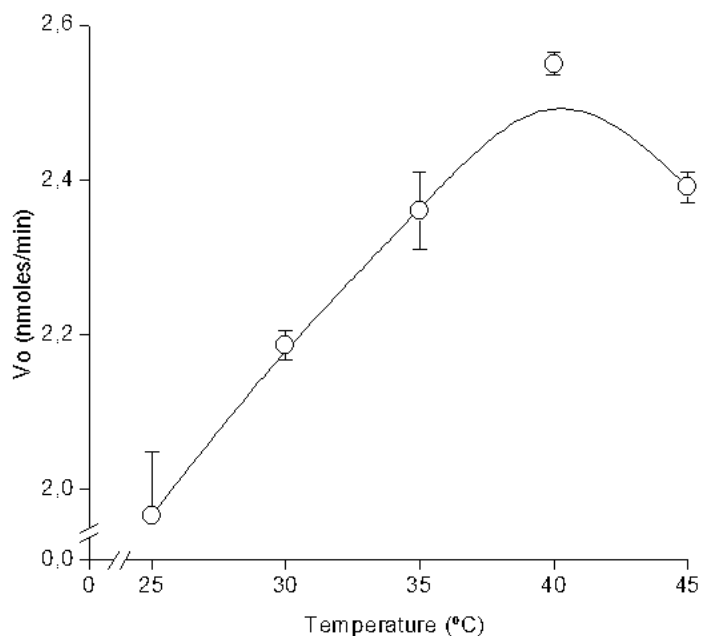


Figura 8. Efeito da variação de temperatura sobre a atividade proteolítica da trombina “like” TLBm. As faixas das temperaturas empregadas foram 25, 30, 35, 40 e 45°C respectivamente. Depois de incubada durante 40 minutos a 37°C, foi feita a leitura de absorvância monitorada em 405 nm. A atividade é expressa como a velocidade de reação (V_o), e é calculada baseada na *p*-nitroanilina liberada após a catálise. Os experimentos foram realizados em triplicata e as barras representam o desvio padrão.

4.4.3 Efeito do pH na atividade proteolítica da trombina “like” TLBm

O pH ótimo da serinoprotease TLBm, foi determinado incubando a enzima em diferentes pHs (4 – 10) sendo feito um controle para cada pH. A atividade da enzima a pH 8 foi considerada como ótimo, tal como se mostra na figura 9.

A enzima mostra estabilidade considerável, mesmo com o aumento do pH a atividade da TLBm não cai rapidamente.

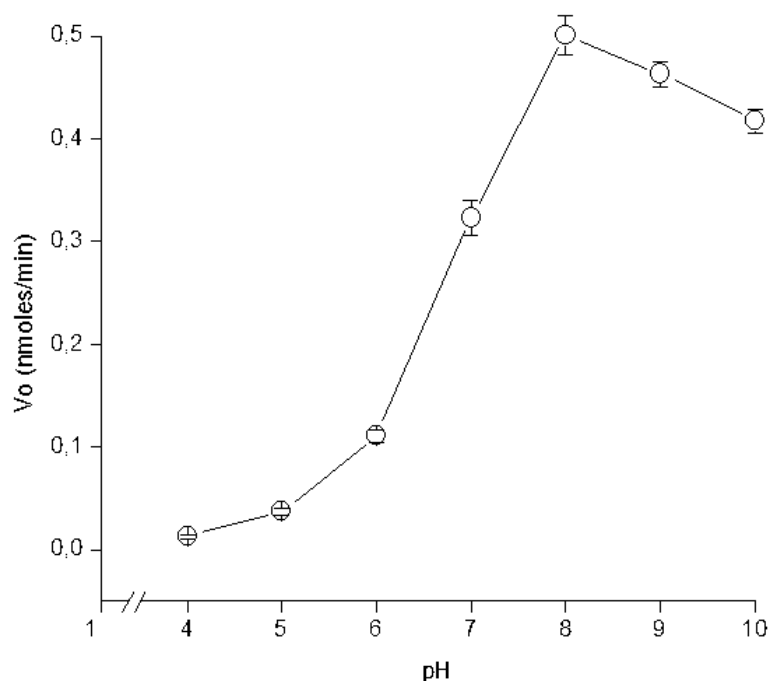


Figura 9. Efeito do pH na atividade proteolítica da trombina “like” TLBm. Os âmbitos de pH empregados foram: 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 10 respectivamente, perante o substrato DL- BA ρ PNA. Depois a enzima foi incubada durante 40 minutos a 37°C. A leitura de absorbância foi monitorada em 405 nm. A atividade é expressa como a velocidade de reação (V_o) e é calculada baseada na *p*-nitroanilina liberada após a catálise. Os experimentos foram realizados em triplicata e as barras representam o desvio padrão.

4.5 Efeito inibitório da atividade proteolítica

Foi ensaiado o efeito inibitório da atividade proteolítica da serinoprotease com atividade trombina “like” TLBm procedente do veneno total de *B. marajoensis*, pela ação dos inibidores: EDTA (5mM), SBIT (5 μ g/ μ L), soro de *Didelphis marsupialis* (1mg/mL) e PMSF (5mM).

Os resultados mostram o claro efeito inibitório do PMSF sobre a atividade proteolítica da serinoprotease TLBm, o que evidencia o caráter serinoprotease da proteína, ao ser inibida significativamente a atividade proteolítica perante o substrato cromogênico DL-BA ρ NA (Figura 10).

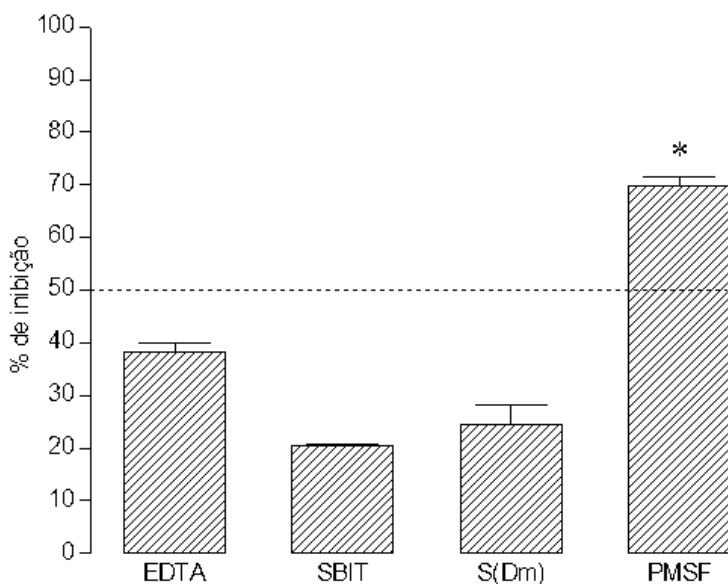


Figura 10. Efeito inibitório da atividade proteolítica da trombina “like” TLBm frente a EDTA, SBIT, soro de *Didelphis marsupialis* e PMSF, frente ao substrato DL-BA ρ NA. Foi incubada durante 40 minutos a 37°C e a leitura de absorbância foi monitorada em 405 nm. A atividade é expressa como a velocidade de reação (V_0), e é calculada baseada na *p*-nitroanilina liberada após a catálise. (*) Nível de significância das concentrações em relação ao controle. (n=3, $p<0,05$).

4.6 Atividade fibrinogenolítica da trombina “like” TLBm

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

As frações obtidas por HPLC de fase reversa foram submetidas à atividade fibrinogenolítica cuja fração TLBm (fração 15) exibiu uma atividade fibrinogenolítica, alcançando o inverso de tempo de coagulação de $0.055 \text{ s}^{-1}(1/T.C)$, como mostrado na figura 11.

A fração TLBm mostrou a máxima atividade fibrinogenolítica.

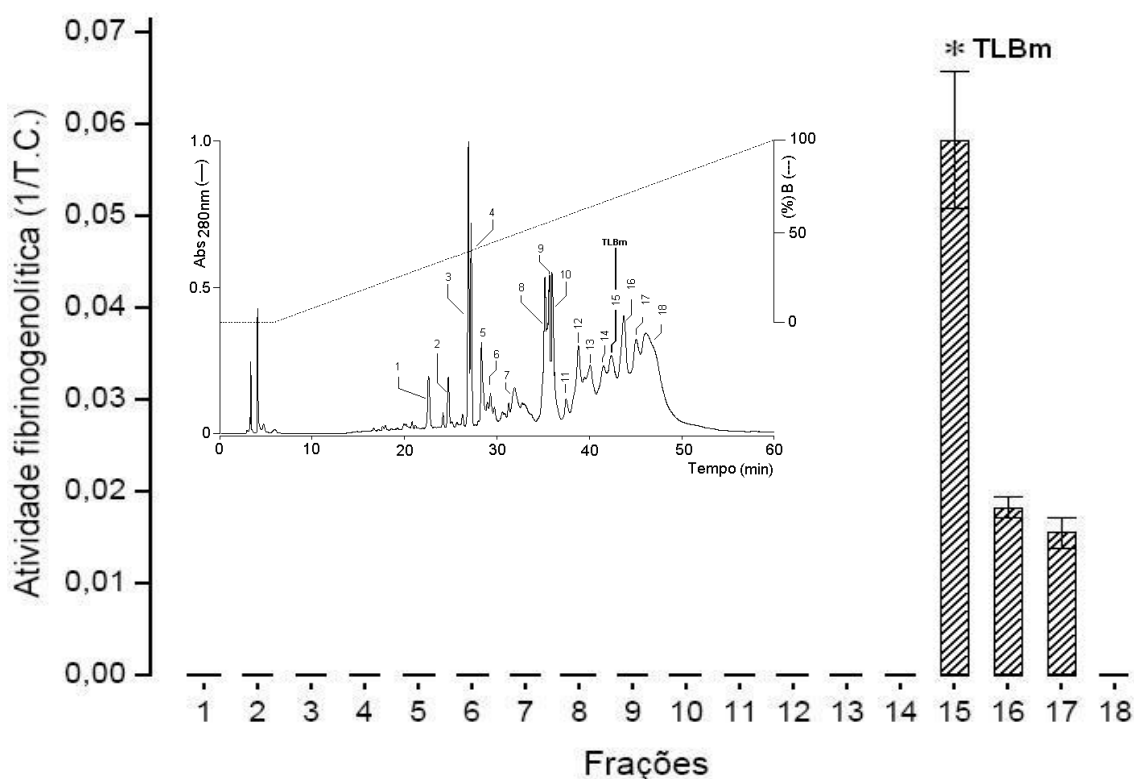


Figura 11. Determinação da atividade fibrinogenolítica utilizando fibrinogênio bovino. A concentração de solução de fibrinogênio empregado foi de 2 mg/mL (0,2%). 20 μ g da fração TLBm isolada a partir do veneno total de *B. marajoensis* igual as outras frações obtidas por HPLC fase reversa foram diluídas em buffer Tris-HCl 0,1 M (pH 7.4) e submetidas ao teste fibrinogenolítico. O tempo máximo de espera para a formação da rede de fibrina foi de 2 minutos a 37°C. A atividade coagulante foi determinada medindo-se os inversos do tempo de coagulação ao primeiro sinal da formação da rede de fibrina. (*) Nível de significância das concentrações em relação ao controle. (n=3, $p < 0,05$).

4.7 Degradação do fibrinogênio pela ação da trombina “like” TLBm e sua análise por SDS-PAGE

A atividade fibrinogenolítica foi ensaiada de acordo com o método estabelecido por Ouyan e Teng (1976). 160 μ L da solução de fibrinogênio foi misturado com 15 μ L da solução de TLBm e foram adicionados 230 μ L de água deionizada.

As amostras, depois de serem incubadas por diferentes períodos de tempo, a saber, 0 h, 0:30 h, 1 h, 2 h, 3 h, 6 h, e 12 h, tiveram as reações interrompidas com 300 μ L de 8,5 M Uréia, 10% β -Mercaptoetanol, 2% SDS; 0,002 M EDTA; 0,02 M Tris-HCl pH 8,0.

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

Os resultados mostrados na figura 12 evidenciam que a trombina “like” TLBm isolada a partir do veneno total de *B. marajoensis* possui uma atividade trombina “like” capaz de degradar os fibrinopeptídeos alfa (α) e beta (β) da molécula de fibrinogênio bovino. Assim, depois de 1 hora de incubação, as cadeias se mostram hidrolisadas pela ação da trombina “like”.

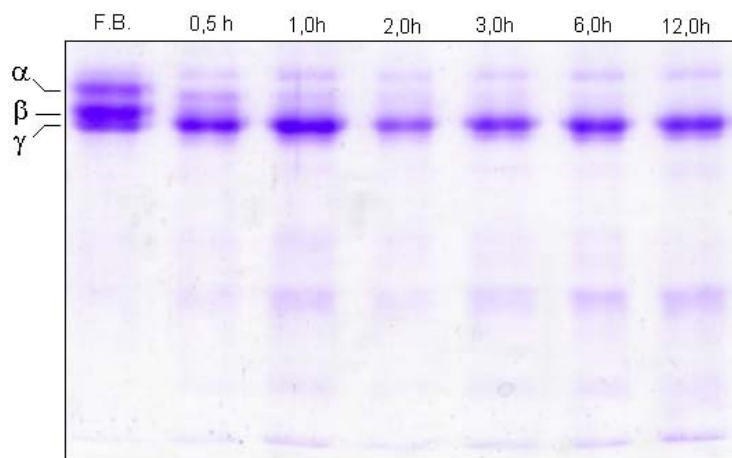


Figura 12. SDS-PAGE (12,5%). Análise de degradação de fibrinogênio bovino por ação de TLBm em diferentes tempos de incubação a 37°C: 0,5h, 1:00 h, 2:00 h, 3:00 h, 6:00 h, e 12:00 h. Em FB temos a molécula de fibrinogênio a 0 minuto de reação, mostrando a presença das cadeias α , β e γ da molécula de fibrinogênio.

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

A análise da composição de aminoácidos da trombina “like” TLBm de *Bothrops marajoensis* (Tabela 3).

A análise de composição global de aminoácidos mostra que se trata de uma proteína de caráter ácido pela alta presença de Glu/x e Asp/n. As 12 cisteínas detectadas evidenciam a possível presença de 6 pontes dissulfeto, característica molecular desta família de proteína. É evidenciada uma elevada porcentagem de aminoácidos hidrofóbicos, tais como Gly, Pro, Leu e Ile.

Tabela 3. Composição de aminoácidos da trombina “like” TLBm de *Bothrops marajoensis*. Os valores são expressos em mol de aminoácidos por mol de proteína. (*) Não determinado pelo método.

Aminoácido	TLBm	%
Asx	33	13
Glx	21	8
Ser	18	7
Gly	22	8
His	5	2
Arg	15	6
Thr	10	4
Ala	15	6
Pro	17	7
Tyr	13	5
Val	15	6
Met	4	2
Cys	12	5
Ile	17	7
Leu	24	9
Phe	6	2
Lys	14	5
Trp	*	
Total	261	100

4.9 Estudo da região N-terminal e estudo de homologia seqüencial da trombina “like” TLBm

A seqüência N-terminal da trombina “like” TLBm pode ser observada na figura 11, e em alinhamento com outras proteínas de seqüências já determinadas e registradas no banco de dados, demonstrou possuir um alto grau de homologia seqüencial (55,9 – 79,4 %).

A região encerrada da figura 13 representa a seqüência consenso entre as diferentes serinoproteases trombina “like” provenientes de serpentes, indicando tanto regiões altamente conservadas quanto variáveis.

Existem diferenças na posição de alguns aminoácidos entre a trombina “like” TLBm de *B. marajoensis*, na região N-terminal, como é o caso dos aminoácidos: (S)12→(H)12 e (V)15→(L)15.

		*	10		20	*	30		(%)																														
TL_Bm	V	I	G	G	D	E	C	N	I	N	-	E	S	R	F	V	A	F	L	Y	-	-	S	P	R	Y	F	C	G	G	T	L	I	N	Q	E	W	...	100,0
Ba_III_4_TL	V	I	G	G	D	E	C	D	I	N	-	E	H	P	F	L	A	F	M	Y	Y	-	S	P	R	Y	F	C	G	M	T	L	I	N	Q	E	...	79,4	
Bat_TL	V	I	G	G	D	E	C	D	I	N	-	E	H	P	F	L	A	F	M	Y	Y	-	S	P	R	Y	F	C	G	M	T	L	I	N	Q	E	...	79,4	
Bot_TL	V	I	G	G	D	E	C	D	I	N	-	E	H	P	F	L	A	F	M	Y	Y	-	S	P	Q	Y	F	C	G	M	T	L	I	N	Q	E	...	76,5	
Gyr_TL	V	I	G	G	D	E	C	N	I	N	-	E	H	R	F	L	V	A	L	Y	D	G	L	S	G	T	F	L	C	G	G	T	L	I	N	...	64,7		
Fla_TL	V	I	G	G	D	E	C	N	I	N	-	E	H	P	F	L	V	A	L	Y	D	A	W	S	G	R	F	L	C	G	G	T	L	I	N	...	64,7		
Cro_TL	V	I	G	G	D	E	C	N	I	N	-	E	H	R	F	L	V	A	L	Y	D	Y	W	S	Q	L	F	L	C	G	G	T	L	I	N	...	64,7		
Cal_TL	V	I	G	G	D	E	C	N	I	N	N	E	H	R	F	L	V	A	L	Y	N	S	R	S	R	T	L	F	C	G	G	T	L	I	N	...	64,7		
Bil_TL	I	I	G	G	D	E	C	N	I	N	-	E	H	R	F	L	V	A	L	Y	D	V	W	S	G	S	F	L	C	G	G	T	L	I	N	...	61,8		
Anc_TL	V	I	G	G	D	E	C	N	I	N	-	E	H	R	F	L	V	A	V	Y	E	G	T	N	W	T	F	I	C	G	G	V	L	I	H	...	55,9		

Figure. 13 Alinhamento da seqüência N-terminal da serinoprotease com atividade trombina “like” TLBm procedente de *B. marajoensis*, com a seqüência de outras serinoproteases semelhantes, procedentes de veneno de serpentes obtidas da base de dados BLAST-protein data bank (PubMed–Medline). Ba III-4 TL *B. atrox* (Ponce-Soto et al., 2007), Bat TL *B. atrox* (Petretski et al., 2000), Bot TL *B. jararaca* (Kawasaki et al., 1996), Gyr TL *Lachesis muta muta* (Castro et al., 2001), Fla TL *Trimeresurus flavoviridis* (Deshimaru et al., 1996), Cro TL *Crotalus adamanteus* (Pirkle and Stocker, 1991), Cal TL *Gloydus ussuriensis* (Hahn et al 1996), Bil TL *Agkistrodon bilineatus* (Nikai et al., 1995) e Anc, *Agkistrodon rhodostoma* (Burkhart et al., 1992). Os espaços inseridos no alinhamento são para mostrar a máxima similaridade. Os resíduos de Cys (*) são altamente conservados em todas as seqüências respectivamente.

4.10 Caracterização farmacológica da serinoprotease com atividade trombina “like” TLBm procedente de *B. marajoensis*

4.10.1 Determinação da atividade hemorrágica

Foi determinada a atividade hemorrágica da serinoprotease com atividade trombina “like” procedente do veneno total de *B. marajoensis*, a qual foi ensaiada nas seguintes concentrações: 5, 20, 40, 80 e 100 µg/100µL.

Essas soluções são inoculadas via intradérmica 0,1 mL a grupos de 4 camundongos de 18 a 20 gr de peso. Depois de 2 horas de aplicada a injeção, determina-se como Dose Hemorrágica Mínima aquela dose de amostra capaz de induzir um diâmetro de hemorragia de 10 mm. De acordo com nossos resultados, não foi evidenciado efeito hemorrágico nenhum. A tabela 4 mostra os valores encontrados.

Tabela 4 Efeito da atividade hemorrágica da serinoprotease com atividade trombina “like” TLBm

Dose (µg/100µL)	Media (mm)	SD (±)
Controle	1,23	0,05
5	1,36	0,05
20	1,36	0,05
40	1,46	0,05
80	1,43	0,05
100	1,46	0,05

4.10.2 Determinação da atividade inflamatória

Foi estimada a ação inflamatória da serinoprotease com atividade trombina “like” TLBm procedente do veneno de *Bothrops marajoensis* “in vivo”, através de edema de pata.

Foram inoculadas as concentrações de 2; 5; 5; 10 e 20 μ g/50 μ L na região subplantar do camundongo. A figura 14 mostra a ação edematizante da TLBm, observando-se um efeito inflamatório discreto. Após 24 horas, o efeito inflamatório diminui drasticamente, até alcançar os níveis normais.

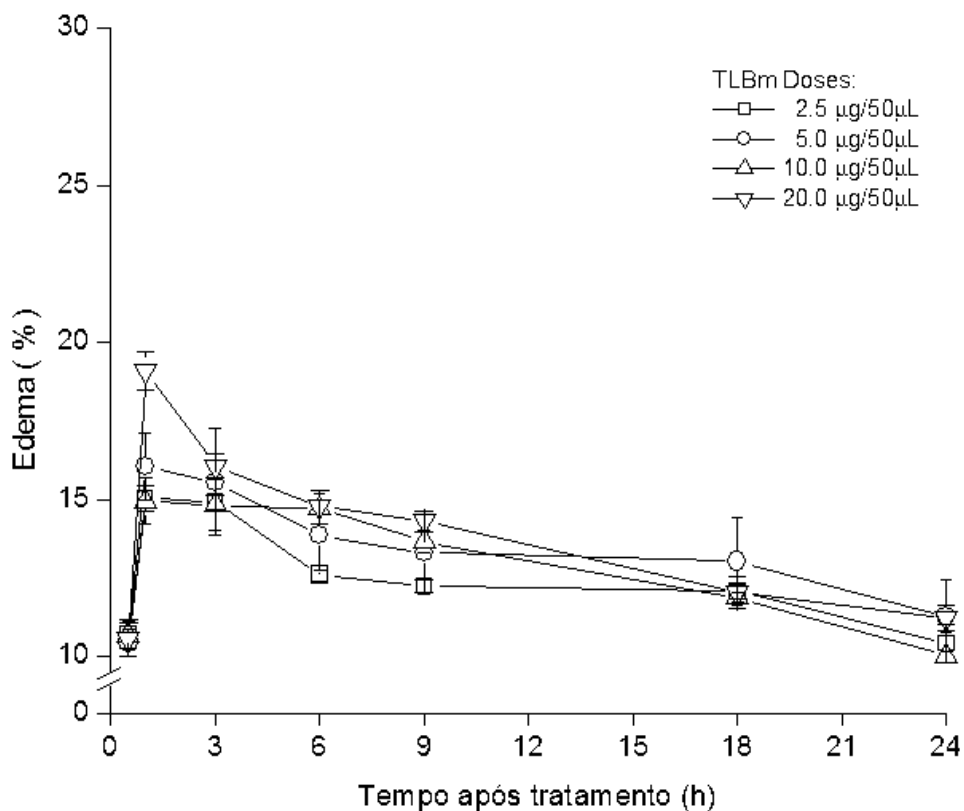


Figura 14. Representação gráfica da atividade inflamatória da serinoprotease com atividade trombina “like” de *B. marajoensis* inoculados na região subplantar do camundongo. O aumento do volume de inflamação atingida pela pata do animal ao longo do tempo, até 24 horas, sendo comparado com o controle e expresso em porcentagem de edema induzido. As doses aplicadas de TLBm foram: 2,5; 5; 10 e 20 μ g /50 μ L (n=3). Nível de significância das concentrações em relação ao controle ($p < 0,05$).

4.10.3 Determinação da dose letal 50% (DL₅₀) intracerebroventricular (i.c.v.)

A atividade letal (DL₅₀) da serinoprotease com atividade trombina “like” TLBm procedente de *Bothrops marajoensis* é testada por via intracerebroventricular (i.c.v) e é estimada em 0,313mg/kg, atingindo um intervalo de confiança (CI 95%) 0,135mg/kg – 0,780mg/kg. É utilizado o método de Probits para a determinação da Dose Letal.

Tabela 5 Determinação da dose letal DL50 em camundongos (18-20g) (n=5)

Dose	Vivos	Óbitos
0,5 µg/µL	5	0
1,0 µg/µL	5	0
5,0 µg/µL	3	2
10 µg/µL	2	3
20 µg/µL	0	5

4.10.4 Determinação da Agregação Plaquetária

O teste de agregação plaquetária realizado com a fração TLBm mostra que a proteína agrega plaquetas diretamente e é capaz de induzir a inibição da agregação plaquetária em presença de PMSF.

Inicialmente incubaram-se as PRP com Ristocetina (1mg/mL) e o resultado foi a ativação da agregação plaquetária (controle positivo); em uma segunda incubação foi adicionada PRP com a fração TLBm e após 6 minutos de leitura foi evidenciada a ativação da agregação plaquetária.

Depois foram incubadas as PRP com a fração TLBM previamente incubadas com PMSF e o resultado observado foi a inibição da agregação plaquetária (controle negativo) de acordo com o mostrado na figura 15. O efeito inibitório da serinoprotease pela ação do PMSF foi evidenciado ao não mostrar a agregação das plaquetas.

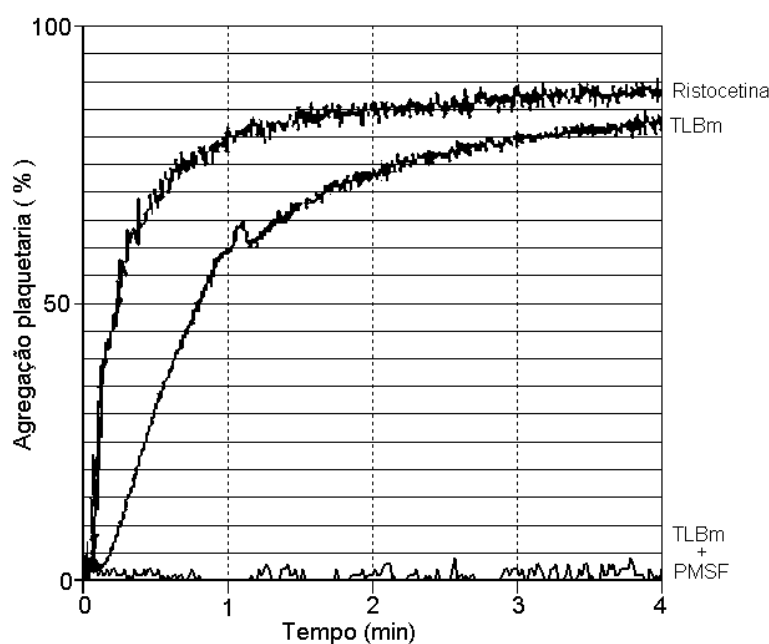


Figura 15. Representação gráfica da agregação plaquetária induzida pela serinoprotease com atividade Trombina "like" TLBm procedente do veneno de *B. marajoensis*. No quadro mostra-se a presença do agregante RISTOCETINA, (1mg/mL), onde se observa o processo de agregação plaquetária. O efeito da agregação plaquetária é evidenciado pela presença da serinoprotease TLBm (1mg/mL).

5. DISCUSSÃO

As glândulas de veneno de serpentes sintetizam uma grande variedade de serinoproteases capazes de afetar o sistema hemostático. A família de serinoproteases de veneno de serpentes inclui enzimas que transformam o fibrinogênio em fibras de fibrina (Zhang *et al.*, 1998), ativam o fator V de coagulação (Tokunaga *et al.*, 1988) e proteína C do plasma (Kisiel *et al.*, 1987; McMullen *et al.*, 1989), liberando cininas de calicreinogênios (Markland, 1998) e clivando componentes do complemento C3 (Tambourgi *et al.*, 1994), causando desequilíbrios do sistema hemostático da presa (Serrano e Maroun, 2005).

Até o presente momento, têm sido reportados trabalhos de purificação e isolamento de serinoproteases, usando vários passos cromatográficos, tais como: em gel filtração em Sephacryl S-100-HR e DEAE-5PW (Petretski *et al.*, 2000), Sephacryl S-200 seguido por cromatografia de afinidade em resina sepharose–agmatine para logo passar em cromatografia de troca iônica em DEAE-Sepharose CL-6B a pH 8.5 (Magalhães *et al.*, 2007); cromatografia por afinidade em ρ -Aminobenzamidine substituído com agarose (Holleman e Weiss, 1975), ou por coluna Sepharosebenzamidine CL-6B (Watanabe *et al.*, 2002) e outros usando três passos cromatográficos: cromatografia HPLC de exclusão molecular (Superdex 75) seguido por purificação em DEAE 5PW e por último em uma coluna Hi Trap Benzamidine FF (Pharmacia) (Braga *et al.*, 2006).

A utilização de muitas etapas de purificação faz com que sejam utilizadas etapas intermediárias de concentrações através de liofilizações, cuja estimativa laboratorial indica que ocorra perda de 20% de material em cada etapa.

Ponce-Soto, *et al.*, (2007) isolaram e caracterizaram uma nova trombina “like” denominada como Ba III 4, com atividade serinoprotease a partir de veneno total de *Bothrops atrox* em uma combinação de dois passos cromatográficos. Em nossos resultados, através de veneno total de *B. marajoensis* submetido em cromatografia de HPLC fase reversa, conseguimos isolar uma trombina “like” não descrita na literatura em uma única etapa cromatográfica, conseguindo, assim, simplificar o processo de purificação (Figura 3).

Com essa adequação de metodologia, evitamos a perda de material nas etapas de concentração (liofilização) e conseqüente perda da atividade biológica, conseguindo prover, dessa maneira, suficiente material para os demais ensaios bioquímicos e

biológicos. A trombina “like” isolada na fração 15 foi denominada de TLBm (Trombina “like” de *Bothrops marajoensis*) (Figura 3).

A presença de uma trombina “like” foi caracterizada pela atividade proteolítica sobre o substrato cromogênico artificial como o DL-BA_pNA, sendo indicativo que esta enzima tem capacidade proteolítica, atuando preferencialmente sobre as ligações arginil, como podemos verificar sobre o substrato artificial DL-BA_pNA, que contém a ligação específica (Arg-Gly), onde atuam as serinoproteases.

A determinação do perfil da atividade proteolítica das frações oriundas da cromatografia obtida de *Bothrops marajoensis* em HPLC de fase reversa mostrou que a trombina “like” TLBm apresenta atividade de clivagem frente ao substrato cromogênico DL-BA_pNA, evidenciando assim seu caráter proteolítico de serinoprotease.

Tem sido descrito na literatura que esta família de proteínas de veneno de serpentes da família viperidae possui uma massa molecular no âmbito de 30-35 kDa, como descritas por Cavinato *et al.*, (1998) e Zaganelli *et al.*, (1996).

Com o objetivo de determinarmos a massa molecular da serinoprotease da TLBm, submetemos essa fração em SDS-PAGE, de onde obtivemos uma massa molecular relativa aos marcadores de massa molecular em torno de 33 kDa (dados não mostrados) e essa fração, quando submetida à espectrometria de massa MALDI-TOF (forma linear), mostrou uma massa molecular com uma alta exatidão de 33.332,5 Da (Fig. 5), mostrando alto grau de pureza e confirmando os resultados obtidos por SDS-PAGE. Esses resultados correspondem às massas moleculares daquelas enzimas trombina “like” descritas por Ponce-Soto *et al.*, (2007) e Petretski *et al.*, (2000).

As constantes cinéticas de K_M ($0,52 \times 10^{-1}M$) e V_{max} ($2,3 \times 10^{-1}$ nmoles p -NA/Lt/min) da serinoprotease com atividade trombina “like” procedente do veneno total de *B. marajoensis* são semelhantes a outras trombinas “like” procedentes de veneno de serpentes Au *et al.*, (1993); Cavinato *et al.*, (1998) e Petretski *et al.*, (2000).

Com relação ao estudo cinético, a atividade proteolítica da serinoprotease usando substrato DL-BA_pNA pode ser verificada frente a diferentes faixas de pH; o pH ótimo para as serinoproteases com atividade trombina “like” em estudo mostra ser comum entre si, cujos valores ótimos se encontram entre 8,0 e 8,5 (Ponce-Soto, *et al.*, (2007). Assim, temos que a TLBm evidencia sua atividade ótima em pH de 8.0 (Figura 9).

Outro parâmetro cinético utilizado para se caracterizar a serinoprotease com atividade trombina “like” é a variação na temperatura. Tem sido registrado que a serinoprotease com atividade trombina “like” BjussuSP-1 de *Bothrops jararacussu* é altamente estável a temperaturas diferentes (Sant’ Ana *et al.*, 2007); a temperatura ótima para atividade da TLBm foi em torno de 37°C, e mesmo a 40-45°C, esta ainda não havia sofrido uma queda brusca na sua atividade (Figura 8). Os resultados de pH e temperatura ótimos corroboram que a fração de TLBm purificada deva estar entre os grupos das serinoprotease com atividade trombina “like”.

As serinoproteases no geral, assim como aquelas procedentes de veneno de serpentes, podem ser inibidas pela ação do PMSF, ao agir diretamente na tríade catalítica, sobre o resíduo de Ser (193), impedindo dessa forma que aconteça a catálise (Petretski *et al.*, 2000; Ponce-Soto *et al.*, 2007). Em nossos resultados, a atividade da serinoprotease com atividade trombina “like” TLBm também foi inibida pela ação do PMSF e outros inibidores, tais como EDTA e SBIT, de forma significativa (Figura 10). Esses resultados sugerem que o mecanismo da catálise desta enzima, provavelmente, é semelhante, na organização do sítio ativo, à enzima tripsina.

De outro lado, tem sido estudada a resistência dos efeitos de veneno de serpentes extensivamente pela ação do soro do *Didelphis virginiana* procedente de América do norte, assim como inibidores de proteases isolados do soro desta espécie de marsupial e que é capaz de proteger dos efeitos tóxicos das metaloproteases e toxinas hemorrágicas presentes no veneno de *Crotalus atrox*. Uma proteína semelhante tem sido encontrada no soro dos marsupiais sul americanos *Didelphis marsupialis* e *Didelphis albiventris*.

Na atualidade, vem-se investigando a resistência natural de animais a venenos de serpentes do soro do gambá *Didelphis marsupialis*, isolando e caracterizando duas glicoproteínas de 40 e 43kDa (DM40 e DM43), capaz de inibir as atividades de metaloproteases encontradas nos venenos por formação de complexos não-covalentes (Neves-Ferreira *et al.*, 2002). Uma proteína antimiotóxica com estrutura de imunoglobulina-like denominada DM64 foi isolada recentemente do soro de *Didelphis marsupialis* (Rocha, *et al.*, 2002).

Em nosso trabalho, avaliamos que o soro total de *Didelphis marsupialis* é capaz de inibir a atividade proteolítica da serinoprotease TLBm, possivelmente através da formação de complexos não-covalentes. Dessa forma, o soro do *Didelphis* também

contém proteína capaz de inibir a ação das serinoproteases, e o desenvolvimento de uma proteção antiveneno baseada nesse tipo de inibição será capaz de inibir tanto metalo como serinoproteases.

A literatura mostra muitas evidências do interesse acadêmico sobre os componentes do veneno de serpentes nas investigações nos campos de hemóstases e trombozes, pelos distúrbios causados pelas serinoproteases causando um efeito dramático no envenenamento; os investigadores estão usando estas enzimas em práticas de testes laboratoriais, estudos teóricos e aplicações clínicas (Chudzinski-Tavassi e Claine de Albuquerque, 2007). O veneno botrópico possui capacidade de ativar fatores da coagulação sangüínea, ocasionando consumo de fibrinogênio e formação de fibrina intravascular, induzindo, freqüentemente, um estado de incoagulabilidade sangüínea.

A maioria das serpentes do gênero *Bothrops* possui, isolada ou juntamente dentro do veneno, substâncias capazes de ativar fibrinogênio, protrombina e fator X. Nahas *et al.*, (1979) e Kini (2005) realizaram estudos comparativos com venenos de *Bothrops sp.*, encontrando variações na capacidade coagulante em diferentes espécies e subespécies.

Existem serinoproteases que têm atividade fibrinogenolítica e fibrinolítica, mas muitas delas especificamente clivam somente fibrinogênio, liberando preferencialmente ou fibrinopeptídios A (venombin A) ou fibrinopeptídios B (venombin B), ou ambos fibrinopeptídios A e B (venombins AB), promovendo a coagulação. Já que as serinoproteases imitam a função das trombinas de mamíferos de clivar os fibrinopeptídios A e os fibrinopeptííios B, elas têm sido conhecidas como enzimas trombina “like” (Markland, 1998).

A trombina “like” TLBm isolada do veneno de *Bothrops marajoensis* mostrou a capacidade procoagulante frente ao fibrinogênio bovino, revelando a sua atividade de trombina “like”, como mostrado na figura 5, degradando as cadeias polipeptídicas α e β do fibrinogênio.

De acordo com nossos resultados, a trombina “like” TLBm isolada revelou a capacidade de hidrolisar as cadeias α e β do fibrinogênio bovino, mas não a cadeia γ ; o que sugere que a TLBm provavelmente possa se agrupar no grupo venombin AB (Fig. 12).

Quando as trombina “like” clivam as cadeias α e/ou β do fibrinogênio, liberando fibrinopeptídios A e/ou B, converte-se o fibrinogênio em fibrina, com conseqüente formação de monômeros de fibrina. Essas quebras não são exatamente idênticas às liberadas pelas enzimas α -trombinas de mamíferos, já que estas enzimas trombina “like” não ativam o fator XIII de coagulação e só liberam os monômeros de fibrina que não são entrecruzados, fazendo que os coágulos formados sejam coágulos de fibrina solúvel e estes sejam rapidamente dispersados (Serrano e Maroun, 2005), dificultando a coagulação. Dessa forma, a TLBm é um modelo em potencial a ser utilizado como agente desfibrinogenante em várias condições clínicas de coagulopatias (Neville e Vaughan, 2005).

A análise de composição de aminoácidos da serinoprotease com atividade trombina “like” TLBm mostrou um alto conteúdo de Glu/x e Asp/n. A presença de 12 cisteínas sugere a possível formação de 6 pontes dissulfeto, característica molecular desta família de proteína (Tabela 3). De outro lado, pode ser observada uma elevada porcentagem de aminoácidos hidrofóbicos, tais como Gly, Pro, Leu e Ile, o que poderia estar relacionado à estabilidade da enzima na atividade catalítica.

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

Os resíduos de aminoácidos responsáveis da rede catalítica provavelmente encontram-se formando o sítio ativo da serinoprotease TLBm semelhante à serinoprotease de mamífero e que é inibida pela ação do PMSF.

As enzimas trombina “like” encontram-se na maioria dos venenos botrópicos e muitas vezes como isoformas (Kumasaka, 1996). A presença destas enzimas é dependente da idade e se mostra diferente pela variação geográfica e individual (Cavinato *et. al.*, 1998). A trombina “like” TLBm isolada a partir do veneno total de *Bothrops marajoensis* mostrou cerca de 80% de homologia com outras serinoproteases de veneno de serpentes (Figura 13).

Todas estas serinoproteases são geralmente glicoproteínas, e cada uma contém Asn (N)-ligado aos sítios de glicosilações entre elas nas posições variáveis da

seqüência. Os resíduos de Cys em suas estruturas formam pontes dissulfeto e estas enzimas são idênticas à tripsina de mamífero (Itoh *et al.*, 1987).

A presença da serinoprotease no veneno de *B. marajoensis* pode sugerir que este veneno possa ser farmacologicamente diferente de outros venenos botrópicos, no entanto podem existir similaridades entre os venenos de um mesmo gênero, mas de regiões diferentes, como sugerido por Ponce-Soto, *et al.*, (2007). No presente trabalho, descrevem-se algumas diferenças no início da seqüência N-terminal da serinoprotease TLBm, que podem estar relacionadas com as separações geográficas e a eficiência própria do veneno.

Embora exista informação disponível sobre serinoproteases com atividade trombina “like” procedentes de veneno de serpentes nas bases de dados, existe pouca informação ao respeito das seqüências, assim como da estrutura tridimensional (3D) desta família de proteínas.

Encontram grande homologia nos 34 resíduos N-terminal sendo que as diferenças observadas podem ser devido a glicosilações. Alternativamente, as diferenças moleculares entre a TLBm e as outras desta família de proteínas poderiam ser atribuídas à magnitude da glicosilações da cadeia polipeptídica. Este fato é possível desde que as enzimas trombina like exibam uma micro heterogeneidade, devido às diferenças em suas cadeias polipeptídicas glicosiladas formadas no processo das modificações pós-traducionais, como é o caso das serpentes *Agkistrodon rhodostoma* (Hatton, 1973; Burkhart, *et al.*, 1992), *Crotalus horridus horridus* (Shu, *et al.*, 1983), *Lachesis muta muta* (Silveira, *et al.*, 1996), *Bothrops jararaca* (Serrano, *et al.*, 1995) e *Bothrops jararacussu* (Zaganelli, *et al.*, 1996).

No geral, as serinoproteases procedentes de venenos de serpentes afetam a cascata de coagulação ativando alguns componentes ou encontram-se diretamente envolvidos na coagulação, fibrinólises e agregação plaquetária de uma forma específica ou por degradação proteolítica (Serrano e Maroun, 2005).

A serinoprotease com atividade trombina “like” TLBm procedente de *Bothrops marajoensis* foi capaz de evidenciar alguns efeitos farmacológicos importantes que confirmam em primeiro lugar o caráter de serinoprotease com atividade trombina “like”. Assim, temos que a TLBm não possui atividade hemorrágica. Apesar de a dose ter sido aumentada em até 100µg/100µL, ela não foi capaz de desencadear efeito hemorrágico (Tabela 4). Por outro lado, a atividade edematogênica foi mostrada como sendo muito

baixa (Figura 14), resultado semelhante àqueles mostrados por Sant' Ana *et al.*, (2007) que realizou estudos com a fração BjussusSP-1 (*B. jararacussu*).

Podemos sugerir que esta proteína TLBm não contribui significativamente aos efeitos tóxicos quando são analisados separadamente, mas quando estão associados com as outras enzimas do mesmo veneno, elas potencializam o efeito tóxico devido à sua atividade proteolítica. Podemos referir como um sinergismo morfológico em que as frações PLA₂ (edematizantes e lise enzimática da membrana celular) provocam a dilatação vascular dos vasos, aumentando a permeação do sangue e lise muscular, por fim, as serinoproteases impedem a coagulação que iria diminuir esse extravasamento.

Os estudos de letalidade (DL₅₀) intracerebroventricular (i.c.v.) mostram que a concentração da serinoprotease com atividade trombina “like”, de 0,313 mg/kg, é muito alta quando comparada com outro tipo de toxinas isoladas de veneno de serpentes, as quais contribuem significativamente com a letalidade do veneno, como é caso das PLA₂ e PLA₂ homólogas (Bonfim, *et al.*, 2006 e 2008) que apresentam dose de 0,070 mg/kg (para ambas Cr-V e Cr-IV) proveniente de *Calloselasma rhodostoma*. Este dado sugere que a fração estudada aqui não contribui com uma letalidade direta através do veneno total, no entanto, tem uma atividade significativa no nível da cascata de coagulação.

As proteases de veneno de serpentes da família Viperidae, além de sua contribuição na digestão da presa, afetam várias funções fisiológicas. Afetam a agregação plaquetária, coagulação sanguínea, fibrinólise, sistema de complemento, pressão sanguínea e o sistema nervoso.

As diferentes enzimas serinoproteases têm mecanismo de ação próprio e interagem com diferentes afinidades sobre vários sítios ativos na molécula de trombina, bem com vWF, Ristocetina, Botrocetina (Marrakchi, *et al.*, 1997). Por exemplo, Bothropsjaracina (Zingali *et al.*, 1993) que inibe a ligação de α trombina ao complexo glicoprotéico IIb-IIIb de plaquetas (GPIIb-IIIa), não tem atividade de co-aglutinina ou de ser um análogo da Botrocetina, uma coaglutinina purificada de *Bothrops jaracaca* (Andrews *et al.*, 1989).

Ristocetina é um antibiótico análogo à Botrocetina, que “in vitro” mimetiza a ação de agonistas liberados na lesão de vasos sanguíneos. Nos testes de agregação plaquetária, a TLBM teve uma ação sobre a agregação em células lavadas, mas foi capaz de inibir o efeito na presença do PMSF, impedindo a agregação plaquetária (Figura 15). Os resultados observados são comparáveis àqueles encontrados para

outras serinoproteases procedentes de veneno de serpentes. Podemos então sugerir que a TLBM apresenta similaridade com outras serinoproteases trombina “like”

Os estudos da estrutura tridimensional (3D), os aspectos das funções biológicas de estrutura-função, assim como as propriedades bioquímicas destas enzimas permanecem ainda desconhecidos.

O presente trabalho poderia revelar novas informações importantes relacionadas tanto com as diferenças estruturais quanto funcionais para estabelecer o(s) possível(is) mecanismo(s) da(s) atividade(s) trombina “like” desta família de proteínas, desde que fosse determinada a estrutura primária da serinoprotease com atividade trombina like, TLBm, e assim poderíamos inferir sobre a contribuição de cada resíduo de aminoácidos na função biológica, assim como os domínios conservados e as regiões variáveis responsáveis por outras atividades particulares da serinoprotease TLBm.

O estudo de serinoproteases contribui no contexto de doenças com coagulopatias auxiliando o diagnóstico de condições hemorrágicas ou trombóticas por ensaios de atividade hemorrágica, além de fazer ensaios farmacológicos executados com preparações isoladas clássicas para bio-ensaios, como aorta de coelho, e ensaios *in vivo*, como pressão arterial e de fluxo sanguíneo arterial (ratos).

Como perspectiva de trabalho, poderíamos dar prosseguimento na determinação da estrutura primária completa e da estrutura tridimensional (3D), possibilitando estudar os aspectos das funções biológicas entre estrutura-função.

Todas estas informações poderiam servir como uma nova plataforma de resultados que solidificariam e permitiriam, no futuro, o melhor esclarecimento dos mecanismos ainda desconhecidos desta família de proteínas, e desta forma compreenderíamos melhor o envenenamento ofídico e teríamos um maior conhecimento do efeito coagulante do veneno botrópico.

6. CONCLUSÕES

Metodologias otimizadas de purificação em HPLC de fase reversa permitiram purificar a serinoprotease com caráter Trombina “like” a partir do veneno total de *Bothrops marajoensis*.

A serinoprotease TLBm mostrou uma massa molecular com uma alta exatidão de 33.332,5 Da, mostrando alto grau de pureza e confirmando os resultados obtidos por SDS-PAGE.

As constantes cinéticas de K_M ($0,52 \times 10^{-1}$ M) e V_{max} ($2,3 \times 10^{-1}$ nmoles ρ NA/Lt/min) são semelhantes a outras trombinas “like”.

Os valores de pH (8,0) e a temperatura (37°C), assim como foi inibida pela PMSF, confirmam o caráter trombina “like”.

A TLBm, por hidrolisar as cadeias α e β do fibrinogênio bovino, provavelmente possa ser agrupada no grupo venombin AB.

A análise de composição de aminoácidos da TLBm mostrou a presença de 12 cisteínas que sugerem a formação de 6 pontes dissulfeto.

A TLBm foi capaz de evidenciar uma total ausência da atividade hemorrágica e edematogênica e induziu Agregação Plaquetaria.

Os estudos de letalidade (DL_{50}) intracerebroventricular (i.c.v.) mostram que a concentração da serinoprotease com atividade trombina “like”, de 0,313 mg/kg, é muito alta, o que sugere que a fração estudada aqui não contribui com uma letalidade direta através do veneno total, no entanto tem uma atividade significativa no nível da cascata de coagulação.

6. COMUNICAÇÕES EM CONGRESSOS

6.1. XXXVII Annual Meeting of SBBq and XI Congress of the Pan-American Association for Biochemistry and Molecular Biology (PABMB). ENZIMATIC CHARACTERIZATION AND N-TERMINAL SEQUENCES ALIGNMENT OF SERINE PROTEASE WITH ACTIVITY THROMBIN "LIKE" (TLBm) FROM *Bothrops marajoensis* SNAKE VENOM. **2008**. Águas de Lindóia-São Paulo, Brasil. 17 a 20 de Maio.

6.2. XXIII Reunião Anual da FeSBE. PHARMACOLOGICAL AND BIOCHEMICAL CHARACTERIZATION OF SERINOPROTEASE WITH ACTIVITY THROMBIN "LIKE" FROM *Bothrops marajoensis* SNAKE VENOM. **2008**. Águas de Lindóia-São Paulo, Brasil. 20 a 23 de Agosto.

6.3. XXIII Reunião Anual da FeSBE. BIOCHEMICAL AND BIOLOGICAL CHARACTERIZATION OF THE *Bothriopsis taeniata* WHOLE VENOM. **2008**. Águas de Lindóia-São Paulo, Brasil. 20 a 23 de Agosto.

6.4. 9th Pan-American Section Congress of the International Society on Toxinology. PURIFICATION AND PARTIAL CHARACTERIZATION OF SERINE PROTEASE WITH CHARACTER THROMBIN LIKE (TLBm) FROM *Bothrops marajoensis* SNAKE VENOM. **2007**. Juriquilla, Querétaro, México. 21 a 25 de Outubro.

6.5. XXXVI Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology (SBBq) 10th IUBMB Conference:.. PURIFICATION AND CHARACTERIZATION PARTIAL MYOTOXIC (LOCAL) OF TWO NOVEL ISOFORMES PLA2 3-2 II AND 3-2 III FROM *Bothrops roedingeri* SNAKE VENOM. **2007**. Salvador, Bahia, Brasil. 21 a 25 de maio.

7. BIBLIOGRAFIA

- Acosta de Pérez, O.C.; Koscinczuk, P.; Gutiérrez, J. M. (1996) Actividades hemorrágica y coagulante del veneno de *Bothrops alternatus* de Argentina. *Acta bioquím. clín. latinoam.* Vol.30(4), p.401-5.
- Aird, S.D. (2002) Ophidian envenomation strategies and the role of purines. *Toxicon*, Vol. 40(4), p. 335-393.
- Altschul, S. F.; Gish, W.; Miller, W.; Myers, E. W.; Lipman, D. J. (1990) Basic local alignment search tool. *J Mol Biol.* Vol. 215(3), p.403-10.
- Au, L.C.; Lin, S. B.; Chou, J. S.; Teh, G. W.; Chang, K. J.; Shih, C. M. (1993) Molecular cloning and sequence analysis of the cDNA for ancrod, a thrombin-like enzyme from the venom of *Calloselasma rhodostoma*. *J. Biochem.* Vol. 294, p.387-390.
- Barraviera, B. (1993) Estudo clínico dos acidentes ofídicos. Revisão. *Jornal Brasileiro de Medicina.* Vol. 65, p.209-250.
- Barraviera, B. (1994) As reações da fase aguda nos acidentes ofídicos. In: Barraviera, B. - *Venenos animais: uma visão integrada.* Rio de Janeiro, EPUC,. p.91-96.
- Barrett, A.J.; Rawlings, N.D. (1995) Families and clans of serine peptidases. *Arch. Biochem. Biophys.* Vol. 318, p.247-250.
- Bidlingmeyer, B.A.; Warren, F.V. (1984) Advances in Chromatography. *Jr. Analytical Chemistry.* Vol. 56, p.1583-96.
- Bonfim, V.L.; Ponce-Soto, L.A.; Martins de Souza, D.; Souza, G.H.M.F.; Baldasso, P.A.; Eberlin, M.N.; Marangoni S. (2008) Structural and functional characterization of myotoxin, Cr-IV 1, a phospholipase A₂ D49 from the venom of the snake *Calloselasma rhodostoma*. *Biologicals*, Vol. 36(3), p.168-176.
- Bonfim, V.L.; Ponce-Soto, L.A.; Novello, J.C.; Marangoni, S. (2006) Structural and functional properties of Cr 5, a new Lys49 phospholipase A₂ homologue isolated from the venom of the snake *Calloselasma rhodostoma*. *Protein J.* Vol. 25(7-8), p.492-502.
- Born, G.V.R.; Cross, M.J. (1963) The aggregation of blood platelets. *J Physiol.* Vol. 168, p.178-195.
- Braga, M.D.M.; Martins, A.M.C.; de Menezes, D.B.; Barbosa, P.S.F.; Evangelista, J.S. A.M.; Toyama, M.H.; Toyama, D.O.; Fonteles, M.C.; Monteiro, H.S.A. (2006) Purification and biological activity of the thrombin-like substance isolated from *Bothrops insularis* venom. *Toxicon.* Vol. 49, p.329-338.

- Bucaretychi, F.; Herrera, S.R.F.; Hyslop, S.; Bacarat, E.C.E.; Vieira, R.J. (2001) Snakebites by *Bothrops* spp. in children in Campinas, São Paulo, Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*. Vol. 43, p.329-333.
- Burkhardt, W.; Smith, G.F.; Su, J.L.; Parikh, I.; LeVine, H. (1992) Amino acid sequence determination of ancrod, the thrombin-like alpha-fibrinogenase from the venom of *Agkistrodon rhodostoma*. *FEBS Lett.* Vol. 297, p.297-301.
- Cardoso, J.L.C.; Nicolella, A.; Barros, E.; Torres, J.B.; Marques, M.G. (1997) Acidentes com animais peçonhentos: consulta rápida. (1. ed.) Porto Alegre: *Serviços de Eventos do Hospital de Clínicas de Porto Alegre*, 207 p.
- Castro, H.C.; Zingali, R.B.; Albuquerque, M.G.; Pujol-Luz, M.; Rodrigues, C.R. (2004) Snake venom thrombin-like enzymes: from reptilase to now, *Cell Mol. Life Sci.* Vol. 61, p.843-856.
- Castro, H.C.; Silva, D.M.; Craick, C.; Zingali, R.B. (2001) Structural features of a snake venom thrombin-like enzyme: thrombin and trypsin on a single catalytic platform. *Biochim. Biophys. Acta.* Vol. 1547 (2), p.183-195.
- Cavinato, R.A.; Remold, H.; Kipnis, T.L. (1998) Purification and characterization of thrombin-like activity from the venom of *Bothrops atrox* of different geographic region. *Toxicon.* Vol. 36, p.257-268.
- Chippaux, J.P. (1998) Snake bites: appraisal of the global situation. *Bull. World Health. Organ.* Vol. 76, p.515-524.
- Chudzinski-Tavassi, A.M.; Claine de Albuquerque, M.J. (2007) Venenos de Serpentes e suas ações nos mecanismos de coagulação e fibrinólise. In: Selistre-de-Araújo, H.S. and Ferreira de Souza, H.D.- Métodos em Toxinologia: *Toxinas de serpentes*. São Paulo, EDUFSCAR., p.61-77.
- Collins, J.F.; Coulson, A.F. (1990) Significance of protein sequence similarities. *Methods Enzymol.*, Vol. 183, p.474-487.
- Cousin, X.; Bon, C. (1999) Acetylcholinesterase from snake venom as a model for its nerve and muscle counterpart. *J. Nat. Toxins.* Vol. 8, p.285-294.
- Declerck, Y.A.; Imren, S. (1994) Protease inhibitors: role and potential therapeutic use in human cancer. *Eur. J. Cancer.* Vol. 30A, p.2170-2180.
- Dennis, E.A. (2000) Phospholipase A₂ in eicosanoid generation. *Am J. Respir. Crit. Care Med.* Vol. 161(2), p.S32-S35.
- Deshimaru, M.; Ogawa, T.; Nakasjima, K.; Nobuhisa, I.; Chijiwa, T.; Shimohigashi, Y.; Fukumaki, Y.; Niwa, M.; Yamashina, I.; Hattori, S.; Ohno, M. (1996) Accelerated evolution of crotalinae snake venom gland serine proteases. *FEBS Lett.* Vol. 397: p.83-88.

- Du, X.Y.; Clemetson, K.J. (2002) Snake venom l-amino acid oxidases. *Toxicon*. Vol. 40, p.659–665.
- Dufton, M. J. (1990) Could domain movements be involved in the mechanism of trypsin-like serine proteases?; *FEBS Letters*, Vol. 271(1-2), p.9-13.
- Erlanger, B.P.; Kokowsky, N.; Cohen, W. (1961) The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. *Arch Biochem Biophys*, Vol. 95, p.271-278.
- Fan, H.W.; Cardoso, J.L.C. (1995) Clinical toxicology of snake bites in South America. In: Meier, J.; White, J. (eds.). *Clinical toxicology of animal venoms and poisons*. Boca Raton, CRS Press, p.667-88.
- Feitosa, R.F.G.; Melo, I.M.L.A.; Monteiro, H.S.A. (1997) Epidemiologia dos acidentes por serpentes peçonhentas no Estado do Ceará - *Brasil Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* vol.30 n.4.
- Gutierrez, J.M.; Lomonte, B.; Cerdas, L. (1986) Isolation and partial characterization of a myotoxin from the venom of the snake *Bothrops nummifer*. *Toxicon*. Vol.24(9), p.885-94.
- Halfon, S.; Craik, C.S. (1998) In: Barrett, A.J.; Rawlings, N.D.; Woessner, J.F. (Eds.), *Introduction: serine peptidases and their clans Handbook of Proteolytic Enzymes*. Academic Press, London, p.3–4.
- Hahn, B.S.; Yang, K.Y.; Park, E.M.; Chang, I.M.; Kim, Y.S. (1996) Purification and molecular cloning of calobin, a thrombin-like enzyme from *Agkistrodon caliginosus* (Korean viper). *J. Biochem*. Vol. 119, p.835–843.
- Hati, R.; Mitra, P.; Sarker, S.; Bhattacharyya, K.K. (1999) Snake Venom Hemorrhagins. *Critical Reviews in Toxicology*. Vol. 29, p.1-19.
- Hatton, M.W.C. (1973) Studies on the coagulant enzyme from *Agkistrodon rhodostoma* venom. Isolation and some properties of the enzyme. *Biochemical Journal*. Vol. 131, p.799-807.
- Holleman, H.W.; Weiss, J.L. (1975) The Thrombin-like Enzyme from *Bothrops atrox* Snake Venom. *The Journal of Biological Chemistry*. Vol. 251(6), p.1663-1669.
- Itoh, N.; Tanaka, N.; Mihashi, S.; Yamashina, I. (1987) Molecular cloning and sequence analysis of cDNA for batroxobin, a thrombin-like snake venom enzyme. *J. Biol. Chem*. Vol. 262, p.3132–3135.
- Kawasaki, T.; Fujimura, Y.; Usami, Y.; Suzuki, M.; Miura, S.; Sakuri, Y.; Makita, K.; Taniuchi, Y.; Hirano, K.; Titani, K. (1996) Complete amino acid sequence and identification of the platelet glycoprotein Ib-binding site of Jararaca GPIb-BP, a snake venom protein isolated from *Bothrops jararaca*. *Journal of Biological Chemistry*. Vol. 271(18), p.10635-10639.

- Kini R.M. (2003) Excitement ahead: structure, function and mechanism of snake venom phospholipase A2 enzymes. *Toxicon*. Vol. 42, p.827-840.
- Kini, R.M. (2005) Serine Proteases Affecting Blood Coagulation and Fibrinolysis from Snake Venoms. *Pathophysiol Haemost. Thromb.* Vol. 34, p.200–204.
- Kisiel, W. (1979) Molecular properties of the Factor V-activating enzyme from Russell's viper venom. *J. Biol. Chem.* Vol. 254(23), p.12230–12234.
- Kisiel, W.; Kondo, S.; Smith, K.J.; McMullen, B.A.; Smith, L.F. (1987) Characterization of a protein C activator from *Agkistrodon contortrix contortrix* venom, *J. Biol. Chem.* Vol. 262(26), p.12607–12613.
- Kornalik, F. (1990) Toxins affecting blood coagulation and fibrinolysis. In: *Handbook of Toxicology*, pp 683 (Shier, W.T. and Mebs, D., Eds) New York: Marcel Dekker.
- Kumasaka, T.; Yamamoto, M.; Moriyama, H.; Tanaka, N.; Sato, M.; Katsube, Y.; Yamakawa, Y.; Omori-Sato, T.; Iwanaga, S.; Ueki, T. (1996) Crystal structure of H2-proteinase from the venom of *Trimeresurus flavoviridis*. *Journal of Biochemistry*. Vol. 119(1), p.49-57.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins among the assembly of the head of the bacteriophage T4., *Nature*. Vol. 227, p.680-685.
- Laing, G.D.; Lee, L.; Smith, D.C.; Landon, J.; Theakston, R.D.G. (1995) Experimental assessment of a new, low cost antivenom for treatment of carpet viper (*Echis ocellatus*) envenoming. *Toxicon*. Vol. 33, p.307–313.
- Laloo, D.; Trevett, A.J.; Saweri, A.; Naraqui, S.; Theakston, R.D.G.; Warrell, D.A. (1995) The epidemiology of snake bite in Central Province and National Capitol District, Papua New Guinea. *Trans R. Soc. Trop. Med. Hyg.* Vol. 89, p.178–182.
- Levy, L. (1969) Carrageenan paw edema in the mouse. *Life Sci.* Vol. 8, p.601–606.
- Li, Z.Y.; Yu, T.F.; Lian, E.C.Y. (1994) Purification and characterization of L-amino acid oxidase from king cobra (*Ophiophagus Hannah*) venom and its effects on human platelet aggregation. *Toxicon*. Vol. 32(11), p.1349-1358.
- Lu, Q.; Clemetson, J.M.; Clemetson, K.J. (2005) Snake venoms and hemostasis. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. Vol.3, p.1791-1799.
- Magalhães, A.; Magalhães, H.P.B.; Richardson, M.; Gontijo, S.; Ferreira, R.N.; Almeida, A.P.; Sanchez, E.F. (2007) Purification and properties of a coagulant thrombin-like enzyme from the venom of *Bothrops leucurus*. *Comparative Biochemistry and Physiology*. Part A 146. p.565–575.
- Markland, F.S. (1998) Snake venoms and the hemostatic system. *Toxicon*. Vol. 36, p.1749-800.

- Mathews, C.K.; Van Holde, M. (1998) Bioquímica. Ed. McGraw-Hill. Segunda Edición. Madrid.
- Matsui, T.; Fujimura, Y.; Titani, K. (2000) Snake venom proteases affecting hemostasis and thrombosis. *Biochim. Biophys. Acta*, Vol. 1477, p.146-156.
- Meier, J.; Stocker, K. (1991) Effects of snake venoms on hemostasis. *Crit. Rev. Toxicol.* Vol. 21(3), p.171–182.
- Meier, J.; Stocker, K.F. (1995) Biology and distribution of venomous snakes of medical importance and the composition of snake venoms. In: Meier, J.; White, J. (Eds.) *Handbook of Clinical Toxicology of Animal Venoms and Poisons*. CRC Press, Boca Raton, p.367–412.
- Melgarejo, A.R.; Aguiar, A.S. (1995) Poisonous snakes, ecological disturbs and public health. *1st International Congress on Envenomations and Their Treatments*. Paris.
- McMullen, B.A.; Fujikawa, K.; Kisiel, W. (1989) Primary structure of a protein C activator from *Agkistrodon contortrix contortrix* venom. *Biochemistry*, Vol. 28, p.674-679.
- McDiarmid, R. W.; Campbell, J. A.; T'Shaka A. T. (1999) Snake Species of the World: A Taxonomic and Geographic Reference. *The Herpetologists' League*. Vol. 1. 511p.
- Nahas, L.; Kamiguti, A.S.; Barros, M.A.R. (1979) Thrombin-like and factor-X activator components of *Bothrops* snake venoms. *Thromb. Haemst.* Vol. 41, p.314-328.
- Neurath, H. (1984) Evolution of Proteolytic Enzymes. *Science*. Vol. 224, p.350-7.
- Neurath, H. (1993) The regulation of protease action: An overview. In: *Innovations in proteases and their inhibitors* (Avilés, F.X. ed.). Editora de Gruyeter, Berlin.
- Neville, M.; Vaughan, W. (2005) Practical applications of snake venom toxins in haemostasis. *Toxicon*. Vol. 45, p.1171-1181.
- Neves-Ferreira, A.G.C.; Perales, J.; Fox, J.W.; Shannon, J.D.; Makino, D.L.; Garratt, R.C.; Domont, G.B. (2002) Structural and functional analyses of DM43, a snake venom metalloproteinase inhibitor from *Didelphis marsupialis* serum. *The Journal of Biological Chemistry*. Vol. 237(15), p.13129-13137.
- Nikai, T.; Ohara, A.; Komori, Y.; Fox, J. W.; Sugihara, H. (1995) Primary Structure of a Coagulant Enzyme, Bilineobin, from *Agkistrodon bilineatus* Venom. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. Vol. 318(1), p.89-96.
- Ouyang, C.; Teng, C. M. (1976) Fibrinogenolytic enzymes of *Trimeresurus mucrosquamatus* venom. *Biochem. Biophys Acta*. Vol. 420, p.298-308.
- Ouyang, C.; Teng, C.; Huang T. (1992) Characterization of snake venom components acting on blood coagulation and platelet function. *Toxicon*, Vol. 30(9), p.945-966.

- Ownby, C.L.; Colberg, T.R.; Odell, G.V. (1984) A new method for quantitating hemorrhage induced by rattlesnake venoms: Ability of polyvalent antivenom to neutralize hemorrhagic activity. *Toxicon*. Vol. 22, p.227-233.
- Ozcan, O.; Ciftci, G.; Pekmezci, G. Z.; Kar, S.; Uysal, H.; Karaer, K. Z. (2007) Proteins, lethality and in vivo effects of *Iurus dufourei asiaticus* scorpion venom. *Toxicon*. Vol. 50, p.394-399.
- Pardal, P.P.O.; Souza, S.M.; Monteiro, M.R.C.C.; Fan, H.W.; Cardoso, J.L.C.; França, F.O.S.; Tomy, S.C.; Sano-Martins, I.S.; Sousa-e-Silva, M.C.C.; Colombini, M.; Koderá, N.F.; Moura-da-Silva, A.M.; Cardoso, D.F.; Velarde, D.T.; Kamiguti, A.S.; Theakston, R.D.G.; Warrell, D.A. (2004) Clinical trial of two antivenoms for the treatment of *Bothrops* and *Lachesis* bites in the north eastern Amazon region of Brazil. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. Vol. 98, p.28-42.
- Petretski, J.H.; Kanashiro, M.; Silva, C.P.; Alves, E.W.; Kipnis, T.L. (2000) Two related thrombin-like enzymes present in *Bothrops atrox* venom. *Braz. J. Med. Biol. Res.* Vol. 33, p.1293–1300.
- Phillips, M.A.; Fletterick, R.J. (1992) Proteases. *Curr. Opin. Struc. Biol.* Vol. 2, p.713-720.
- Pirkle, H.; Stocker, K. (1991) Thrombin-like enzymes from snake venoms: an inventory. For the Subcommittee on Nomenclature of Exogenous Hemostatic Factors of the Scientific and Standardization Committee of the International Society on Thrombosis and Hemostasis. *Thrombosis and Haemostasis*. Vol. 65(4), p.444-450.
- Pirkle, H. (1998) Thrombin-like enzymes from snake venoms: an updated inventory. Scientific and Standardization Committee's Registry of Exogenous Hemostatic Factors. *Thromb Haemost.* Vol. 79(3), p.675-83.
- Ponce-Soto, L.A.; Bonfim, V.L.; Novello, J.C.; Navarro Oviedo, R.; Yarlequé Chocas, A.; Marangoni, S. (2007) Isolation and Characterization of a Serine Protease, Ba III-4, from Peruvian *Bothrops atrox* venom. *The Protein Journal*. Vol. 26(6), p.387-394.
- Ponce-Soto, L.A.; Bonfim, V.L.; Rodrigues-Simione, L.; Novello, J.C.; Marangoni, S. (2006) Determination of primary structure of two isoforms 6-1 and 6-2 PLA₂ D49 from *Bothrops jaracussu* snake venom and neurotoxic characterization using in vitro neuromuscular preparation. *Protein J.* Vol. 25(2), p.147-55.
- Revault, P. (1995) Ecology of *Echis ocellatus* and peri-urban bites in Ouagadougou (Burkino Faso). *1st International Congress on Envenomations and Their Treatments*. Paris.
- Rocha, S.LG.; Lomonte, B.; Neves-Ferreira, A.G.C.; Trugilho, M.R.O.; Junqueira-de-Azevedo, I.L.M.; Ho, P.L.; Domont, G.B.; Gutierrez, J.M. (2002) Functional analysis of DM64, and antimyotoxic protein with immunoglobulin-like structure from *Didelphis marsupialis* serum. *Eur. J. Biochem.* Vol. 269, p.6052-6062.

- Romano-Hoge, S. (1990) Principais Serpentes de Interesse Médico. Reconhecimento. Distribuição Geográfica no Continente Americano. *In*: Soerensen B (ed) *Animais Peçonhentos*, Atheneu, Rio de Janeiro, p.1-46.
- Sant' Ana, C.D.; Ticli, F.K.; Oliveira, L.L.; Giglio, J.R.; Rechia, C.G.; Fuly, A.L.; Selistre de Araújo, H.S.; Franco, J.J.; Stabeli, R.G.; Soares, A.M.; Sampaio, S.V. (2007) BjussuSP-I: A new thrombin-like enzyme isolated from *Bothrops jararacussu* snake venom. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular and Integrative Physiology*. Vol. 151(3), p.443-54.
- Serrano, M.T.S.; Maroun, C.R. (2005) Snake venom serine proteases: sequence homology vs. Substrate specificity, a paradox to be solved. *Toxicon*. Vol. 45, p.1115-1132.
- Serrano, S.M.T.; Reinhardt M.; Sampaio, C.A.M.; Fink, E. (1995) Purification, characterization and amino acid sequence of a serine proteinase, PA-BJ, with platelet aggregating activity from the venom of *Bothrops jararaca*. *Biochemistry*. Vol. 34, p.7186-7193.
- Serres, M.H.; Fladmark, K.E.; Døskeland, S.O. (2000) An ultrasensitive competitive binding assay for the detection of toxins affecting protein phosphatases. *Toxicon*, Vol. 38(3), p.347-360.
- Shu, Y.Y.; Moran, J.B.; Green, C.R. (1983) A thrombin-like enzyme from rattlesnake venom. *Biochimica et Biophysica Acta*. Vol. 748, p.236-244.
- Silveira, A.M.V.; Magalhães, A.; Diniz, C.R.; De Oliveira, E.B. (1996) Purification and properties of the thrombin-like enzyme from the venom of *Lachesis muta muta*. *International Journal of Biochemistry*. Vol. 21, p.863-871.
- Smolka, M.B; Marangoni, S; Oliveira, B; Novello, J.C. (1998) Purification and partial characterization of a thrombin-like enzyme, balterobin, from the venom of *Bothrops alternatus*. *Toxicon*. Vol. 36(7), p.1059-63.
- Sperman-Karber (1981) Organización Mundial de la Salud (OMS). Progress in the characterization of venoms and standarization of antivenoms. Who off set publication N° 58. Genova.
- Stabeli, R.G.; Marcussi, S.; Carlos, G.B.; Pietro, R.C.L.R.; Selistre-de-Araujo, H.S.; Giglio, J.R.; Oliveira, E.B.; Soares, A.M. (2004) Platelet aggregation and antibacterial effects of an l-amino acid oxidase purified from *Bothrops alternatus* snake venom. *Bioorg. Med. Chem*. Vol. 12, p.2881–2886.
- Stiles, B.G. Sexton, F.W.; Weinstein, S.A. (1991) Antibacterial effects of different snake venoms: purification and characterization of antibacterial proteins from *Pseudechis australis* (Australian king brown or mulga snake) venom. *Toxicon*. Vol. 29, p.1129–1141.

- Suhr, S.M.; Kim, D.S. (1996) Identification of the snake venom substance that induces apoptosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* Vol. 224, p.134–139.
- Sun, L.K.; Yoshii, Y.; Hyodo, A.; Tsurushima, A.; Saito, A.; Harakuni, T.; Li, Y.P.; Kariya, K.; Nozaki, M.; Morine, N. (2003) Apoptotic effect in the glioma cells induced by a specific protein extracted from Okinawa Habu (*Trimeresurus flavoviridis*) venom in relation to oxidative stress. *Toxicol. In Vitro.* Vol. 17, p.169–177.
- Tambourgi, D.V.; Dos Santos, M.C.; Furtado, M.D.E.F.; De Freitas, M.C.; Da Silva, W.D.; Kipnis, T.L. (1994) Pro-inflammatory activities in elapid snake venoms. *Br. J. Pharmacol.* Vol. 112, p.723–727.
- Tokunaga, F.; Nagasawa, K.; Tamura, S.; Miyata, T.; Iwanaga, S.; Kisiel, W. (1988) The factor V-activating enzyme (RVV-V) from Russell's viper venom. Identification of isoproteins RVV-V alpha, -V beta, and -V gamma and their complete amino acid sequences. *J. Biol. Chem.* Vol. 263, p.17471–17481.
- Tu, A.T. (1991) Reptile Venoms and Toxins: Handbook of Natural Toxins. Vol. 5. New York. Macel Dekker. Inc.
- Underwood, G. (1967) A contribution to the classification of snakes. London: Trustees of British Museum (Natural History).
- Varanda, E.A.; Giannini, M.J.S. (1994) Bioquímica dos venenos de serpentes. In: Barravieira, B. Venenos Animais. 1º Ed., EPUC, Rio de Janeiro, Brasil.
- Ware A.G.; Seegers, W.H. (1949) Two-stage procedure for the quantitative determination of prothrombin concentration. *Am. J. Clin. Pathol.* Vol. 19, p.471.
- Warrell, D.A. (1995a) Clinical Toxicology of Snakebite in Africa and the Middle East. **In:** Meier, J.; White, J. (Eds.), Handbook of Clinical Toxicology of Animal Venoms and Poisons. CRC Press, Boca Raton, p.433–492.
- Warrell, D.A. (1995b) Clinical Toxicology of Snakebite in Asia. **In:** Meier, J., White, J. (Eds.), Handbook of Clinical Toxicology of Animal Venoms and Poisons. CRC Press, Boca Raton, p.493– 594.
- Warrell, D.A.; Bhetwal, B.B.; Chugh, K.S.; Laloo, D.G.; Loareesuwan, S.; Win, M.M.; Sjostrom, L.; Theakston, R.D.G.; Watt, G.; White, J. (1999) Asian snakes and snakebite. *Southeast Asian J Trop Med Public Health.* Vol. 30(suppl.1), p.1–85.
- Watanabe, L.; Vieira, D.F.; Bortoleto, R.K.; Arni, R.K. (2002) Crystallization of bothrombin, a fibrinogen-converting serine protease isolated from the venom of *Bothrops jararaca*. *Acta Crystallographica Section D. Acta Cryst.* Vol. D58, p.1036-1038.
- Wenzel, H.R.; Tschesche, H. (1995) Reversible inhibitors of serine proteases. **In:** Peptides: Synthesis, Structures and Applications. Academic Press, Inc.

- White, J. (2005) Snake venoms and coagulopathy. *Toxicon*. Vol. 45, p.951–967.
- White, J. (1995) Clinical Toxicology of Snakebite in Australia and New Guinea. In: Meier, J.; White, J. (Eds.), *Handbook of Clinical Toxicology of Animal Venoms and Poisons*. CRC Press, Boca Raton, p.595–618.
- White, J. (2004a) Overview of venomous snakes of the world. In: Dart, R. (Ed.), *Medical Toxicology*. Lippincott, Williams and Wilkins, p.1543–1559.
- White, J. (2004b) Elapid snakes. In: Dart, R. (Ed.), *Medical Toxicology*. Lippincott, Williams and Wilkins, p.1566–1578.
- White, J. (2004c) Viperid snakes. In: Dart, R. (Ed.), *Medical Toxicology*. Lippincott, Williams and Wilkins, p.1579–1591.
- World Health Organization (1981) Progress in the characterization of venoms and standardization of antivenoms. Who off-set Publication. n° 58.
- Yamamoto, C.; Tsuru, D.; Oda-Ueda, N.; Hattori, S.; Kim, S.T. (2002) Flavoxobin, a serine protease from *Trimeresurus flavoviridis* (habu snake) venom, independently cleaves Arg 726-Ser-727 of human C3 and acts as a novel, heterologous C3 convertase, *Immunology*. Vol. 107, p.111–117.
- Zaganelli, G.L.; Zaganelli, M.G.M.; Magalhaes, A.; Diniz, C.R.; De Lima, E.M. (1996) Purification and characterization of a fibrinogen-clotting enzyme from the venom of Jaracuçu (*Bothrops jararacussu*). *Toxicon*. Vol. 34, p.807-819.
- Zhang, Y.; Gao, R.; Lee, W.H.; Zhu, S.W.; Xiong, Y.L.; Wang, W.Y. (1998) Characterization of a fibrinogen-clotting enzyme from *Trimeresurus stejnegeri* venom, and comparative study with other venom proteases, *Toxicon*. Vol. 36, p.131–142.
- Zhang, Y.I.; Wang, J.H.; Lee, W.H.; Wang, Q.; Liu, H.; Zheng, Y.T.; Zhang, Y. (2003) Molecular characterization of *Trimeresurus stejnegeri* venom l-amino acid oxidase with potential anti-HIV activity, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* Vol. 309, p.598–604.



Comissão de Ética na Experimentação Animal
CEEA-IB-UNICAMP

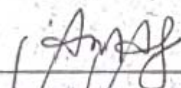
CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 1085-2, sobre "CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DE UMA SERINOPROTEASE, ISOLADA A PARTIR DO VENENO TOTAL DE BOTHROPS MARAJOENSIS", sob a responsabilidade de Prof. Dr. Sérgio Marangoni / Augusto Vilca Quispe, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA)-IB-UNICAMP em 05 de setembro de 2006.

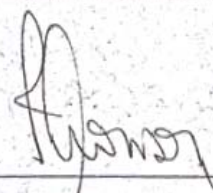
CERTIFICATE

We certify that the protocol nº 1085-2, entitled " _____ ", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - UNICAMP) on September 05, 2006.

Campinas, 05 de setembro de 2006.



Profa. Dra. Ana Maria A. Guaraldo
Presidente



Fátima Aloriso
Secretária Executiva