

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA



FRANK DENIS TORRES HUACO

“Caracterização das atividades proteolítica, hemorrágica e edematogênica de uma metaloprotease BmHF-1 isolada a partir do veneno total de *Bothrops marajoensis*.”

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo(a) candidato (a) FRANK DENIS TORRES HUACO
Sérgio Marangoni
e aprovada pela Comissão Julgadora.

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

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Marangoni
Co-Orientador: Prof. Dr. Luís Alberto Ponce Soto

Campinas – SP
2009

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP

H86c Huaco, Frank Denis Torres
Caracterização das atividades proteolítica, hemorrágica e edematogênica de uma metaloproteinase BmHF-1 isolada a partir do veneno total de *Bothrops marajoensis* / Frank Denis Torres Huaco. – Campinas, SP: [s.n.], 2009.

Orientadores: Sérgio Marangoni, Luis Alberto Ponce Soto.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Metaloproteinase. 2. *Bothrops marajoensis*. 3. Veneno - Purificação. 4. Farmacologia. I. Marangoni, Sergio. II. Soto, Luis Alberto Ponce. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título.

(rodt/ib)

Título em inglês: Characterization of proteolytic, hemorrhagic and edematogenic activities of BmHF-1 metalloproteinase, isolated from *Bothrops marajoensis* crude venom.

Palavras-chave em inglês: Metalloproteinases; *Bothrops marajoensis*; Venom - Purification; Pharmacology.

Área de concentração: Bioquímica.

Titulação: Mestre em Biologia Funcional e Molecular.

Banca examinadora: Sérgio Marangoni, Marcelo Lancelloti, Celene Fernandes Bernardes.

Data da defesa: 20/02/2009.

Programa de Pós-Graduação: Biologia Funcional e Molecular.

Campinas, 20 de Fevereiro de 2009

BANCA EXAMINADORA

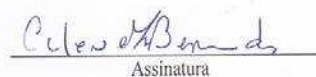
Prof. Dr. Sérgio Marangoni
Depto. Bioquímica - IB - UNICAMP


Assinatura

Prof. Dr. Marcelo Lancellotti
Depto. Bioquímica - IB - UNICAMP


Assinatura

Profa. Dra. Celene Fernandes Bernardes
Ciências Biológicas - PUC-Campinas


Assinatura

Prof. Dr. Humberto Santo Neto
Depto. Anatomia - IB - UNICAMP

Assinatura

Profa. Dra. Mary Luci de Souza Queiroz
Depto. Farmacologia - FCM - UNICAMP

Assinatura

Dedicatória

Dedico este trabalho aos Meus pais Alfredo Torres e Liliana Huaco,
sem o amparo e amor deles eu nunca houvesse chegado tão longe,
Minha irmã Angee,
companheira da minha vida toda e a pessoa que me escuta e compreende
Renato Alfredo,
O motivo pelo qual luto pela minha superação pessoal e profissional.
Para Jessika,
meu amor e minha melhor amiga

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

J.D. Salinger

Agradecimientos

À Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) e ao Instituto de Biologia (IB).

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) que financiou meu projeto de mestrado.

Meu mais sincero agradecimento ao Prof. Dr. Sergio Marangoni, professor principal do Departamento de Bioquímica e Laboratório de Química de Proteínas do Instituto de Biologia – UNICAMP, quem com seu conselho, ensino e guia fez possível a realização desta tese.

Assim mesmo, ao Prof. Dr. Luis Alberto Ponce Soto, quem guiou, colaborou e corrigiu muitos dos aspectos do presente trabalho, pelo apoio e incentivo dados à minha vida acadêmica;

Aos professores que, dedicadamente, participaram como examinadores em meus exames de qualificação e de defesa, acrescentado muito ao meu aprendizado.

Ao técnico Paulinho Baldasso pela amizade e valiosa colaboração durante a realização desse trabalho.

Aos meus companheiros Frey, Augusto e Salomon por todo o trabalho compartilhado no laboratório por sua ajuda, ensino, correções e amizade. A meus amigos Vera e Victor pela amizade e companheirismo que me mostraram.

Aos demais colegas e amigos que contribuíram não só com sua amizade, mas com contribuições que direta ou indiretamente enriqueceram este trabalho.

Índice

		Página
	Lista de Abreviações	x
	Resumo	xiii
	Abstract	xv
1.	INTRODUÇÃO	1
1.1.	Aspectos gerais dos venenos de serpentes.	1
1.1.1.	Oxidoreductases	2
1.1.2.	Fosfodiesterases	2
1.1.3.	Fosfolipases A ₂	3
1.1.4.	Glicosidases	3
1.1.5.	Proteases	3
1.1.5.1	Serinoproteases (SVSP)	4
1.2.	Metaloproteases de Venenos de Serpente (SVMP)	5
1.2.1.	Aspectos Estruturais e Classificação	5
1.2.1.1.	Pré-Sequência	5
1.2.1.2.	Pró-Sequência	5
1.2.1.3.	Domínio Metaloprotease	5
1.2.1.4.	Peptídeo ou Segmento Espaçador	7
1.2.1.5.	Domínio Desintegrin e Desintegrin-like	8
1.2.1.6.	Domínio Cystein-rich	9
1.2.1.7.	Subunidade C-type Lectin-like	10
1.2.1.a.	SVMP Classe P-I	10
1.2.1.b.	SVMP Classe P-II	11
1.2.1.c.	SVMP Classe P-III	11
1.2.1.d.	SVMP Classe P-IV	11
1.2.2.	Aspectos Funcionais	12
1.3.	<i>Bothrops marajoensis</i>	15
1.4.	Objetivos	17
2.	MATERIAIS E MÉTODOS	19
2.1.	Animais	19
2.2.	Veneno	19
2.3.	Purificação da metaloprotease a partir do veneno total de <i>Bothrops marajoensis</i> .	19
2.3.1.	Cromatografia líquida de exclusão molecular de baixa pressão.	19

	2.3.2.	Cromatografia líquida de alta eficiência em HPLC de fase reversa.	20
2.4.		Atividade proteolítica sobre a Caseína.	20
2.5.		Efeito da temperatura na atividade proteolítica de BmHF-1.	21
2.6.		Efeito do pH na atividade proteolítica de BmHF-1.	21
2.7.		Efeito de Inibidores	21
2.8.		Efeito inibitório do soro (sDa) e dos fatores anti-hemorrágicos (DA2-I, DA2-II) de <i>Didelphis albiventris</i> .	22
2.9.		Atividade proteolítica sobre o fibrinogênio (SDS-PAGE).	22
2.10.		Atividade proteolítica sobre o substrato BApNA.	22
2.11.		Análise de composição de aminoácidos.	23
2.12.		Espectrometria de massas.	23
2.13.		Seqüenciamento N-terminal da Metaloprotease BmHF-I.	23
2.14.		Estudo de homologia seqüencial.	24
2.15.		Caracterização Funcional.	24
	2.15.1.	Atividade hemorrágica (Método de pele).	24
	2.15.2.	Formação de Edema.	24
	2.15.3.	Agregação Plaquetária.	25
2.16.		Análise Estatística	25
3.		RESULTADOS	26
3.1.		Purificação da metaloprotease BmHF-1 isolada a partir do veneno total de <i>Bothrops marajoensis</i> .	26
	3.1.1.	Cromatografia líquida de exclusão molecular de baixa pressão.	26
	3.1.2.	Purificação da fração 1 em coluna μ -Bondapak C-18 (0,78 X 30 cm) preparativa de fase reversa acoplada a um sistema de HPLC (Waters).	27
	3.1.3.	Controle do grau de pureza da fração BmHF-1 em um sistema HPLC-RP.	28
3.2.		Espectrometria de Massas MALDI-Tof da metaloprotease BmHF-1.	29
3.3.		Atividade proteolítica sobre a caseína da BmHF-1.	30
3.4.		Efeito da temperatura na atividade proteolítica de BmHF-1	31
3.5.		Efeito do pH na atividade proteolítica de BmHF-1.	32
3.6.		Efeito de inibidores sobre a atividade proteolítica de BmHF-1.	33
3.7.		Efeito do soro (sDa) e dos fatores anti-hemorrágicos DA2-I, DA2-II de <i>Didelphis albiventris</i> .	34
3.8.		Atividade proteolítica sobre o fibrinogênio da BmHF-1.	35
3.9.		Atividade proteolítica sobre o substrato BApNA.	36
3.10.		Análise de Composição de Aminoácidos.	37
3.11.		Seqüência N-terminal da metaloprotease BmHF-1 e estudo de homologia seqüencial.	38
3.12.		Caracterização Funcional.	39
	3.12.1.	Atividade Hemorrágica e dose hemorrágica mínima da fração BmHF-1.	39
	3.12.2.	Atividade Edematogênica da Fração BmHF-1.	41

	3.12.3.	Efeito sobre a agregação plaquetária da metaloprotease BmHF-1.	42
4.	DISCUSSÃO		43
5.	CONCLUSÕES		52
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS		54

Lista de Abreviações.

Lista de Abreviações – Cromatografias

Sephadex G-75	Coluna de exclusão molecular com matriz composta de dextrano
HPLC	H igh (P ressure/ P erformance) L iquid C hromatography
RP HPLC	R everse P hase HPLC (HPLC de Fase Reversa)
C18	18 High Carbon Load, High activity silica
μ-Bondapack C18	Coluna de HPLC com n-octadecyl como base da fase estacionária

Lista de Abreviações - Reagentes, Sais, Tampões

AMBIC	Bicarbonato de Amônio
DMSO	Dimetilsulfóxido
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilenodiamino tetracético
EGTA	Ácido etilenoglicol-bis (2-aminoetileter)-N,N,N',N'-tetracético
DL-BApNA	N α -Benzoil-DL-Arginina (substrato cromogênico).
PBS	Tampão fosfato em salina
PMSF	Fenilmetilsulfonidefluoreto
PTH	Fenil Tio Hidantoina
SBT-1	Inibidor de tripsina de soja
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio, Lauril Sulfato de Sódio
Tampão A	TFA 0,1% utilizado para cromatografia de HPLC-RP
Tampão B	Acetonitrila 66% utilizado em cromatografia de HPLC-RP
TCA	Ácido Tricloroacético
TFA	Ácido Trifluoracético
Tris	Tris[<u>Hidroximetil</u>]aminometano

Lista de Abreviações – Símbolos e siglas

280nm	Absorbância no comprimento de onda de 280nm
pmol	Picomol (10^{-12} moles)
µg	Micrograma (10^{-6} gramas)
µL	Microlitro (10^{-6} litros)
cm	Centímetro
Da	Dalton – unidade de peso – aproximadamente o peso molecular de um átomo de Hidrogênio.
M	Molar – unidade de concentração (mole/litro)
mM	Milimolar (10^{-6} Molar)
MALDI-TOF	Dessorção/Ionização a laser assistida por matriz
m/v	Porcentagem ou proporção de massa/volume.
PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida.
Pico-Tag	Sistema geral de análise de aminoácidos composto por uma estação de trabalho para hidrólise e derivatização de aminoácidos e por um sistema cromatográfico HPLC de separação, detecção e análise dos aminoácidos derivatizados.
PITC	Fenilisotiocianato
PTH	Feniltiohidantoina
rpm	Rotações por minuto
TLBm	Trombina-like isolada do veneno bruto de <i>Bothrops marajoensis</i>
v/v	Porcentagem ou Proporção de volume/volume

Resumo

Neste trabalho, descrevemos o isolamento e as caracterizações funcional e estrutural de uma nova metaloprotease, denominada BmHF-1. A proteína foi isolada da peçonha de *Bothrops marajoensis*, com um alto grau de pureza e homogeneidade molecular, pela combinação de dois passos cromatográficos: exclusão molecular em coluna Superdex G-75 acoplada ao sistema HPLC-biocompatível; e seguida de uma cromatografia em HPLC de fase reversa numa coluna C-18 μ -Bondapack. A nova metaloprotease BmHF-1 apresenta massa molecular de 27162,36 Da obtida por espectrometria de massas (MALDI-Tof).

A BmHF-1 apresenta atividade proteolítica sobre a caseína, sendo a atividade caseinolítica inibida pelos agentes quelantes EGTA e EDTA, mas os inibidores PMSF e SBTI não apresentaram efeito algum sobre a atividade proteolítica de BmHF-1, o qual sugere que nossa toxina pertence à família das metaloproteases. A BmHF-1 apresenta um pH ótimo na atividade caseinolítica no intervalo de 7-8 e foi inativa sobre o mesmo substrato à temperatura maior que 50°C.

A BmHF-1 é uma enzima α -fibrinogenolítica devido à sua alta especificidade pela cadeia α do fibrinogênio, a qual foi degradada aos 15 minutos de incubação com a metaloprotease, enquanto que não apresenta atividade alguma sobre as cadeias β e γ . Por outro lado, a BmHF-1 não possui atividade significativa sobre o substrato BApNA em comparação com as atividades apresentadas pelo veneno bruto e pela fração TLBm (*Bothrops marajoensis* Trombin-like). A atividade proteolítica da BmHF-1 sobre a caseína foi inibida ao incubar a metaloprotease com o soro e os fatores anti-hemorrágicos DA2-I e DA2II de *Didelphis albiventris* (gambá-de-orelha-branca), sugerindo que a BmHF-1 possui características diferenciadas na sua arquitetura molecular que permitem interagir com os fatores anti-hemorrágicos.

Pela composição de aminoácidos, a Bmhf-1 apresenta um caráter ácido, pela maior proporção de aminoácidos ácidos, e possui 6 resíduos cisteína. No estudo de homologia, a BmHF-1 apresentou homologia seqüencial com alta identidade com a metaloprotease da classe P-I Atrolysin b isolada do veneno bruto de *Crotalus atrox*.

Esta nova metaloprotease BmHF-1 apresenta uma atividade hemorrágica fraca quando foi injetada intradermicamente nas costas de camundongos; a quantidade de toxina requerida para gerar um halo hemorrágico de 10 mm foi de 41,14 µg.

Outros perfis biológicos foram estudados para a BmHF-1; esta metaloprotease mostrou atividade edematogênica significativa ao ser injetada na região plantar da pata direita de camundongos; o efeito edematogênico da BmHF-1 mostrou ser dependente da concentração da toxina e teve um efeito prolongado até 6 horas após da injeção.

A BmHF-1 mostrou ser um potente agonista da agregação plaquetária ao ser incubado com plasma rico em plaquetas (PRP), precisando de uma dose de 3 µg para induzir a agregação de plaquetas; o efeito agonista da agregação plaquetária da metaloprotease BmHF-1 foi inibido pelo EDTA, o que sugere que este efeito farmacológico depende da atividade proteolítica da BmHF-1.

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. Esta fração é obtida com metodologias de alta eficiência: HPLC, espectrometria de massa, cujos resultados podem ser associados com sua atividade biológica, eliminando a subjetividade causada por veneno total ou frações impuras.

Essa abordagem pode ser aplicada nos estudos bioquímicos, estrutura-função, fisiológicos e farmacológicos, podendo revelar mecanismos ainda desconhecidos na relação estrutura-função das metaloproteases procedentes de veneno de serpentes. A relação da atividade farmacológica com o sítio catalítico presente nas metaloproteases pode ser usada como ferramenta de diagnóstico de doenças relacionada com fatores de coagulação.

Abstract

In this present work we described the isolation, structural and functional characterization of a new metalloproteinase, named BmHF-1. This protein was isolated with a high degree of purity from the *Bothrops marajoensis* snake venom by the combination of two chromatographic steps, size exclusion in a Superdex G-75 column coupled to HPLC biocompatible system, followed by a HPLC-RP chromatographic procedure in a C-18 μ -Bondapack column. This new metalloproteinase had a molecular mass of 27162.36 Da determinate by MALDI-Tof mass spectrometry.

BmHF-1 posses proteolytic activity upon casein (caseinolytic activity), which was inhibited by chelating agents such EDTA and EGTA, meanwhile the inhibitor PMSF and SBTI had none effect on the caseinolytic activity of BmHF-1, which indicate that this toxin belong to the metalloproteinase protein family. The optimum pH of BmHF-1 was found to be round to 7-8 and it lost all the caseinolytic activity in temperatures above of 50°C.

BmHF-1 had α -fibrigenolytic activity due to its high specificity for the α chain of fibrinogen, which is completely degraded after 15 minutes when incubated with the metalloproteinase, in the other hand, BmHF-1 had none effect upon β or γ chains of fibrinogen. BmHF-1 does not have arginine amidase activity since its not degraded BApNA significantly in compare with the *B. marajoensis* whole venom and the TLBm fraction. The BmHF-1 caseinolytic activity was inhibited by the pre-incubation of the toxin with opossum sera and anti-hemorrhagic factors (Da2-I and Da2-II) from *Didelphis albiventris* (gambá).

BmHF-1 is an acidic protein due the mayor proportion of acidic aminoacid in its aminoacid composition, beside of this, this protein have 6 cysteinyl residues. By the structural homology study, BmHF-1 share structural homology with a mayor sequence identity with the P-I class metalloproteinase Atrolysin B isolated from *Crotalus atrox* snake venom.

This new metalloproteinase, BmHF-1, have a weak hemorrhagic activity when it was injected intradermally in the back of mice, the quantity of toxin required to develop a 10 millimeter hemorrhagic halo was 41.14 μ g.

It was observed that BmHF-1 has other biological activity, like edemetogenic activity since it produce paw edema when was injected in the right foot pad of mice, this biological effect was dose-dependent and was prolonged for at least 6 hour after inoculation.

This metalloproteinase, BmHF-1, show be a strong agonist of platelet aggregation when it was incubated whit Platelet Rich Plasma (PRP). This biological activity was related with the proteolytic activity of this metalloproteinase since the agonist effect was inhibited when the BmHF-1 was pre-incubated with EDTA.

The reproducibility of biological activity, through the pharmacologic effects, only is possible by the use of chemically homogeneous fractions that hold biological function integrity. This fraction was obtain with high efficiency methodologies like HPLC, LC, mass spectrometry; these results can be associated with the biological activity, disregarding the subjectivity caused by the whole venom or by impure fractions.

This kind of methodologies can be applied to biochemical, structure and function, physiological and pharmacological studies, which can reveal unknown mechanism in the function-structure relationship of the snake venom metalloproteinases. The relation between the catalytic site and pharmacological activities present in these proteins can be used as diagnostic tools for coagulopathies related with the haemostatic factors.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Aspectos gerais dos venenos de serpentes

Na história da civilização, as serpentes venenosas, durante anos, fizeram parte das peculiaridades culturais. As serpentes tiveram participação nas artes, ciência e religião como representações simbólicas de inúmeras crenças. No século anterior, deu-se início às investigações sobre a bioquímica e a farmacologia das peçonhas de serpentes, introduzindo novos conhecimentos. Para o início do século 21, várias pesquisas demonstraram uma grande diversidade funcional e estrutural de seus componentes, que são capazes de inúmeras informações biológicas, inseridas em várias áreas da saúde (Björnason & Fox, 1994; Gutierrez, 2002; Koh et al, 2006). Na atualidade, são reconhecidas cerca de 3000 espécies de serpentes, sendo 500 espécies consideradas peçonhentas e destas somente 200 podem provocar envenenamentos em humanos (Fry et al, 2006).

Pelas inúmeras propriedades bioquímicas, funcionais e estruturais, as peçonhas de serpentes são alvos interessantes de estudo. Num acidente ofídico, a manifestação clínica depende da toxicidade intrínseca do veneno e da quantidade injetada. Os sintomas apresentados num acidente ofídico são variados, mas a maioria dos sintomas com importância clínica podem ser classificados em poucas categorias (Koh et al, 2006). Os acidentes Botrópicos causados pelos indivíduos do gênero *Bothrops* apresentam lesões locais como edema, bolhas e necrose, produzidos pelas ações de componentes como proteases, hialuronidases e fosfolipases. Além da atividade local, os envenenamentos causados por serpentes do gênero *Bothrops* produzem distúrbios na coagulação, caracterizados pelo consumo dos fatores de coagulação, agem como agonistas ou antagonistas da agregação plaquetária e degradam os componentes da membrana basal de capilares. Estas ações na hemóstase têm como manifestação final a hemorragia, que é uma síndrome própria dos acidentes botrópicos (Ministério de Saúde, 2001).

O veneno de serpente contém uma mistura de compostos complexos de origem orgânica e compostos simples de origem inorgânica. Dentre os compostos simples de origem inorgânica estão o cálcio, o cobre, o ferro, o potássio, o magnésio, o manganês, o sódio, o fósforo, o cobalto e o zinco. Nem todos estes compostos são observados em todos os venenos e sua quantidade varia de acordo com a espécie em questão. A função de certos componentes

inorgânicos está relacionada a mecanismos catalíticos de certos componentes enzimáticos presentes no veneno (Bjárnason & Fox, 1994).

Dentro dos compostos complexos de origem orgânica, encontram-se as proteínas (90-95% do peso seco do veneno), carboidratos, amins biogênicas, aminoácidos e nucleotídeos. Na composição protéica da peçonha de serpentes, podemos encontrar componentes enzimáticos como acetilcolinesterases (inibição do sistema nervoso central), adenosindifosfatase, fosfolipases (relacionadas com a miotoxicidade e neurotoxicidade), hialuronidases, L-aminoácido oxidases, metaloproteases, serinoproteases; e componentes não enzimáticos como desintegrinas, lectinas tipo C e peptídeos potenciadores da bradicinina (Bjárnason & Fox, 1994; Braud, 2000; Marsh, 1994; Suhr & Kim, 1996; Tu, 1991).

Em seguida serão descritas as principais classes de enzimas que apresentam os venenos de serpentes:

1.1.1. Oxidorreductases

No veneno bruto de serpente, são encontradas pelo menos duas enzimas responsáveis por reações tipo redox: as L-aminoácido oxidases (LAO) e lactato desidrogenase. As LAO convertem o aminoácido livre em um α -cetoácido. Muitos venenos de serpentes possuem LAO muito ativas que são responsáveis pela cor amarela dos venenos secos (Du & Clemetson, 2002). Descobriu-se que as LAO são capazes, em determinadas condições laboratoriais, de induzir a agregação plaquetária (Li et al., 1994) e a apoptose em determinadas células (Suhr & Kim, 1996). Mclean et al. (1971) descreveram que o veneno de algumas serpentes catalisa a conversão do lactato a piruvato. A presença da lactato desidrogenase foi demonstrada em vários venenos, principalmente em serpentes do gênero *Naja* e *Dendroaspis*.

1.1.2. Fosfodiesterases

As primeiras fosfodiesterases foram reportadas desde 1930, doravante 5'-nucleotidases, ADPases, endonucleases, exonucleases e fosfatases alcalinas e acidas, também foram reportadas. As fosfodiesterases são conhecidas também como exonucleases pela sua capacidade de hidrolizar ligações fosfodiester de modo progressivo, iniciando a hidrolise no extremo 3' dos ácidos nucléicos. Estas enzimas têm participação nos processos de crescimento, diferenciação e proliferação celular.

Nos venenos de serpente podem se encontrar fosfodiesterases, as quais, mostraram atividade enzimática sobre o ADP e o ATP. Estas enzimas podem interferir na sinalização e balance de nucleotídeos e nucleosídeos extracelulares, pela quebra de ligações ester fosfato dos ácidos nucleicos, mas também, pela degradação de AMP, ADP e ATP, produzindo transtornos patofisiológicos na presa. As fosfodiesterases de veneno de serpente são largamente utilizadas no seqüenciamento ou caracterização de oligonucleotídeos e polinucleotídeos. (Sales & Santoro, 2008).

1.1.3. Fosfolipases A₂

São enzimas largamente distribuídas na natureza, podendo ser encontradas em bactérias, plantas, tecidos de mamíferos (pulmão, fígado, baço, coração, eritrócitos, plaquetas e leucócitos polimorfonucleares). As mais conhecidas e estudadas são aquelas encontradas nos tecidos pancreáticos de mamíferos e nos venenos de serpentes e insetos (Denis, 2000). As fosfolipases A₂ são as enzimas mais comumente encontradas nos venenos de serpentes e as mais estudadas do ponto de vista bioquímico e biológico, e têm importante papel nos efeitos tóxicos produzidos pelos venenos de serpente (Kini, 2003).

1.1.4. Glicosidases

Estas enzimas têm a função de facilitar a difusão das toxinas do veneno para dentro do tecido das vítimas pela degradação de componentes do tecido conectivo. Dentre estas enzimas, citam-se as NAD nucleotidases e as hialuronidases. As hialuronidases são enzimas que fazem catálise (hidrólise) do ácido hialurônico, um mucopolissacarídeo presente na pele, nos tecidos conectivos e nos tendões (Tu, 1991).

1.1.5. Proteases

As proteases podem ser agrupadas em dois grandes grupos: as endopeptidases e as exopeptidases (Iwanaga et al., 1976). As proteases presentes nos venenos de serpentes apresentam atividade sobre vários tipos de substrato. Dois tipos de muito estudados de proteases presentes nos venenos de serpentes são: as Serinoproteases (SVSP – Snake Venom Serinoproteases) e as metaloproteases (SVMP – Snake Venom Metalloproteinase). As SVSP e as SVMP são algumas das principais enzimas responsáveis pela interrupção da hemostasia e

pelos efeitos danosos dos venenos sobre os tecidos próximos ou distantes do sítio da picada (Braud et al, 2000; Matsui et al, 2000).

1.1.4.1. Serinoproteases de Veneno de Serpente (SVSP)

As serinoproteases de veneno de serpente (SVSP) são enzimas proteolíticas presentes em muitos gêneros de serpentes das famílias Viperidae e Colubridae (*Agkistrodon*, *Bothrops*, *Lachesis*, *Trimeresurus*, *Bitis*, *Cerastes*, etc). As SVSP tem participação importante na atividade coagulante do sangue, “in vitro”, que possuem muitos venenos de serpentes (Castro et al, 2004; Lu et al, 2005).

O principal mecanismo das SVSP que contribui para a coagulação do sangue é a degradação proteolítica do fibrinogênio para formar monômeros de fibrina. Estes monômeros polimerizam parcialmente, formando um coágulo instável de fibrina com a qual as plaquetas não podem interagir e formar o coágulo formado por plaquetas. Este mecanismo de formação de fibrina apresentado pelas SVSP tem similaridade com o mecanismo da trombina, pelo qual são denominadas Thrombin-like (Braud et al 2000).

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

1.2. Metaloproteases de Venenos de Serpentes (SVMP)

1.2.1. Aspectos Estruturais e Classificação

As SVMP (EC 3.4.24) são enzimas modulares formadas por um ou mais domínios adidos na região C-terminal. Os principais efeitos tóxicos das SVMP estão envolvidos na alteração do sistema hemostático, dentro do qual o efeito hemorrágico é o mais importante. O incremento na massa destas enzimas, pela adição de domínios na região C-terminal, aumenta a

diversidade e a potência dos efeitos biológicos das SVMP. Todas as metaloproteases de veneno de serpente apresentam o domínio Metaloprotease, o qual é semi-conservado. A síntese das SVMP é feita em forma de zimógenos (figura 1), os quais são processados para a remoção de suas seqüências sinal e pro seqüência, por autólise ou por outras metaloproteases (Ramos & Selistre de Araújo, 2006). Os domínios que compõem as SVMP's são os seguintes:

1.2.1.1. Pré-Seqüência

Hite et al (1992) foram os primeiros em demonstrar que as SVMP são traduzidas como zimogênios e apresentando uma seqüência sinal, a qual é altamente conservada (figura 1). Na Atrolysin esta seqüência está formada por 18 restos de aminoácidos. Nesta toxina, a quebra acontece entre os aminoácidos Gly18 e Ser19 (Björnason & Fox, 1994; Hati et al, 1999).

1.2.1.2. Pró-Seqüência

Nos estudos do DNA complementar (cDNA) das SVMP, foi observada a presença de um domínio nomeado de Pró-seqüência encontrado entre a pré-seqüência e o domínio metaloprotease (figura 1). Na Atrolysin (*Crotalus atrox*), o domínio possui um comprimento de 169 resíduos. O domínio Pró-seqüência é altamente conservado e apresenta a seqüência consenso de 7 resíduos PKMCGVT perto do início N-terminal (aproximadamente a 20 resíduos, figura 1) do domínio metaloprotease. Essa seqüência é similar à seqüência apresentada na família das Metaloproteases de Matriz (MMP, PRCGV/NPV/LA7G), as quais são endopeptidases dependentes de Zn^{+2} produzidas por células endoteliais de mamíferos (Hati et al, 1999; Keeling et al, 2005). A função proposta para esta seqüência é similar à apresentada nas MMP, a qual é a de um “Cysteine switch” ou “Velcro” que inativa o domínio metaloprotease (Grams et al, 1993).

1.2.1.3. Domínio Metaloprotease

É o domínio que contém o sítio catalítico e possui uma extensão de 200-215 de resíduos de aminoácido contendo uma seqüência consenso HEBxHxBGBxH (B: aminoácidos hidrofóbicos; x: qualquer resíduo). As Histidinas são as responsáveis pela ligação do átomo do Zinco e junto com uma molécula de água fazem a formação de um complexo tetraédrico piramidal. Neste complexo, o primeiro e o terceiro resíduos de histidina e a molécula da água

compõem a base, a terceira histidina forma o topo da pirâmide, e o zinco alinha-se com o plano da base (Hati et al, 1999; Ramos & Selistre de Araújo, 2006; Stöcker & Bode, 1995).

De forma geral, o domínio metaloprotease apresenta duas ou três pontes dissulfeto (Hati, 1999); o padrão das pontes parece estar relacionado segundo o tipo de SVMP, mas a introdução de pontes dissulfeto parece não produzir distúrbios significativos na estrutura do domínio, pelo qual a influência na estrutura-função nas SVMP ainda não está esclarecido (Fox & Serrano, 2005; Hati et al, 1999).

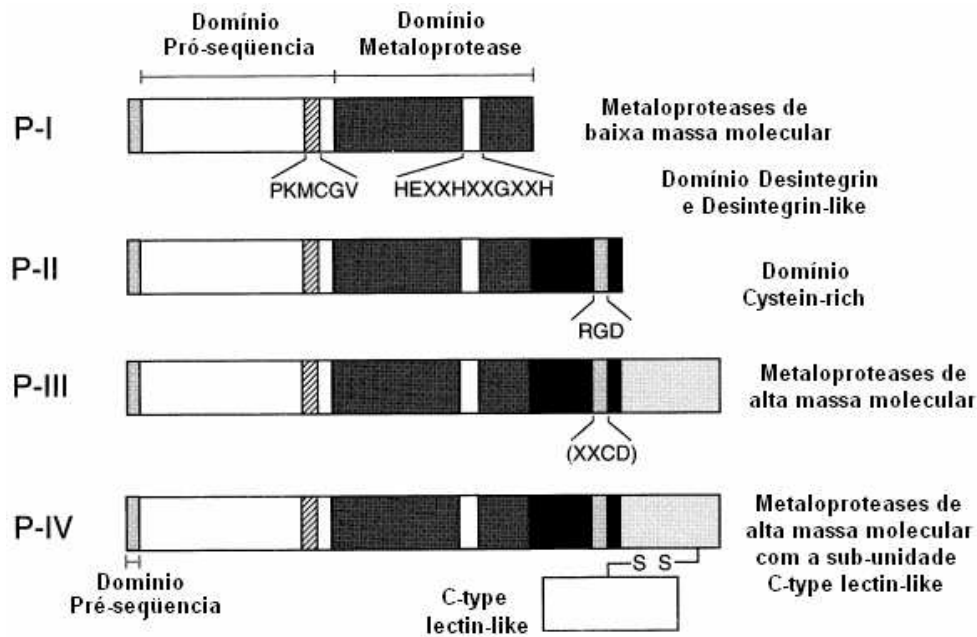


Figura 1. Domínios presentes nas metaloproteases de veneno de serpente (Ramos & Selistre de Araújo, 2005). Na figura mostram-se as seqüências consenso dos domínios Pró-seqüência, Metaloprotease e Desintegrin.

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

A inativação do domínio metaloprotease é feita pelo domínio pró-seqüência, que contém o motivo Cystein-Switch (figura 2). No modo inativado, o sítio ativo do domínio metaloprotease interage com o motivo Cystein-Switch do domínio pró-seqüência. Nesta interação, o grupo tiol da cadeia lateral do resíduo cisteína faz uma ligação com o Zn^{+2} do sítio catalítico do domínio metaloprotease, o qual impede a interação do sítio ativo da metaloprotease com o substrato. A ativação ocorre pela proteólise em etapas sucessivas do domínio pró-seqüência, liberando o sítio ativo do domínio metaloprotease para a interação com o substrato.

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

1.2.1.4. Peptídeo ou Segmento Espaçador

Num primeiro momento, foi definido como um segmento entre os domínios metaloprotease e Desintegrin-like (Björnason & Fox, 1994). O peptídeo apresenta 13-15 resíduos de aminoácido de comprimento; alguns precursores de metaloproteases de baixa massa molecular sofrem proteólise deste segmento, mas outros são encontrados em domínios desintegrinas e Desintegrin-like de longa cadeia. Nestes casos o resíduo de cisteína extra se encontra envolvido na formação de pontes dissulfeto com as cisteínas presentes no domínio, formando novos padrões de pontes dissulfeto (exemplo Bitistatin-I e Catrocollastatin-C); no caso das SVMP o peptídeo possivelmente está relacionado com a resistência ao processamento proteolítico da proteína (Fox & Serrano, 2005; Ramos & Selistre de Araujo, 2006). Kini et al (1997) sintetizou um peptídeo baseado neste segmento e avaliou a sua toxicidade e a sua atividade biológica. O segmento não apresentou atividade letal, anticoagulante ou efeito sobre as plaquetas; não mostrou nenhum efeito significativo nos níveis sanguíneos de triglicérides, colesterol total, ou lipoproteínas como o HDL ou LDL. Entretanto, o segmento apresentou atividade hipotensora em ratos normotensivos, mas ao ser testado com ratos hipertensivos, não foi observado redução significativa. Estes resultados sugerem que o segmento espaçador não contribui com a atividade biológica das proteínas nas quais se apresenta.

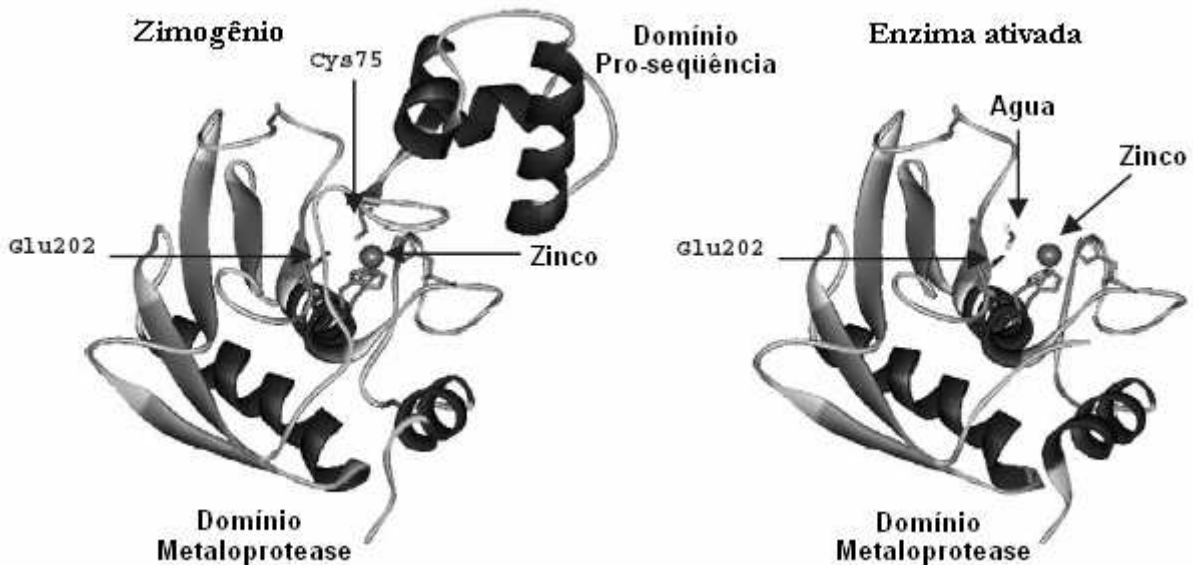


Figura 2. Ativação das Metaloproteases de veneno de serpente pelo mecanismo “Cysteine switch” ou “Velcro” (Ramos & Selistre de Araujo, 2006). No lado esquerdo da figura mostra-se a forma inativa (zimogênio) das SVMP, no lado direito mostra-se a forma ativada das SVMP.

1.2.1.5. Domínio Desintegrin e Desintegrin-like

As Desintegrinas são uma família de peptídeos que apresentam baixa massa molecular, podem apresentar um comprimento de 41 a 100 resíduos de aminoácidos, contêm vários resíduos de cisteína os quais configuram variados padrões de pontes dissulfeto (de 4 a 8). Estes peptídeos são encontrados na peçonha de serpentes da família Viperidae, a maioria é produzido a partir de precursores SVMP da classe P-II por proteólise. Apresentam uma estrutura em alça tipo- β de 13 resíduos de aminoácidos de comprimento, na qual se encontra a seqüência consenso RGD (figura1). A seqüência consenso RGD é a responsável pela atividade inibitória da agregação plaquetária que estes peptídeos possuem, o motivo interage com o complexo glicoproteína IIB/IIIa (integrina $\alpha_{IIB}\beta_{III}$), inibindo a agregação plaquetária induzida pelo fibrinogênio como a Trigamin isolada do veneno bruto de *Trimeresurus flaviridis* (Kamiguti et al, 1998; Hati et al, 1999; Ramos & Selistre de Araújo, 2006).

As SVMP de alta massa molecular apresentam domínios que possuem alta similaridade com as Desintegrinas, mas mostram diferença em relação a duas características: o motivo

RGD não é conservado, observando-se que a arginina é trocada, em alguns casos, por ácido aspártico (DCD) ou ácido glutâmico (ECD, HR-1B e jararhagin) e duas cisteínas extras, as quais configuram pontes dissulfeto com o Segmento Espaçador e o domínio Cystein-rich. Estes domínios são nomeados como Desintegrin-like e potenciam atividade hemorrágica das SVMP da classe P-III hemorrágicas pela interação com o colágeno de tipo I e IV, além de inibir a atividade da agregação plaquetária (Hati et al, 1999; Ramos & Selistre de Araújo, 2006; Moura da Silva et al, 2008).

1.2.1.6. Domínio “Cystein-rich”

Este domínio apresenta-se nas SVMP de alta massa molecular (Classe P-III e P-IV) no sentido carboxy-terminal do domínio desintegrin-like (figura1). Este domínio se caracteriza pelo maior número de resíduos de cisteína, os quais participam na formação de pontes dissulfeto. Contudo, no domínio rico em cisteína, apresentam um padrão definido de resíduos de cisteína. O primeiro padrão está na primeira metade do domínio (sub-domínio) e possui maior conservação, apresentando a seqüência CX6CX4CX14CX12CX9CX4C- (X: qualquer resíduo de aminoácido). Na segunda metade do domínio, o padrão apresenta maior variabilidade e a necessidade de inserir “gaps” para os alinhamentos: CX4/6/10CX15/18/19CX5CX4CX7/9/16 (Björnason & Fox, 1994; Hati et al, 1999).

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

Nas SVMP's de alta massa molecular (P-III), a função observada é de aumentar a potência hemorrágica pela interação do domínio com receptores de células endoteliais ou proteínas da membrana basal dos capilares (Björnason & Fox, 1994). Outras atividades biológicas foram descritas para o domínio rico em cisteína. Jia et al (2000) demonstraram que este domínio inibe a agregação plaquetária ($IC_{50} = 456nM$) induzida pelo colágeno; além de inibir a adesão de células MG-43 ao colágeno, a inibição foi dose dependente. Mas não apresentou inibição da agregação plaquetária dependente do ADP.

1.2.1.7. Subunidade C-type Lectin-like

As metaloproteases RVV-X (*Vipera russelli*) e VLFXA (*Vipera libetina*) apresentam, cada uma, duas subunidades protéicas adicionais C-type Lectin-like. A análise do cDNA de VLFXA mostrou que esta enzima é traduzida por três ARNm diferentes, um ARNm para os domínios metaloprotease, desintrin-like e cystein-rich, nomeada como cadeia pesada, e dois ARNm para cada C-type Lectin-like, os quais são nomeados de cadeias leves. As duas subunidades C-type lectin-like se ligam à cadeia pesada por meio de ligações pontes dissulfeto (figura 1). Devido à forma de tradução destas enzimas, Fox e Serrano (2005) formularam a hipótese de que esta classe de metaloproteases seja considerada uma subclasse dentro da classe P-III. (Bjarnason & Fox, 1994; Ramos & Selistre de Araújo, 2006).

As metaloproteases de veneno de serpente formam parte da subfamília das “Reprolysins” juntamente com as ADAM (A Disintegrin And Metalloproteinase) as quais compartilham com as SVMP os domínios metaloprotease e Desintegrin-like (Fox; Serrano, 2005). As Reprolysins, junto com outras famílias, como as Astacins, Serralysins, Matrixins ou Matrix Metalloproteases (MMP), Snapalysins e Leishmanolysins, compõem a superfamília das Metzincinas. Todas as famílias mencionadas possuem duas características em comum: o domínio metaloprotease com a seqüência consenso altamente conservada HEXXH presente no sítio ativo e a dependência do zinco na atividade catalítica (Strocker & Bode, 1995; Ramos & Selistre de Araújo, 2006).

A subclassificação das SVMP é feita de acordo com a adição de domínios estruturais, assim, fornece informações essenciais para compreender os mecanismos de ação dessas enzimas. As SVMP são classificadas em quatro classes (Bjarnson & Fox, 1994; Fox & Serrano, 2005):

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

1.2.1.b. SVMP Classe P-II: Apresentam a mesma estrutura básica das P-I's, mas têm a adição de um domínio “Desintegrin-like” na região C-terminal; este domínio apresenta o motivo RGD que pode agir como um bloqueador de integrinas responsáveis da agregação plaquetária. Em geral, as P-II apresentam uma ação hemorrágica mais forte que as P-I. Em recentes revisões (Fox & Serrano, 2005) atribui-se para esta classe a procedência de muitas das desintegrinas presentes nos venenos de Viperídeos; além disso, propõe-se a subclassificação em P-IIa y P-IIb de acordo seu modificação postraducional. Trigamin, Flavoridin, Atrolysin E, Lebatase são algumas hemorraginas que pertencem a esta classe (Bjarnson & Fox, 1994; Fox & Serrano, 2005).

1.2.1.c. SVMP Classe P-III: As toxinas que pertencem a esta classe apresentam estrutura básica (P-I), com a presença do domínio “Desintegrin-like” e adicionado depois deste um domínio “Cystein-rich”, que é caracterizado pela presença de vários resíduos de cisteína; a presença dos três domínios sugere uma complexidade funcional, além disso, apresenta-se a maior atividade hemorrágica das SVMP junto com outros efeitos na hemóstase. De mesmo jeito que a classe anterior, as P-III são sub-classificadas em P-IIIa e P-IIIb; esta classificação é feita baseada na complexidade estrutural. São exemplos desta classe as hemorraginas HR1A, HR1B, Catrocollastatin-C, Jararhagin, Bothropasin (Bjarnson & Fox, 1994; Fox & Serrano, 2005).

1.2.1.d. SVMP Classe P-IV: Esta classe caracteriza-se pela presença da estrutura P-III não processada mais dois domínios “C-type Lectin-Like” que se apresentam ligados por pontes dissulfeto à cadeia principal (estrutura quaternária). Estudos feitos usando cDNA mostram que as estruturas P-III e C-type Lectin-like são codificadas por diferentes genes (VLFXA, *Vipera libetina*), sugerindo que os membros desta classe são feitos por modificações pós-traducionais, sendo possível que esta classe seja só uma subclasse a mais das P-III. Atualmente têm-se dois representantes: RVV-X (Russelysin) e VLFXA (VL Factor-X Activator; Fox & Serrano, 2005).



Figura 3. Classes e subclasses das Metaloproteases de veneno de serpente (Fox & Serrano, 2005). No lado esquerdo da figura mostram-se as formas não processadas das SVMP, no lado direito mostram-se as formas processadas das SVMP.

1.2.2. Aspectos Funcionais

As SVMP são enzimas proteolíticas com importantes funções biológicas em seres procarióticas e eucarióticas, incluindo o homem. Isoladas do veneno de várias serpentes, são importantes objetos de estudo devido às complexidades funcional e estrutural. As serpentes do gênero *Bothrops*, importantes fontes desta classe de enzimas, recebem especial atenção em virtude dos aspectos clínicos e epidemiológicos (figura 4; Gutierrez, 2002).

As SVMP isoladas e caracterizadas a partir da peçonha botrópica, embora não possuam propriedades letais, em conjunto com outras toxinas do veneno contribuem para o efeito

tóxico. As SVMP são responsáveis pela importante manifestação clínica do envenenamento botrópico, a hemorragia, além disso, essas toxinas podem interagir com diferentes fatores da cascata da coagulação (Lu et al, 2005).

O efeito sobre os componentes da coagulação, tais como fibrinogênio, fibrina e as plaquetas, tem sido um dos mais prováveis mecanismos de ação das SVMP (Braud et al, 2000; White, 2005). Assim, com algumas exceções, podem ser classificadas em α - ou β -fibrinogênolíticas e, ao contrário das serinoproteases, degradam preferencialmente a cadeia α do fibrinogênio e, com menor intensidade, a cadeia β . (Swenson & Markland, 2005).

A síndrome hemorrágica é o principal efeito produzido pela peçonha botrópica e, em geral, da família Viperidae (Gutierrez; Rucavado, 2000). A identificação dos princípios hemorrágicos iniciou-se com o estudo do veneno de serpentes do gênero *Bothrops*. Assakura et al. (1985) isolaram e caracterizaram duas metaloproteases do veneno de *B. moojeni*. As metaloproteases isoladas mostraram baixa atividade hemorrágica e massa molecular. Depois, foram isoladas outras duas metaloproteases do veneno de *B. jararaca*, nomeadas HF-2 e HF-3, apresentando 50 e 62 kDa, respectivamente (Assakura et al, 1986).

Mandelbaum et al, (1982) isolaram e caracterizaram do veneno total de *B. neuwiedi* duas metaloproteases de altas massas moleculares, denominadas NHF-a e NHF-b. Os estudos destas enzimas mostraram importantes propriedades funcionais, especialmente os efeitos proteolíticos sobre diferentes substratos naturais, como por exemplo, a caseína, a fibrina e o fibrinogênio.

A hemorragia ocorre principalmente devido ao complexo mecanismo de ação das SVMP, envolvendo mudanças morfológicas das células endoteliais e a participação de aspectos biomecânicos da corrente sanguínea; mas é a degradação das proteínas da Membrana Basal (MB) dos capilares e vênulas o passo chave no processo. Em geral, as SVMP produzem dois processos principais os quais desencadeiam a hemorragia: a) o processo predominante acontece com maior frequência nos capilares, e é caracterizado por drásticas alterações nas células endoteliais, com a formação de “lacunas”, o que facilita a extravasação do sangue aos tecidos (hemorragia “*per rexis*”); e b) desacoplamento das uniões intercelulares, o qual ocorre principalmente nas células endoteliais das vênulas, devido principalmente a processos inflamatórios, mas as células endoteliais não apresentam alterações patológicas na morfologia

celular; este processo é nomeado hemorragia “*per diapedesis*” (Escalante et al, 2006; Gutierrez et al, 2005; Gutierrez et al, 2006).

As SVMP apresentam outros efeitos patológicos além da hemorragia; alguns efeitos, como a miotoxicidade, é consequência da saída de plasma e de componentes celulares sanguíneos ao interstício. O estudo da atividade miotóxica das SVMP iniciou-se com a metaloprotease de baixa massa molecular BaH1 isolada do veneno total de *B. asper* (Gutierrez et al, 1995). Gutierrez et al. (1995) demonstraram que a miotoxicidade produzida pela BaH1 é um processo secundário à hemorragia, o dano muscular é produzido pela isquemia que acontece após a hemorragia. Esta hipótese baseou-se em quatro observações fundamentais: a) a mionecrose só foi observada *in vivo*; b) o aumento das concentrações de ácido láctico no músculo, o que é um indicador da isquemia; c) a mionecrose só é observada a intervalos de tempo tardios, até 6 horas após a inoculação da toxina; e d) todas as observações ultra-estruturais das células musculares afetadas pelas SVMP correspondem a modelos experimentais de isquemia.

De modo geral, os efeitos miotóxico estariam associados à atividade hemorrágica das SVMP. Rodriguez et al. (2001a) estudaram os efeitos da SVMP não hemorrágica Neuwiedase isolada a partir do veneno bruto de *B. newwiedi*. Os pesquisadores demonstraram que as metaloproteases não hemorrágicas possuem atividade miotóxica em altas doses, mesmo sem produzir hemorragia. A mionecrose apresentada pela Neuwiedase caracterizou-se pela reação de inflamação e a infiltração de leucócitos polimorfonucleares. De acordo como o observado na histologia do músculo, as maiores alterações produzidas, pela neuwiedase, foram observadas após 3 horas da inoculação. Estes estudos demonstram a complexidade presente na patologia no tecido muscular devido as SVMP hemorrágicas e não hemorrágicas.

As SVMP produzem transtornos inflamatórios ao induzir a formação de edema e a liberação de citokinas inflamatórias, ao serem injetadas ao tecido muscular e quando são incubadas com macrófagos “*in vitro*” (Gutierrez; Rucavado, 2000). A metaloprotease BaP1 induz rapidamente a formação de bolhas após a injeção intramuscular em camundongos; as características histológicas apresentadas na formação das bolhas sugerem a degradação de componentes-chave da união das camadas dermes e a epidermes, como a laminina ou a integrina $\alpha 6\beta 4$, as quais formam parte dos hemidesmosomas (Rucavado et al, 1995).

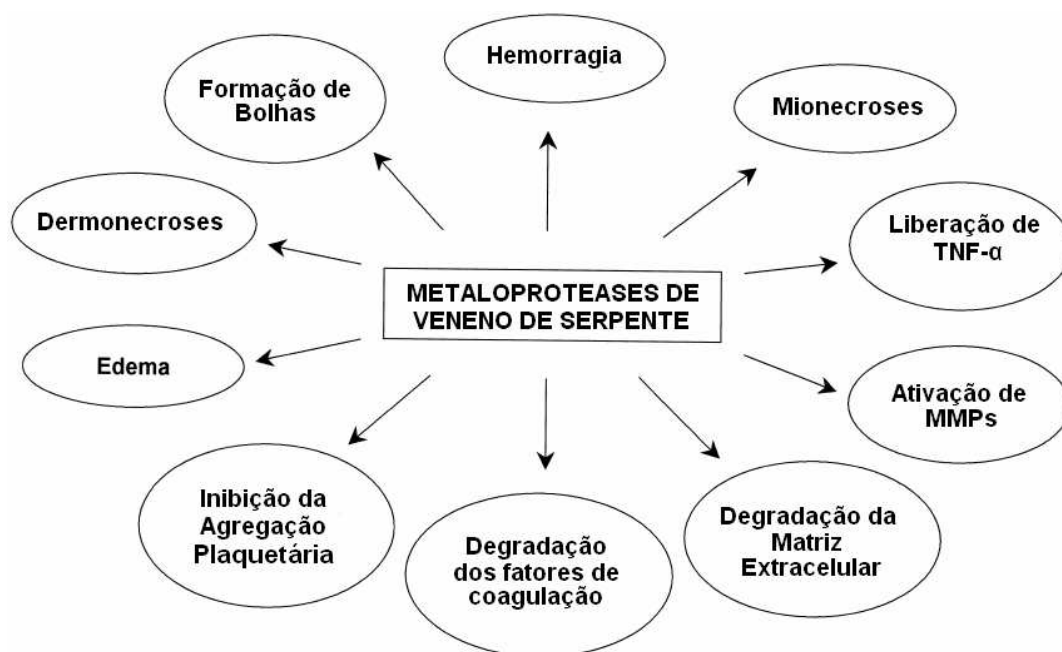


Figura 4. Resumo dos vários efeitos exercidos pelas metaloproteases de veneno de serpente. Alguns dos efeitos são devido à ação direta das SVMP, mas outros são efeitos secundários como resultado da ação destas enzimas (Gutierrez et al, 2005).

Até a presente data, não existem trabalhos relacionados com o isolamento e a caracterização estrutural e funcional metaloproteases, a partir do veneno de *B. marajoensis*, motivo pelo qual a presente pesquisa é inédita. O presente estudo justifica-se não só por ser a primeira descrição de uma nova metaloprotease não descrita na literatura, mas também pelo potencial futuro desta proteína na sua utilidade como uma ferramenta molecular.

1.3. *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 como espécies raras ou restritas em sua distribuição (Romano-Hoge, 1990; Underwood, 1967).

Hierarquia Taxonômica

Reino: Animalia

Phylum: Chordata

Subphylum: Vertebrata

Classe: Reptilia (Laurenti, 1768).

Ordem: Squamata (Oppel, 1811).

Subordem: Serpentes (Linnaeus, 1758).

Infraorden: Alethinophidia (Nopcsa, 1923).

Família: Viperidae (Oppel, 1811).

Subfamília: Crotalinae (Oppel, 1811).

Gênero: Bothrops (Wagler, 1824).

Espécie: *Bothrops marajoensis* (Hoge, 1966).

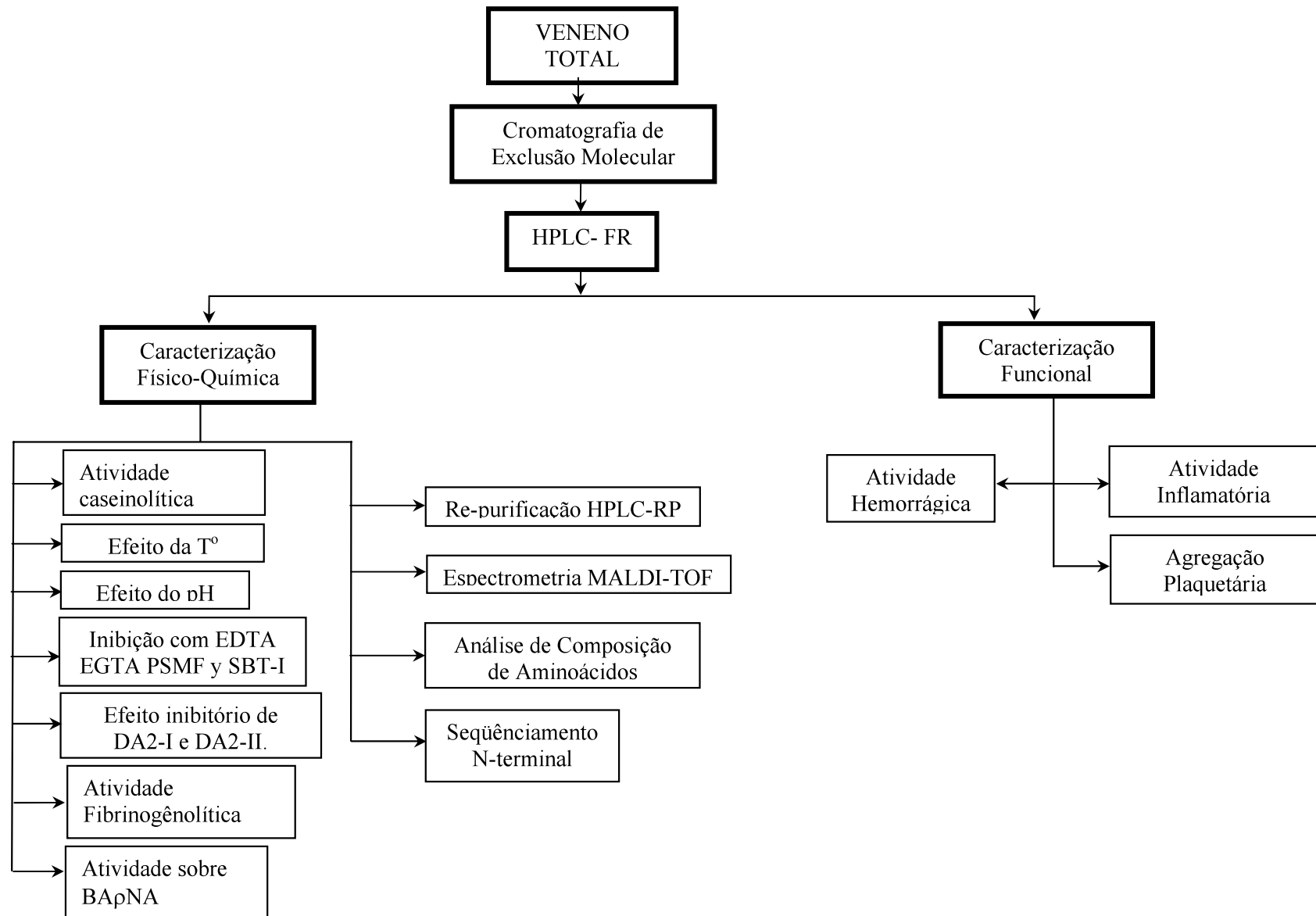
1.4. Objetivos

1.4.1. Purificar uma metaloprotease a partir do veneno total de *Bothrops marajoensis* utilizando dois passos cromatográficos, exclusão molecular em LC e HPLC de fase reversa.

1.4.2. Caracterizar físico-quimicamente a metaloprotease por meio de espectrometria de massa (MALDI-Tof), atividade proteolítica, atividade fibrinogênolítica, estudos de inibição (PMSF, EDTA, EGTA e SBT-I), estudos cinéticos, tais como o efeito da temperatura e pH sobre a atividade proteolítica no substrato caseína e a atividade inibitória dos fatores anti-hemorrágicos de soro de *Didelphis albiventris* sobre a atividade proteolítica da metaloprotease isolada.

1.4.3. Caracterizar farmacologicamente a metaloprotease isolada a partir do veneno total de *Bothrops marajoensis*, através da atividade hemorrágica, edematogênica, agregação plaquetária.

Figure 5. Fluxograma da metodologia aplicada na caracterização estrutural e funcional da metaloprotease BmHF-1.



2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Animais

São utilizados para os ensaios biológicos e farmacológicos camundongos Swiss (18-20 g), obtidos no biotério central da UNICAMP e o uso na Experimentação destes animais foi aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA)-IB-UNICAMP certificado com o protocolo nº 1510-1.

2.2. Veneno

O veneno total de *Bothrops marajoensis* é obtido do Serpentário Proteínas Bioativas Ltda. (Fazenda Boa Esperança, Batatais, São Paulo-Brasil). Todos os solventes, produtos químicos e reagentes utilizados são de grau HPLC, grau seqüência ou de alto grau de pureza, obtidos do Sigma, Aldrich Chemicals, Merk e Bio Rad.

2.3. Purificação da metaloprotease a partir do veneno total de *Bothrops marajoensis*.

Na figura 5 mostra-se o fluxograma resumo da estratégia utilizada na presente tese para a purificação e a caracterização da metaloprotease BmHF1

2.3.1 Cromatografia líquida de exclusão molecular de baixa pressão.

35mg do veneno bruto foram homogeneizados em 400 µL tampão bicarbonato de amônio 0,2M, pH 7,9. Esta solução de veneno foi centrifugada a 3140 x g por 3 minutos para clarificação da solução. O sobrenadante obtido foi então aplicado à coluna pré-empacotada de exclusão molecular Superdex G-75 (0,78 x 30 cm; Waters). A coluna cromatográfica acoplada ao sistema HPLC-biocompatível, APPS LC 650E (Waters), foi previamente equilibrada com o tampão bicarbonato de amônio (pH 7,9; 0,2M) 60 minutos antes da corrida. A eluição do material foi realizada com fluxo constante de 0,3 mL/min e monitorada a uma absorbância de 280 nm. As frações coletadas em um coletor de frações automático Foxy 200 são liofilizadas e armazenadas a -20°C.

As frações são formadas pelos tubos que se encontraram na convergência da ascendência e descendência de cada pico. Cada uma das frações foi submetida à determinação da atividade proteolítica sobre o substrato caseína (método descrito no item 2.4); a determinação da dependência da atividade proteolítica de íons metálicos pela pré-incubação de

uma amostra de cada fração com o agente quelante EDTA (método descrito no item 2.7) e a determinação da atividade hemorrágica (método descrito no item 2.15.1).

2.3.2. Cromatografia líquida de alta eficiência em HPLC de fase reversa.

A fração com atividade caseinolítica e hemorrágica foi submetida numa coluna μ -Bondapak C-18 0,78 X 30 cm preparativa (Waters), acoplado a um sistema de HPLC de Fase Reversa. O sistema cromatográfico é previamente equilibrado com ácido trifluoroacético 0,1%, pH 3,5 (Tampão A). Inicialmente a eluição das amostras foi realizada através de um gradiente linear de acetonitrila 66% (Tampão B), posteriormente este gradiente foi modificado para a otimização da purificação da fração metaloprotease. As frações foram monitoradas a 280nm e em seguida liofilizadas.

As frações foram formadas pelos tubos que se encontraram na convergência da ascendência e descendência de cada pico. Cada uma das frações foi submetida à determinação da atividade proteolítica sobre o substrato caseína (método descrito no item 2.4), a determinação da dependência da atividade proteolítica de íons metálicos pela pré-incubação de uma amostra de cada fração com o agente quelante EDTA (método descrito no item 2.7) e a determinação da atividade hemorrágica (método descrito no item 2.15.1).

Para o monitoramento do grau de pureza da metaloprotease isolada pelos passos cromatográficos anteriores, 500 μ g da metaloprotease BmHF-1 foram submetidos em uma nova cromatografia no sistema de HPLC de fase reversa, sob as condições descritas anteriormente.

2.4. Atividade proteolítica sobre a Caseína.

A atividade proteolítica sobre a caseína (atividade caseinolítica) foi determinada conforme a metodologia descrita por Cominetti (2007). Para o teste 50 μ L do veneno bruto ou da metaloprotease BmHF-1 foram misturados com 500 μ L de uma solução de caseína (0,5%, Tris-HCl 0,01M pH 8,0), logo foram incubados no banho Maria modelo 31681 (ÉTICA Equipamentos S.A. Brasil) a 37°C durante uma hora. Após de completado o tempo de incubação foram agregados 500 μ L de TCA (30%) e deixou-se à temperatura ambiente por 5 minutos; logo a mistura foi centrifugada a 13000 x g por 10 minutos. A atividade proteolítica foi monitorada pela determinação dos peptídeos produzidos pela atividade catalítica da

metaloprotease, sobre a caseína, num comprimento de onda de 280nm num Espectrofotômetro 700 Plus (FEMTO, Brasil). Uma unidade caseinolítica é definida como a quantidade de enzima capaz de produzir um aumento na absorvância de 0,001 unidades/minuto e os resultados são expressos em unidades por miligrama (U/mg).

2.5. Efeito da temperatura na atividade proteolítica de BmHF-1.

O experimento para a observação do efeito da temperatura sobre a atividade metaloprotease foi realizado segundo o método descrito no item 2.4. A temperatura de incubação foi variada em um intervalo de 10-70°C em um banho Maria modelo 31681 (ÉTICA Equipamentos S.A. Brasil) e foram mantidas pelo tempo segundo o item 2.4. As leituras foram feitas no comprimento de onda de 280 nm.

2.6. Efeito do pH na atividade proteolítica de BmHF-1.

O experimento do efeito do pH sobre a atividade proteolítica foi realizado utilizando tampões preparados com diferentes valores de pH (2,5-12,0), sendo que a determinação da atividade proteolítica sobre a caseína e a concentração da enzima são idênticas às usadas no item 2.4 e para todos os pH foi feito um controle. Os tampões utilizados neste experimento foram: tampão Citrato de Sódio pH 4,5; 5,0 e 5,5, tampão Tris-HCl pH 7,0 e 8,0, tampão glicina-NaOH pH 10,0-12,0.

2.7. Efeito de Inibidores.

Os ensaios de inibição foram feitos com caseína como substrato, segundo a metodologia descrita na seção 2.4 sob as condições de temperatura e pH ótimos para a BmHF-1. A metaloprotease BmHF-1 e os inibidores EDTA (10mM), EGTA (10mM), PMSF (10mM), SBT-1 (1mg/mL), foram incubados por 15 minutos a 37°C antes de acrescentar à mistura. A atividade proteolítica residual foi calculada como atividade porcentual em relação à preparação controle (BmHF-1 sem inibidores), a qual foi considerada o 100 % de atividade.

2.8. Efeito inibitório do soro (sDa) e dos fatores anti-hemorrágicos (DA2-I, DA2-II) de *Didelphis albiventris*.

O efeito sobre a atividade específica da metaloprotease do soro (sDa) e dois fatores anti-hemorrágicos (DA2-I, DA2-II) de *Didelphis albiventris* (gambá de-orelha-branca) foram feitos metodologia descrita na seção 2.4 sob as condições de temperatura e pH ótimos para a BmHF-1. A metaloprotease BmHF-1 foi pré-incubada com o soro e fatores anti-hemorrágicos DA2-I, DA2-II por 20 minutos no tampão de reação, na razão molar de 1:1 (m/m), após isso, as amostras foram colocadas no meio de reação e a atividade proteolítica residual foi calculada como atividade percentual em relação à preparação controle sem inibidores, a qual é considerada o 100 % de atividade.

2.9. Atividade proteolítica sobre o fibrinogênio (SDS-PAGE).

A atividade proteolítica sobre o fibrinogênio (atividade fibrigenolítica) da metaloprotease BmHF-1 foi determinada pelo método descrito por Cominetti (2007), brevemente: 900 µL de uma solução de fibrinogênio bovino (0,1% m/v, tampão Tris-HCl 10mM, NaCl 100mM, pH 7.4) foi misturada com 20 µg da metaloprotease BmHF-1, a mistura foi incubada a diferentes intervalos de tempo (5, 15, 30, 60 minutos, 3, 6 12, 24 horas), após a incubação foi adicionada à mistura 900µL de solução denaturante (Tris-HCl 0,05M pH 6,5; Urea 10M; β-mercaptoetanol 10% (v/v), glicerol 10% (v/v), azul de bromofenol 0,05% (v/v)) e deixada à temperatura ambiente por 24 horas. As amostras foram analisadas por meio de Gel SDS-PAGE para determinar a degradação do fibrinogênio.

2.10. Atividade proteolítica sobre o substrato BApNA.

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

O substrato BApNA foi dissolvido numa 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 solução de substrato, previamente dissolvido em DMSO (solução estoque), para ser utilizado na proporção de 1/10 (10 μ L.) em tampão Tris-HCl, 10 mM, 10 mM CaCl₂, 100 mM NaCl, pH 7,8, mais 250 μ L de tampão para um volume final de 1350 μ L. Depois de 30 minutos a reação foi bloqueada com ácido acético 30% (500 μ L). O monitoramento da reação foi realizado pela absorvância num comprimento de onda de 405 nm.

2.11. Análise de composição de aminoácidos

O sistema utilizado foi do analisador “Pico-Tag” da Waters, segundo o qual a identificação dos aminoácidos foi feita através da cromatografia em HPLC do produto feniltiocarbamil do aminoácido (PITC), proveniente da derivatização com feniltiocianato dos aminoácidos obtidos de hidrólise ácida. Estas formas de cromóforos podem ser detectadas em concentrações de 1,0pmol (Henrikson e Meredith, 1984).

A análise dos aminoácidos PITC é realizada em HPLC, usando coluna C18 μ -Bondapack (3,9 mm x 15 cm) em cromatografia de fase reversa com um gradiente linear de 0 a 100% de acetonitrila (60%) por 21 minutos. A identificação de cada aminoácido foi feita em relação a um corrido padrão de aminoácidos PITC (Bidleingmeyer et al., 1984).

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

2.12. Espectrometria de massa

A massa molecular da metaloprotease de *Bothrops marajoensis* foi analisada por Espectrometria de Massa utilizando um Voyager DE PRO MALDI TOF mass spectrometry (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). 1 μ L da amostra foi dissolvida em TFA 0,1% é misturada em 2 μ L da matriz. A matriz é preparada com ácido α -cyano-4-hidroxy-cinnamico (Sigma), 60% acetonitrila e 0,1% v/v TFA; a massa foi analisada sob as condições seguintes: aceleração de voltagem 25 kV, o laser ajustado a 2890 mJ/com², em 300 ns e o modo de análise foi linear (Ponce-Soto, et al., 2007b).

2.13. Seqüenciamento N-terminal da Metaloprotease BmHF-I

A seqüência de N terminal de aminoácidos foi obtida pelo seqüenciamento direto da região N-terminal da proteína reduzida e carboximetilada, e foram feitos em um seqüenciador

automático modelo Procise F-491 da Applied Biosystem. Os PTH aminoácidos foram identificados em um analisador automático de PTH aminoácidos modelo 120 A (Applied Biosystem) de acordo com o tempo de retenção dos 20 PTH aminoácidos padrões (Ponce-Soto et al, 2002).

2.14. Estudo de homologia seqüencial

A seqüência N-terminal da metaloprotease BmHF-1 foi determinada sua homologia seqüencial com outras metaloprotease de seqüências conhecidas usando os algoritmos:

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

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

2.15. Caracterização Funcional

2.15.1. Atividade hemorrágica (Método de pele)

Foi preparada uma solução estoque de metaloprotease BmHF-1: 1 mg/mL a partir da qual se preparam doses de amostra de 12, 14, 16, 18 e 20 µg/mL. Essas soluções são inoculadas via intradérmica 0,1 mL a grupos de 4 camundongos de 18 a 20 gr de peso. Depois de duas horas de aplicada a injeção intradérmica, foi determinada como Dose Hemorrágica Mínima a quantidade mínima de toxina capaz de induzir um halo hemorrágico com um diâmetro de 10 mm. (Gutierrez et al, 1985).

2.15.2. Formação de Edema

A avaliação da formação de edema foi feita segundo Ponce-Soto et al (2007a). Brevemente, em grupos de 4 camundongos (18-20 gr) foram feitas injeções subcutâneas (s.c.), da metaloprotease dissolvida em 50 µL de PBS (0,12 M NaCl, 0,04 M fosfato de sódio, pH 7,2), na região plantar da pata direita; na pata esquerda foi inoculado 50µL de PBS como controle. Depois de determinados intervalos de tempo (30 min, 1 hora, 3 horas, 6 horas 12 horas e 24 horas) após a injeção, a formação de edema foi avaliada pelo aumento do diâmetro da pata medida com um Comparador Externo com Relógio Serie 5400 (Metroltec, SP-Brazil). A formação de edema foi expressa como a porcentagem a mais da medida da pata direita em relação à pata esquerda (controle). A dose mínima para a formação de edema (MED) foi definida como a quantidade de toxina que produz 30% de formação de edema após uma hora de injetado a toxina (Yamakawa et al, 1976).

2.15.3. Agregação Plaquetária

A extração do sangue e a obtenção do plasma rico em plaquetas (PRP) e o plasma pobre em plaquetas (PPP) foram feitas segundo o método descrito por Cazenave et, al (2004). Brevemente, as amostras de sangue foram coletadas de 10 camundongos SWISS de 8 semanas de idade (20 gr); em média foi extraído 1 mL de sangue por camundongo. Os camundongos foram anestesiados com uma mistura de xilazine base 0,2% e 1% de ketamina; logo foi exposta cirurgicamente a aorta abdominal, o sangue extraído pelo uso de agulhas gauge 25 montada numa seringa de 2 mL de capacidade contendo a solução anticoagulante ACD (ácido cítrico 85 mM, citrato de sódio anidro 66,6 mM e dextrose 111mM) numa relação de 1 volume de solução anticoagulante para 6 volumes de sangue. Depois todo o sangue coletado foi colocado num tubo Falcon de 10ml.

O plasma rico em plaquetas (PRP) foi obtido por centrifugação a 2300 x g por 1 minuto e 40 segundos à temperatura ambiente a partir de 10mL de sangue. A obtenção do plasma pobre em plaquetas (PPP) é feito ao submeter o precipitado, obtido previamente, novamente à centrifugação 980 x g durante 10 minutos aproximadamente à temperatura ambiente.

Os ensaios de indução da Agregação Plaquetária são feitos incubando 3 μ L de BmHF-1 com 500 μ L de PRP por 4 minutos, a avaliação foi realizada durante este tempo. Os controles foram feitos incubando o PRP com 20 μ L de Trombina bovina (0,01U/mL, SIGMA-Aldrich; Zingalli & Frattani, 2007) durante 4 minutos. Os resultados foram expressos em porcentagem da Agregação Plaquetária.

2.16. 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 $p < 0.05$.

3. RESULTADOS

3.1. Purificação da metaloprotease BmHF-1 isolada a partir do veneno total de *Bothrops marajoensis*.

3.1.1. Cromatografia líquida de exclusão molecular de baixa pressão.

A figura 6 mostra o fracionamento do veneno bruto de *B. marajoensis*, em uma coluna Superdex G-75, o cromatograma apresenta nove picos, os quais foram numerados de 1 a 9.

O monitoramento, tubo por tubo, da atividade biológica sobre a caseína foi encontrado somente nos picos 1, 2 e 3. Para confirmar a atividade metaloprotease, foi realizado o teste de inibição pela pré-incubação das amostras com EDTA (quelante), somente os picos 1 e 3 foram inibidos.

Os picos obtidos no cromatograma também foram submetidos à presença da atividade hemorrágica, onde somente a fração 1 mostrou essa atividade. A fração 1(*), que apresenta atividade sobre a caseína, necessidade da presença de íon metálico para sua atividade proteolítica, atividade hemorrágica, foi selecionado para prosseguir com as etapas de purificação. O “pool” foi realizado na convergência da ascendência e descendência de cada pico.

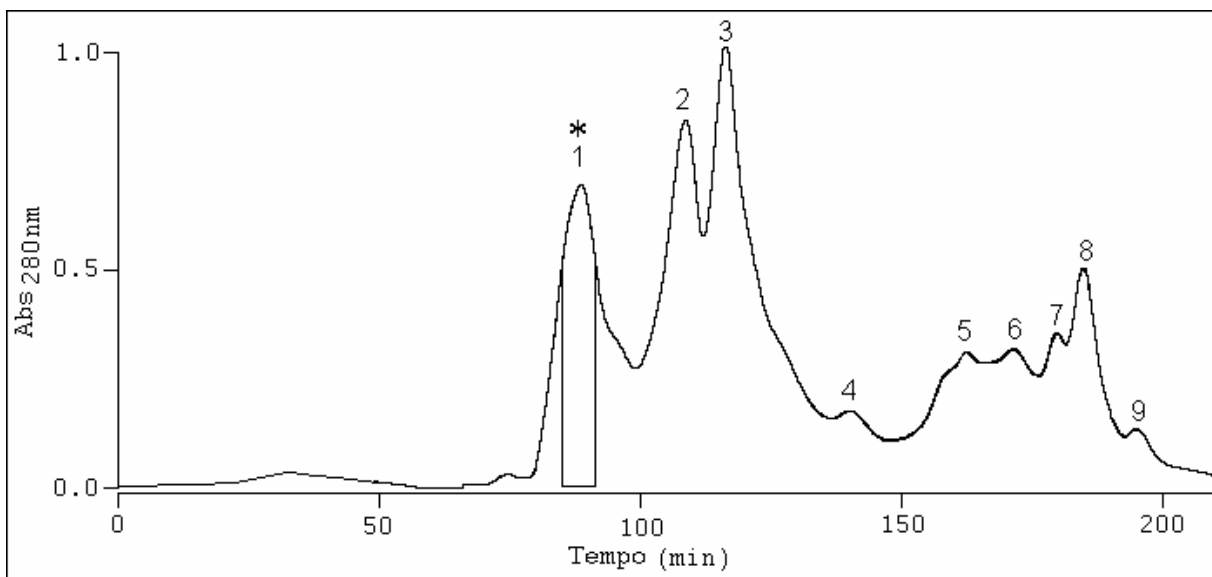


Figura 6. Cromatografia líquida de baixa pressão de exclusão molecular em LC numa coluna Superdex G-75. 35 mg do veneno total de *Bothrops marajoensis* foram dissolvidos em 400µL de tampão Bicarbonato de Amônia 0,2 M e homogeneizados seguido de centrifugação a 3140 x g por 3 minutos. O sobrenadante foi injetado na coluna previamente equilibrada e eluída com tampão Bicarbonato de Amônia 0,2M pH 7,9. O fluxo foi estabelecido a 0,3 mL/min.

3.1.2. Purificação da fração 1 em coluna μ -Bondapack C-18 (0,78 X 30 cm) preparativa de fase reversa acoplada a um sistema de HPLC (Waters).

A Figura 7 mostra o perfil cromatográfico da fração 1, obtida no LC, em uma coluna μ -Bondapack C-18 (0,78 X 30 cm) preparativa (Waters), acoplada a um sistema de HPLC de fase reversa. Temos a presença de treze picos nomeados de 1-I até 1-XIII. Da mesma forma do item anterior, fizemos o monitoramento da atividade proteolítica sobre caseína, inibição da atividade proteolítica pelo quelante EDTA e atividade hemorrágica, sendo que o pico X apresentou as 3 atividades, o qual foi selecionado para a posterior caracterização físico-químico, funcional, e estrutural, e passou a ser denominada de BmHF-1. Os “pools” foram realizados na convergência da ascendência e descendência de cada pico.

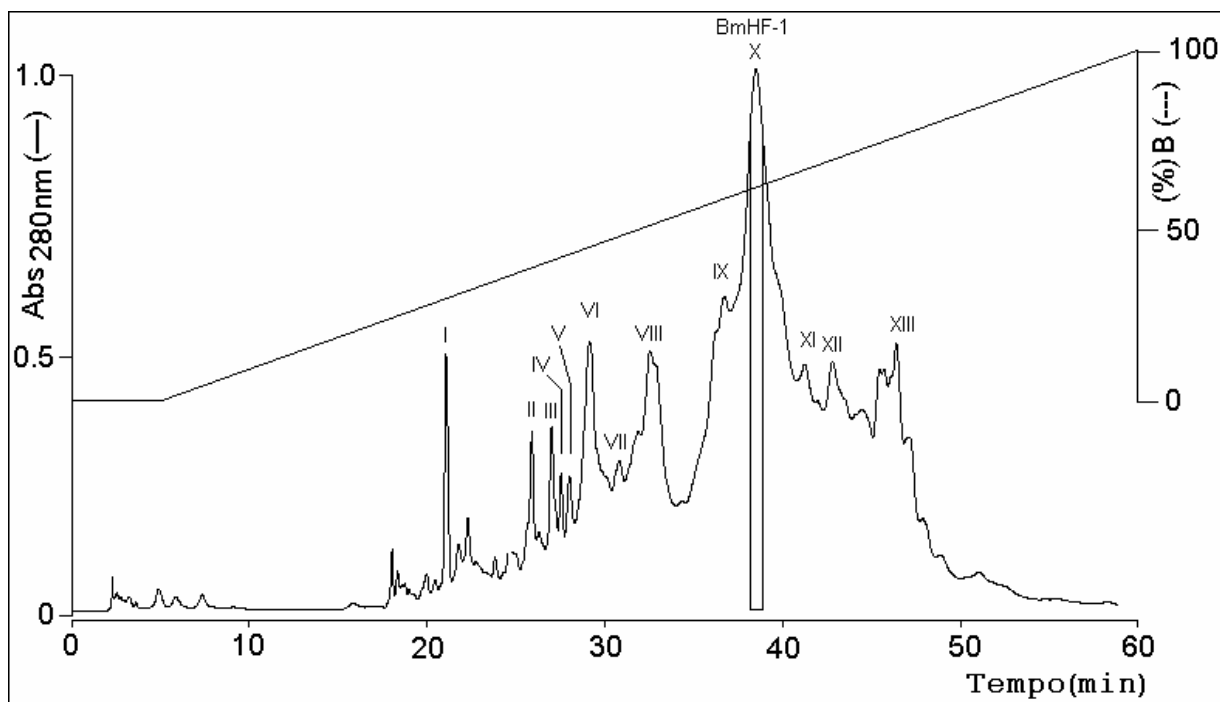


Figura 7. Perfil cromatográfico de purificação da fração 1 em um sistema de HPLC de fase reversa em coluna μ -Bondapack C-18 (Waters). 5mg da fração 1 foram dissolvidos em 200 μ L de TFA (0,1%) e aplicados em uma coluna μ -Bondapack C-18 (Waters). A eluição da amostra foi realizada usando-se um gradiente linear contínuo de concentração do tampão B (Acetonitrila 60%, TFA 0,025%). O fluxo foi mantido constante a 2ml/min. O monitoramento da corrida cromatográfica foi realizado a 280 nm de absorvância..

3.1.3. Controle do grau de pureza da fração BmHF-1 em um sistema HPLC-RP.

Para determinar o grau de pureza da fração BmHF-1, obtida pelos dois passos cromatográficos anteriores, 1mg da fração foi submetida a uma re-cromatografia em um sistema de HPLC-RP sob as mesmas condições descritas no item anterior. Na figura 8 pode-se observar a presença de um pico simétrico com o tempo de retenção em $38 \pm 1,5$ s, sendo eluída aos 68% do tampão B.

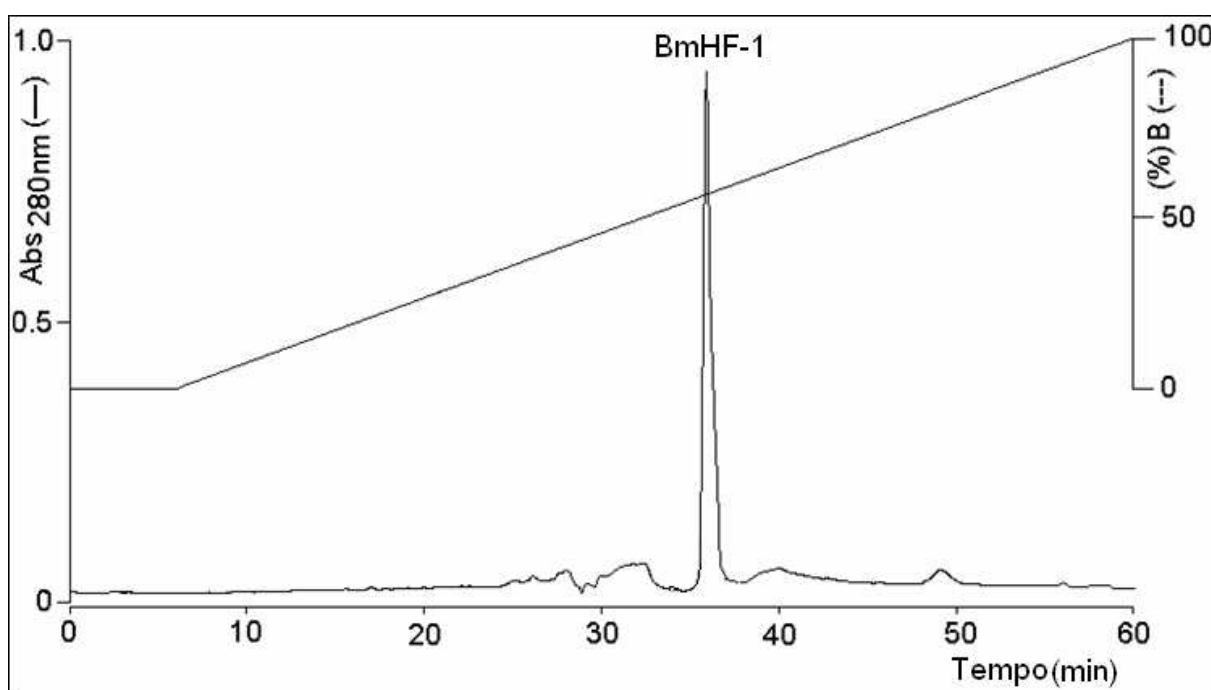


Figura 8. Perfil cromatográfico da fração BmHF-1 em HPLC de fase reversa. 200 μ g da fração BmHF-1 foram dissolvidos em 120 μ L de TFA (0,1%) e 80 μ L de Bicarbonato de Amônio (1M) e aplicados numa coluna μ -Bondapck C-18 (Waters), sistema de HPLC-RP. A eluição da amostra foi realizada usando-se um gradiente linear contínuo de concentração do tampão B (Acetonitrila 60%, TFA 0.025%). O fluxo foi mantido constante a 2ml/min. O monitoramento da corrida cromatográfica foi realizado a 280nm de absorvância.

3.2. Espectrometria de Massas MALDI-Tof da metaloprotease BmHF-1.

Através desta análise, pode-se constatar o grau de pureza da metaloprotease BmHF-1, de *Bothrops marajoensis*, obtidas a partir da cromatografia de HPLC de fase reversa. A metaloprotease BmHF-1 apresenta uma massa molecular de 27162,36 Da, segundo o que é mostrado na figura 9.

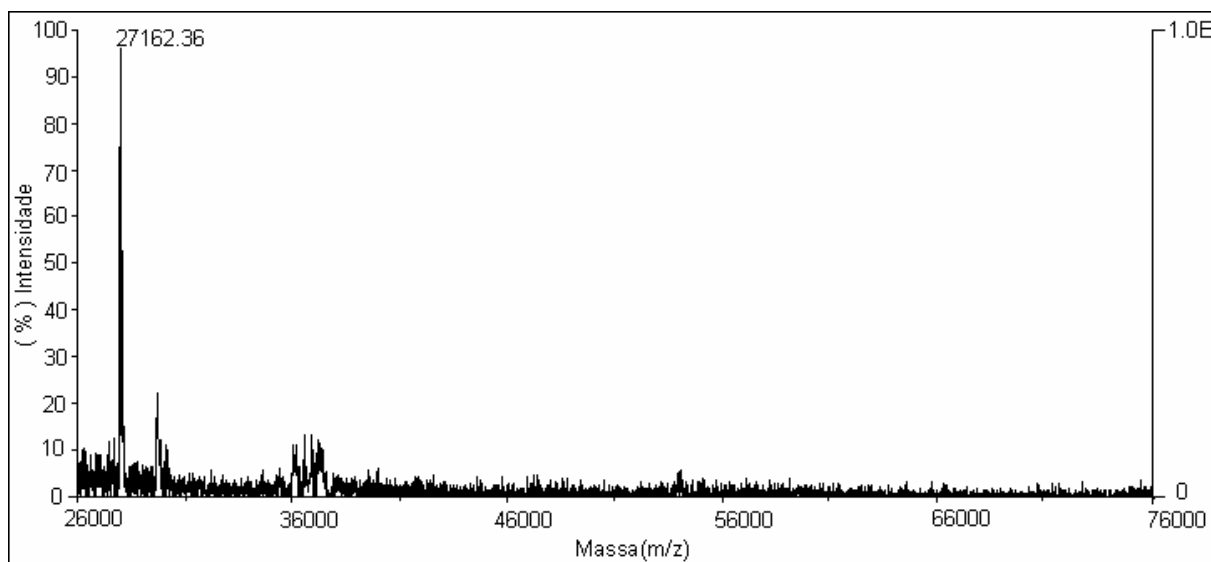


Figura 9. Espectro de massa, da metaloprotease BmHF-1 procedente do veneno total de *Bothrops marajoensis* foi analisada por Espectrometria de Massas, utilizando-se um Voyager DE PRO MALDI-Tof mass spectrometry (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). 1 μ L da amostra dissolvida em TFA 0.1% foi misturada com 2 μ L da matriz. E analisada sob as condições seguintes: aceleração de voltagem 25 kV, o laser ajustado a 2890 mJ/cm^2 , em 300 ns e o modo de análise foi linear.

3.3. Atividade proteolítica sobre a caseína da BmHF-1.

A atividade proteolítica sobre a caseína do veneno bruto (VT) de *B. marajoensis*, fração 1 do primeiro passo de purificação (Cromatografia em LC de exclusão molecular numa coluna Superdex G-75) e da metaloprotease BmHF-1 mostra-se na figura 10. A atividade do veneno bruto, da fração 1 e da metaloprotease BmHF-1 é 3,65 U/mg, 4,65 U/mg e 7,51 U/mg respectivamente. O gráfico mostra a maior atividade específica de BmHF-1 em comparação com a o veneno bruto e a fração 1, o qual pode servir como um indicador da boa qualidade da estratégia de purificação usada no presente trabalho.

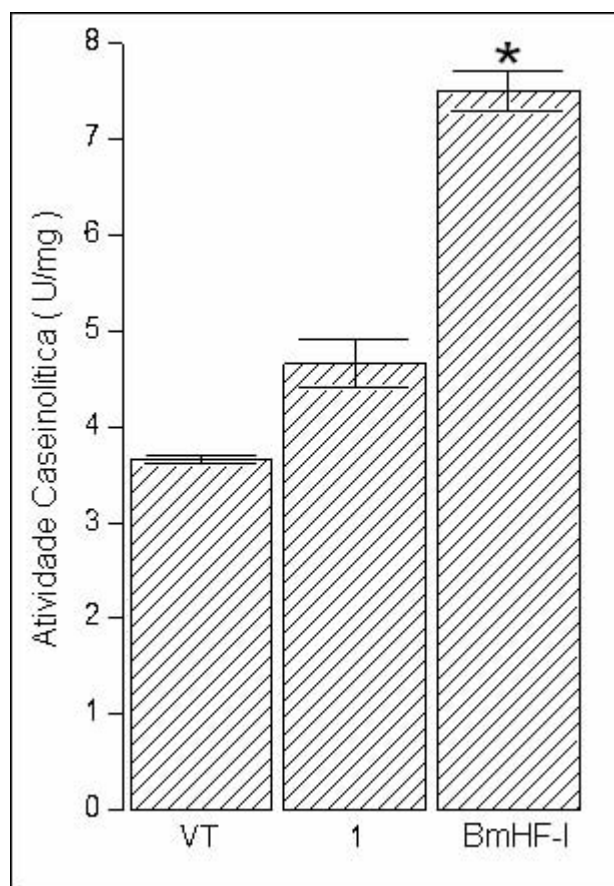


Figura 10. Atividade caseinolítica do veneno bruto (VT) de *Bothrops marajoensis*, fração 1 (cromatografia em LC, coluna Superdex G-75) e da metaloprotease BmHF-1. 50 μ L das amostras foram misturados com 500 μ L de uma solução de caseína (0,5% Tris-HCl 0,01 M, pH 8,6) e incubados no banho Maria por 1 hora a 37 $^{\circ}$ C. Após a mistura, foram adicionados 500 μ L de TCA (30%), depois de 5 minutos as amostras foram centrifugadas a 13000 x g. As leituras foram feitas a 280 nm. Os valores são expressos pela media e a \pm SD (n=4). *Diferença significativa ($p < 0,05$).

3.4. Efeito da temperatura na atividade proteolítica de BmHF-1.

Na figura 14 mostra-se o efeito da temperatura sobre a atividade proteolítica sobre a caseína da metaloprotease BmHF-1. Na figura nota-se que a temperatura ótima da BmHF-1 está na faixa dos 40°C, temperatura na qual se apresentou maior atividade proteolítica. Para as temperaturas maiores que 50°C a atividade de BmHF-1 se reduz e aos 70°C não ocorre atividade proteolítica. No caso das temperaturas inferiores a 30°C observa-se que a atividade proteolítica se reduz e ao 30°C observa-se atividade proteolítica significativa.

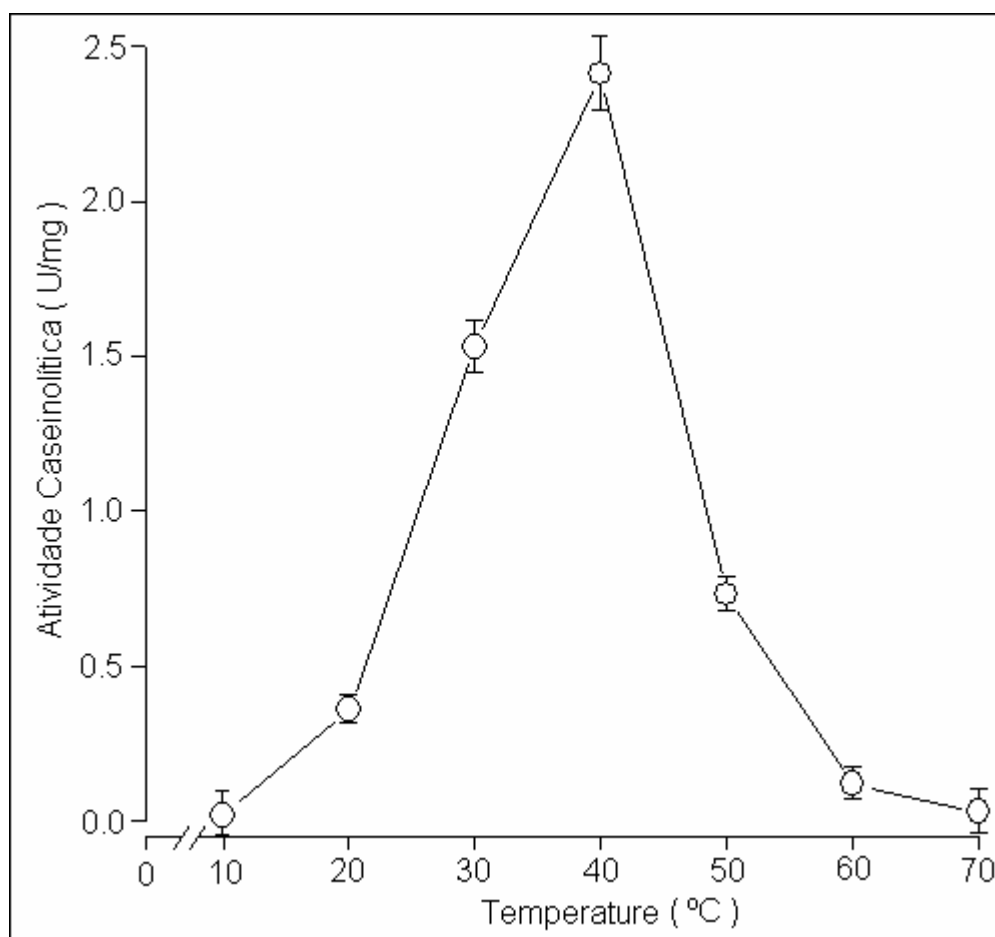


Figura 11. Efeito da temperatura na atividade caseinolítica da metaloprotease BmHF-1. A determinação da atividade proteolítica foi segundo o item 2.4, a temperatura de incubação é variada num intervalo de 10-70 °C. Os resultados são expressos na média e \pm SD (n = 4).

3.5. Efeito do pH na atividade proteolítica da BmHF-1.

O efeito do pH sobre a atividade proteolítica sobre a caseína da metaloprotease BmHF-1 foi avaliado. Na figura 15 é mostrado que os valores ótimos de pH para a atividade proteolítica sobre a caseína da metaloprotease BmHF-1 estão na faixa de 7 e 8, fora deste intervalo observa-se que a atividade catalítica da metaloprotease diminui. Para valores de pH menor de 5 e maiores 9 não ocorre atividade proteolítica significativa.

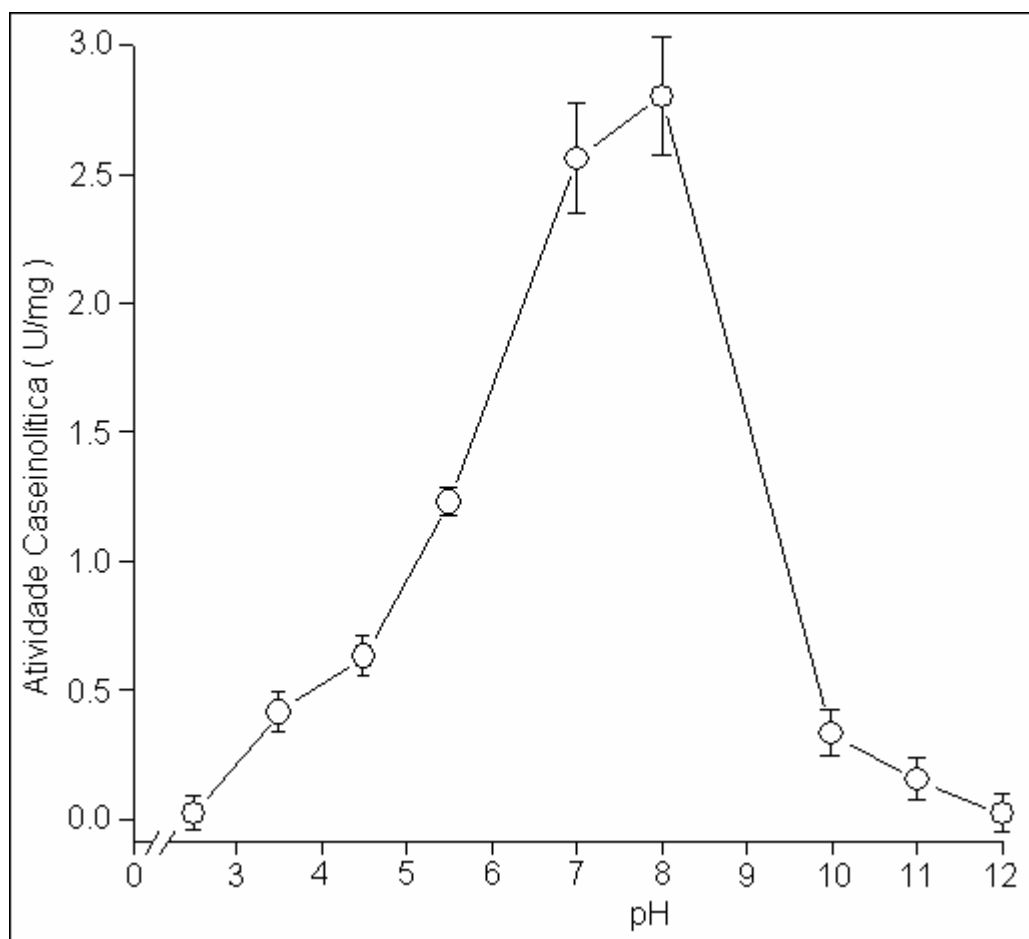


Figura 12. Efeito do pH na atividade caseinolítica da metaloprotease BmHF-1. A atividade proteolítica sobre caseína da BmHF-1 foi feita segundo o item 2.4. O pH da mistura de reação é variado num intervalo de 2.5-12. As leituras foram feitas a 280 nm. Os valores são expressos na média e a \pm SD (n = 4).

3.6. Efeito de inibidores sobre a atividade proteolítica de BmHF-1.

Na figura 13 apresentam-se os efeitos de inibitórios dos agentes quelantes EDTA e EGTA, do PMSF (inibidor de serinoproteases) e do inibidor de tripsina de soja (SBT-I) na atividade proteolítica sobre a caseína da metaloprotease BmHF-1. No gráfico 13 pode-se observar que em presença dos agentes quelantes EDTA (5 mM) e o EGTA (5 mM), reduz-se a atividade proteolítica sobre a caseína da BmHF-1, apresentando atividades residuais de 2,6 e 1,3% respectivamente. No caso do PMSF e do SBT-1, não apresentaram nenhum efeito significativo ($p > 0,05$) sobre a atividade proteolítica sobre a caseína da BmHF-1.

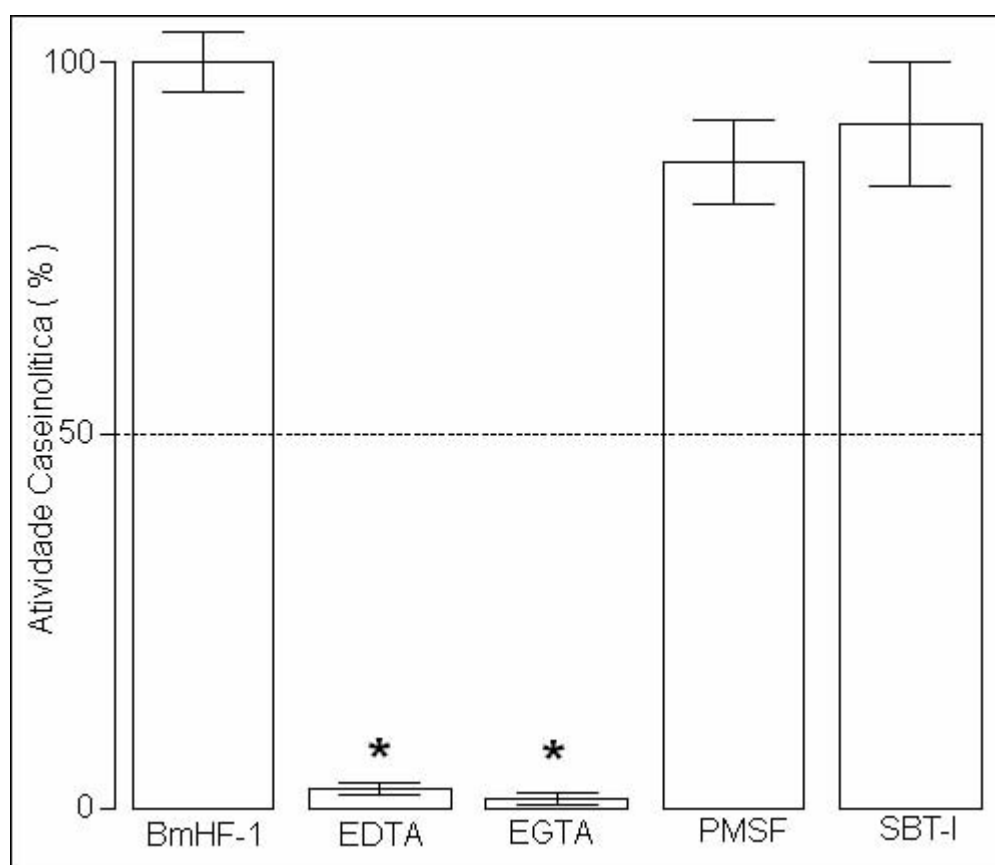


Figura 13. Efeito de inibidores sintéticos na atividade caseinolítica de BmHF-1. A metaloprotease BmHF-1 foi previamente incubada com EDTA (10mM), EGTA (10mM), PMSF (10mM) e SBT-1 (1 mg/mL) por 15 minutos a 37°C, logo após o procedimento já descrito foi aplicado. Os resultados são expressos em porcentagem de atividade caseinolítica, tendo como 100% de atividade proteolítica sobre a caseína da metaloprotease BmHF-1 sem os inibidores (n = 4).

*Diferença significativa ($p < 0,05$).

3.7. Efeito do soro (sDa) e dos fatores anti-hemorrágicos DA2-I, DA2-II de *Didelphis albiventris*.

Avaliamos os efeitos sobre a atividade caseinolítica de BmHF-1 dos fatores anti-hemorrágicos DA2-I e DA2-II, assim como do soro de *Didelphis albiventris*. Na figura 16 pode-se observar que o soro (sDa) e as frações (DA2-I e DA2-II) inibiram a atividade proteolítica sobre o substrato caseína da BmHF-1. Observa-se que as frações purificadas DA2-I e DA2-II apresentaram maior inibição da atividade proteolítica de BmHF-1 com atividades residuais de 6,6% e 6,8% respectivamente, em comparação com o soro de *D. albiventris* (sDa), o qual apresentou uma atividade proteolítica residual de BmHF-1 de 36,1% .

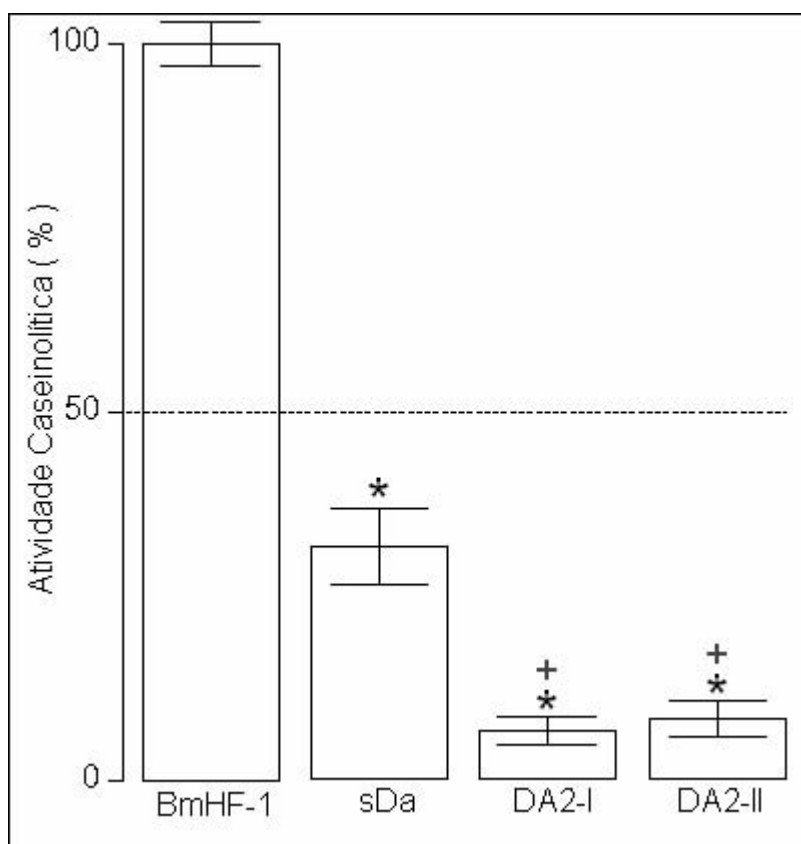


Figura 14. Efeito do soro e fatores anti-hemorrágicos de *Didelphis albiventris*. O experimento foi feito segundo o descrito no item 2.4. A metaloprotease BmHF-1 foi pré-incubada com os inibidores (1:1 m/m) por 20 minutos a 37 °C. Os resultados são expressos em porcentagem de atividade caseinolítica, tendo como 100% de atividade caseinolítica a atividade da metaloprotease BmHF-1 sem os inibidores (n=4).

*Diferença significativa ($p < 0,05$) em comparação com o controle (BmHF-1).

+ Diferença significativa ($p < 0,05$) em comparação entre tratamentos (sDa).

3.8. Atividade proteolítica sobre o fibrinogênio da BmHF-1.

A metaloprotease BmHF-1 apresenta atividade proteolítica sobre o fibrinogênio, o qual é detectado através de eletroforese SDS-PAGE (Figura 11). Foram considerados os tempos de 0,08 (pista 2); 0,25 (pista 3); 0,5 (pista 4); 1 (pista 5), 3 (pista 6), 6 (pista 7), 12 (pista 8) e 24 (pista 9) horas, respectivamente; foi utilizado fibrinogênio como controle (pista 1). Na figura 7 se evidencia o processo de degradação da cadeia α do fibrinogênio bovino, já desde os 15 minutos. Logo segue a completa degradação da cadeia α ao alcançar as 6 horas de reação.

Por outro lado, as cadeias β e γ não sofrem degradação alguma, mesmo depois de 24 (carril 9) horas de incubação com a metaloprotease BmHF-1.

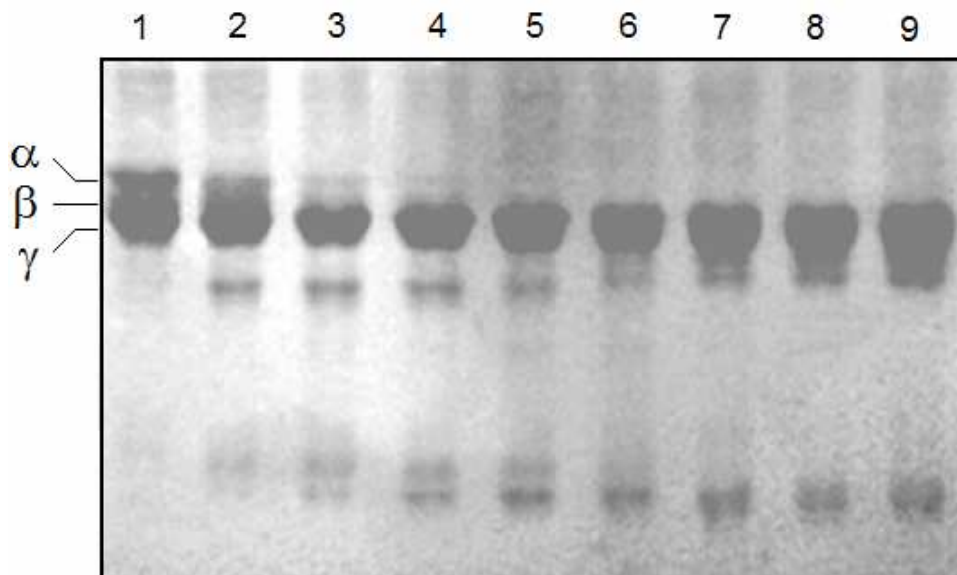


Figura 11. Atividade fibrinogênolítica da metaloprotease BmHF-1. Eletroforese em SDS-PAGE (12,5%) em condições reduzidas na presença de β -mercaptoetanol, tampão Tris-HCl, por 1 hora e 30 minutos, a 30 mA constante e o voltagem variando entre 70 e 100V. O gel foi corado com Comassie Blue R-250 “overnight” e descorado com uma solução de ácido acético:metanol:água (5:4:1) por 2 horas. Para o ensaio 900 μ L do fibrinogênio (2:1 m/v) é incubada a vários intervalos de tempo com 20 μ L da metaloprotease BmHF-1 (200:1 m/v) a 37 °C e pH 7.4.

3.9. Atividade proteolítica sobre o substrato BApNA.

Avaliou-se a atividade proteolítica de BmHF-1 sobre o substrato BApNA. Na figura 12 observam-se os valores de V_0 para o veneno bruto de *B. marajoensis*, a fração 1, a metaloprotease BmHF-1 e a trombina-like TLBm (isolada do veneno de *B. marajoensis*); a atividade de BmHF-1 é apenas apreciável quando comparada com as atividades do veneno bruto de *B. marajoensis* e de TLBm (Trombina-Like de *Bothrops marajoensis*), indicando que a BmHF-1 possui baixa atividade sobre o substrato BApNA.

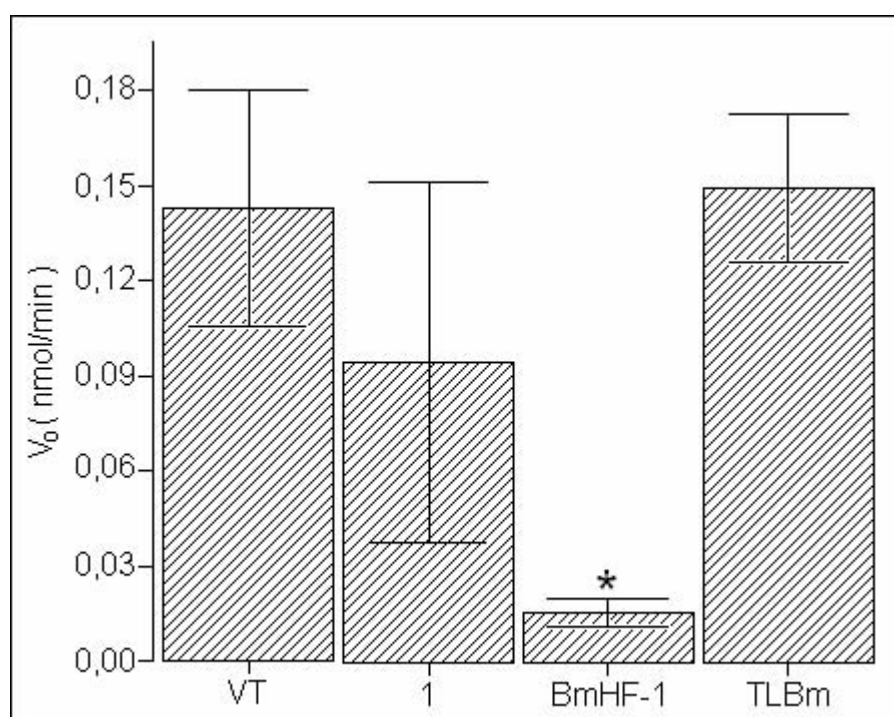


Figura 12. Atividade proteolítica sobre o substrato sintético BApNA. 20 μ L de amostra (veneno bruto, fração 1, BmHF-1 ou TLBm) foram misturados com 1000 μ L de solução de substrato, a mistura foi incubada por 30 minutos a 37°C, após de esse tempo às amostras são lidas a absorbância de 405 nm. Os resultados são expressos em média e \pm SD (n = 4).

*Diferença significativa ($p < 0,05$).

3.10. Análise de Composição de Aminoácidos.

A metaloprotease BmHF-1 foi submetida à hidrólise ácida (HCl 6N) e à derivatização para obtenção da composição global de aminoácidos que é mostrada na Tabela 1. A massa molecular calculada, segundo a composição de aminoácidos, é de 25 968,77 e está próxima à massa molecular determinado por espectrometria de massas MALDI-Tof (27162,36 Da). A análise da composição global de aminoácidos evidenciou uma alta presença de Asx, Ser, Leu, em comparação com outros resíduos.

Tabela 1. Composição de aminoácidos da metaloprotease BmHF-1, isolada a partir do veneno total de *Bothrops marajoensis*

Aminoácidos	SVMP BmHF-1	%	PM
Asx	34	14,72	3913,01
Glx	24	10,39	3098,77
Ser	22	9,52	1915,72
Gly	13	5,63	741,68
His	10	4,33	1371,41
Arg	9	3,90	1405,69
Thr	8	3,46	808,84
Ala	11	4,76	781,87
Pro	9	3,90	874,05
Tyr	11	4,76	1794,94
Val	15	6,49	1486,99
Met	7	3,03	918,39
Cys	6	2,60	618,87
Ile	13	5,63	1471,07
Leu	23	9,96	2602,67
Phe	6	2,60	883,06
Lys	10	4,33	1281,74
Trp	nd	nd	nd
Total	231	100,00	25968,77

3.11. Sequência N-terminal da metaloprotease BmHF-1 e estudo de homologia seqüencial.

A metaloprotease BmHF-1 purificada foi submetida ao seqüenciamento da porção N-terminal, o que permitiu se determinar uma seqüência de 50 aminoácidos.

A análise da seqüência de aminoácidos da metaloprotease (BmHF-1, Figura 17) mostra homologia seqüencial e estrutural, com uma alta identidade, com a Atrolysin b (75%; *C. atrox*; Hite et al, 1994) e os domínios metaloprotease das desintegrinas Contorstratin (72,5%; *A. contortrix contortrix*; Zhou et al, 2002) e PVS- β (72,5%; Piscivostatin, *A. piscivorus piscivorus*; Okuda et al, 2002). Além do mencionado anteriormente. As metaloproteases da classe P-I: HT2, Atroxase, Atrolysin c e atrolysin d compartilham com a toxina BmHF-1 uma grande homologia seqüencial (71.1; 70.7 e 70.0% respectivamente).

	10	20		30	40	50	% Identidade
BmHF-1	P C W K G W S E D E Q N L W P Q R Y I Q L V V V A	25		D H G M F M K Y N G D L A A I R K R V H E L V N N	50	100.0	
Atrolysin b	- - - - - - - - - - D Q Q N L - - P Q R Y I E L V V V A	16		D H R V F M K Y N S D L N I I R K R V H E L V N	40	75.0	
Contorstratin	- - - - - - - - - - E Q Q G F - - P Q R Y I E L V V V A	16		D H R M F T K Y N G N L N T I R I W V H E L V N	40	72.5	
PVS- β	- - - - - - - - - - E Q Q R F - - P Q R Y I E L V V V A	16		D H R M F T K Y N G N L N T I R I W V H E L V N	40	72.5	
HT-2	- - - - - - - - - - - Q N L - - P Q S Y I E L V V V A	14		D H R M F M K Y N S D L N T I R T R V H E I V N	38	71.7	
Atroxase	- - - - - - - - - - E D Q Q N L - S Q R Y I E L V V V A	17		D H R V F M K Y N S D L N I I R K R V H E L V N	41	70.7	
Atrolysin c	- - - - - - - - - - D Q Q N L - - P Q R Y I E L V V V A	16		D H R V F M K Y N S D L N T I R T R V H E I V N	40	70.0	
Atrolysin d	- - - - - - - - - - D Q Q N L - - P Q R Y I E L V V V A	16		D H R V F M K Y N S D L N T I R T R V H E I V N	40	70.0	
Mt-d	- - - - - - - - - - E Q Q R F - - P Q R Y I E L V V V A	16		D H G M F T K Y D S N L D T I T T W V H E L V N N	41	68.3	
HR2a	- - - - - - - - - - E Q Q R F - - P Q R Y I E L A I V V	16		D H G M Y T K Y S S N F K K I R K R V H Q M V N N	41	58.5	

Figura 17. Comparação da seqüência N-terminal da BmHF-1. **aa** regiões conservadas só nas SVMP's da classe P-I não hemorrágicas; (*) aminoácidos altamente conservados nas SVMP; **aa** com cadeia lateral envolvido na ligação do Ca^{+2} . A seqüência N-terminal de BmHF-1 foi alinhada com: Atrolysin b de *C. atrox* (gi: 82216949); Contorstratin de *A. contortrix contortrix* (gi: 48428162); Piscivostatin de *A. piscivorus piscivorus* (gi: 50400453); HT2 de *C. ruber ruber* (gi: 462318); Atroxase de *C. atrox* (gi: 172045825); Atrolysin c e Atrolysin d de *C. atrox* (gi: 82216950; gi: 1708301, respectivamente); Mt-d de *A. halys brevicaudus* (gi: 82223367) e HR2a de *T. flavoviridis* (gi: 50403719).

3.12. Caracterização Biológica.

3.12.1. Atividade hemorrágica e dose hemorrágica mínima da fração BmHF-1.

A figura 18-a mostra a atividade hemorrágica do veneno total, da fração 1, obtida no primeiro passo cromatográfico de exclusão molecular, e da fração BmHF-1. Observa-se que a atividade hemorrágica é mantida durante os passos de purificação fração. A figura 18-b mostra o cálculo da Dose Hemorrágica Mínima (DHM) para a fração BmHF-1 sendo de 41.14 μg .

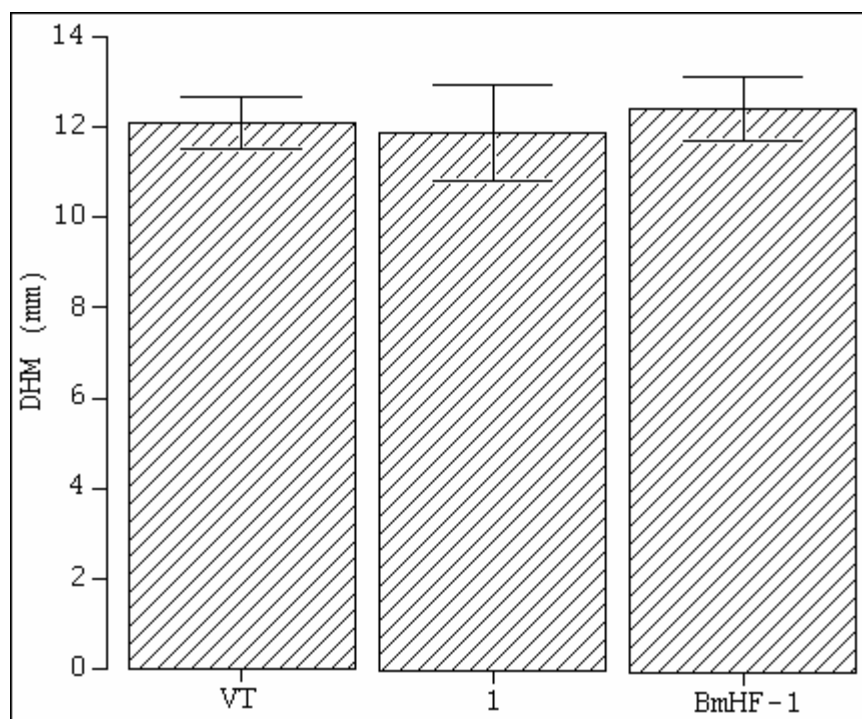


Figura 18-a. Atividade hemorrágica do veneno bruto de *B. marajoensis* (VT), fração 1 (cromatografia em LC, coluna Superdex G-75) e da metaloprotease BmHF-1. 20 μg das amostras foram dissolvidas no PBS (100 μL , pH 7.4) e injetadas, via i.d., nas costas de camundongos (18-20 g). Após duas horas os camundongos foram sacrificados e as peles retiradas, a atividade hemorrágica foi quantificada através da medida dos diâmetros dos halos hemorrágicos. Os resultados são expressos pela média e a \pm SD ($n = 4$).

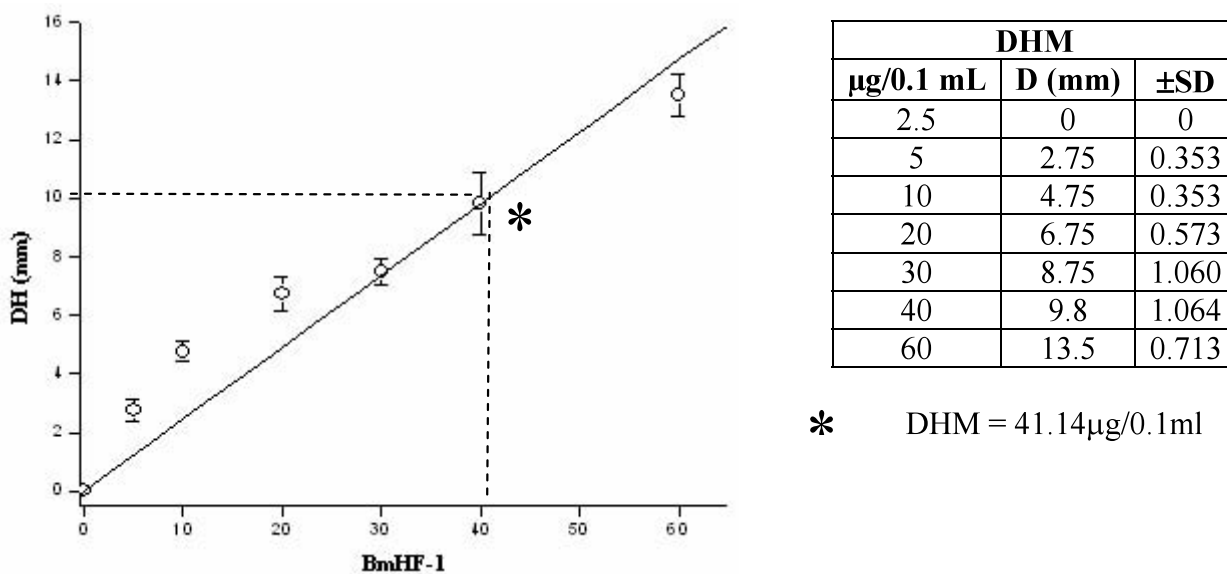


Figura 18-b. Determinação da dose hemorrágica mínima (DHM) da metaloprotease BmHF-1. Diferentes concentrações (2.5; 5; 10; 20; 30; 40; 60 µg) da enzima foram injetados, via i.d., nas costas de camundongos (18-20 g). A hemorragia foi quantificada através da medida dos halos hemorrágicos. A DHM é a quantidade de toxina capaz de produzir um halo hemorrágico de 10 mm; BmHF-1 apresenta DHM de 41.14 µg ($r = 0.97853$). Os resultados são expressos pela média \pm SD ($n = 4$). *Dose Hemorrágica mínima

3.12.2. Atividade Edematogênica da Fração BmHF-1.

A figura 19 mostra que a fração BmHF-1 apresenta atividade edematogênica quando foi injetada via intradérmica na região plantar da pata de camundongos; no mesmo experimento pode-se observar que a atividade edematogênica de BmHF-1 é dependente da concentração, já que conforme aumenta a concentração da metaloprotease, a atividade aumenta.

A quantidade mínima da fração BmHF-1 que produz edema maior ao 30 % é de 10.276 μg ($r = 0.97003$), o qual foi determinado após uma hora da aplicação da toxina BmHF-1. Dos dados obtidos, a atividade edematogênica de BmHF-1 apresenta um comportamento dependente do tempo, especialmente nas doses de 10 e 20 μg . Pode-se observar que nestas doses o efeito é prolongado até 6 horas após a aplicação. A atividade edematogênica diminui após 6 horas, às 12 horas depois da aplicação BmHF-1 não se observa edema.

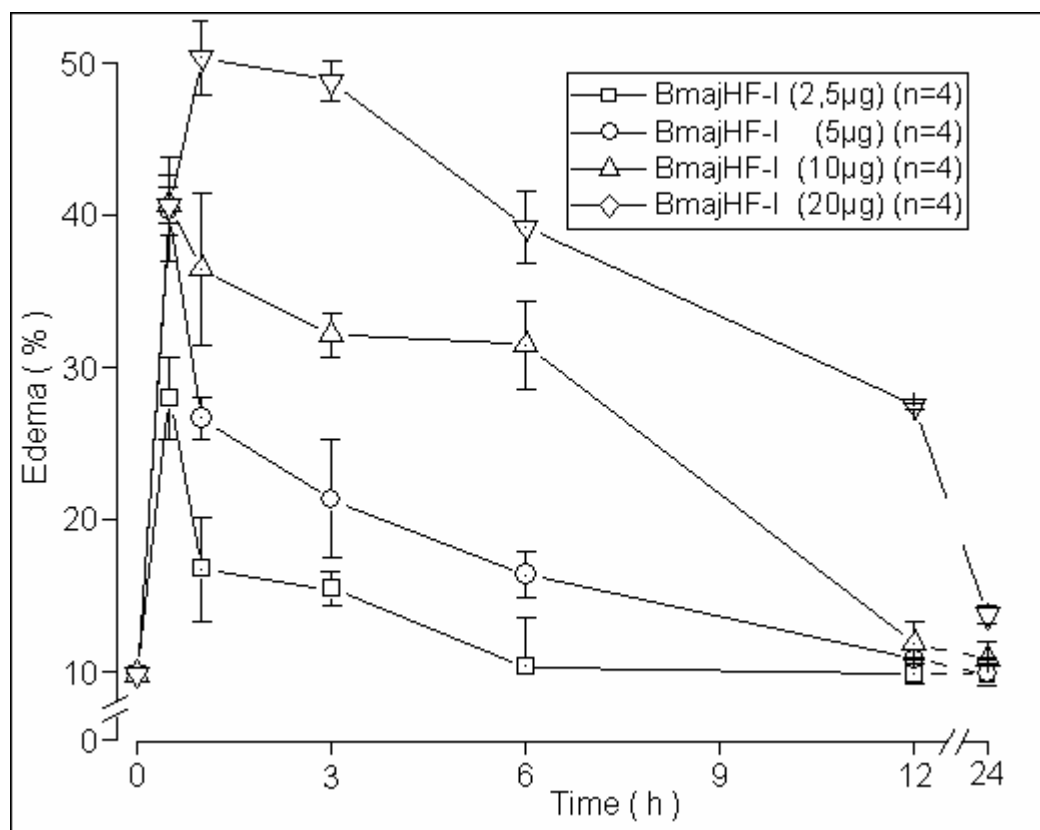


Figura 19. Atividade edematogênica da metaloprotease BMHF-1. Diferentes doses de BmHF-1 (2.5, 5, 10, 20 μg) foram injetadas na região plantar da pata direita de camundongos (18-20 g). O aumento da área da pata foi avaliado após 0.5; 1; 3; 6; 12 e 24 horas com um paquímetro e os resultados expressos em porcentagem de edema em relação com o branco (PBS na região plantar da pata direita). Os resultados são expressos pela média e $\pm\text{SD}$ (n=4).

3.12.3. Efeito sobre a agregação plaquetária da metaloprotease BmHF-1.

A figura 20 mostra que a doses pequenas da enzima BmHF-1 (3 μ g) atua como agonista da agregação de plaquetas quando é incubada com o PRP. O gráfico 20 mostra também que a atividade agonista da enzima BmHF-1 depende da atividade catalítica da enzima, já que sua incubação com o agente quelante EDTA inibe a indução da agregação das plaquetas pela enzima.

Foi usada trombina humana (0.01 U/mL) como controle positivo da agregação das plaquetas. Na figura 20 mostra que o efeito sobre a agregação das plaquetas da metaloprotease BmHF-1 é comparável com o efeito da trombina humana.

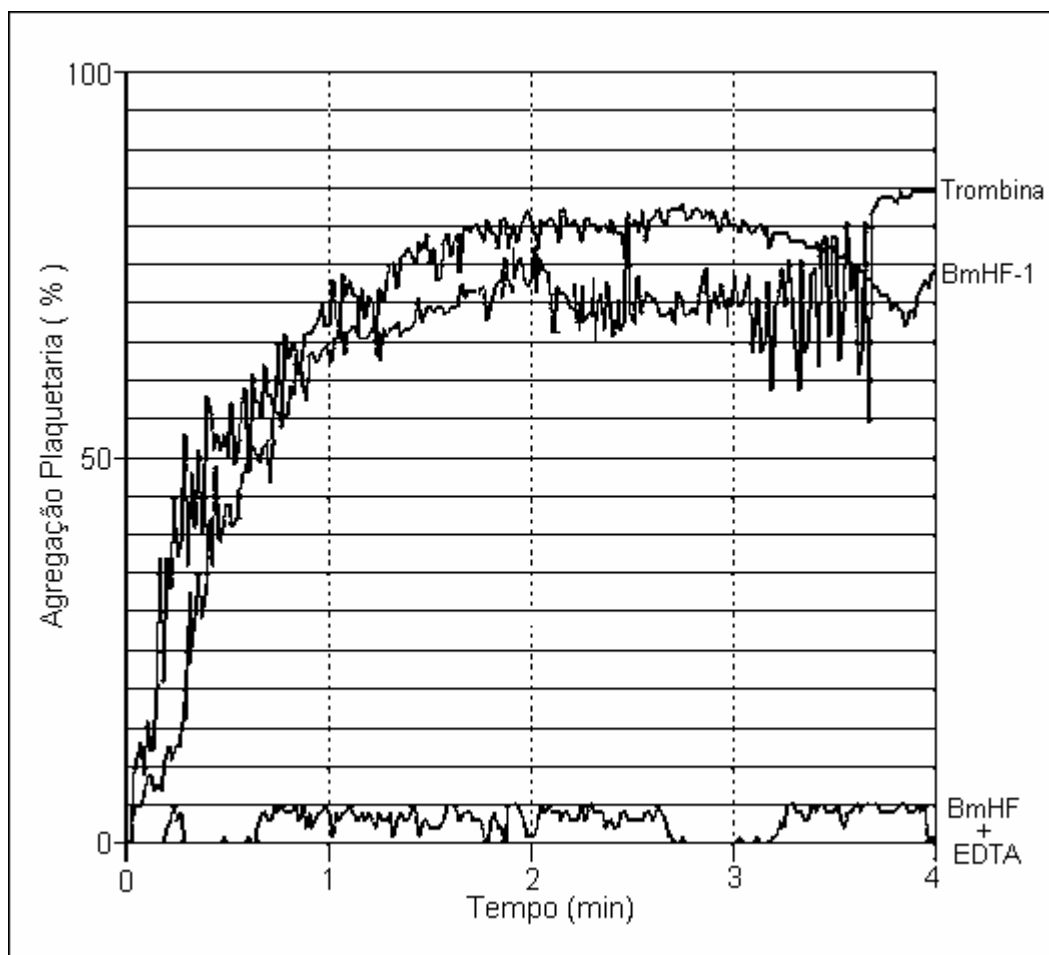


Figura20. Efeito da metaloprotease BmHF-1 sobre a agregação das plaquetas. Foram incubados 500 μ L de PRP e 3 μ L da enzima BmHF-1 durante 5 minutos a 37 °C. Logo após de este tempo foi feita a medição da agregação das plaquetas durante 4 minutos. A metaloprotease BmHF-1 é feita a pré-incubação com EDTA (5mM) por 15 minutos a 37 °C, logo o experimento foi feito de acordo com o descrito linhas acima. O gráfico mostra a porcentagem de agregação.

3. DISCUSSÃO

Os acidentes ofídicos com espécies da família *Viperidae* (subfamília *Viperinae* e *Crotalinae*) estão caracterizados por apresentar principalmente síndrome hemorrágica, além de outras manifestações patológicas como: necrose local, formação de bolhas e edema, assim como efeitos sistêmicos como: coagulopatias, nefrotoxicidade, alterações hemodinâmicas, neurotoxicidade e cardiotoxicidade (Gutierrez et al., 2005).

Este trabalho teve como objetivo avaliar algumas características funcionais e estruturais de uma fração com atividade metaloprotease isolada e purificada a partir do veneno de *Bothrops marajoensis*. O estudo sobre a purificação dos princípios ativos hemorrágicos dos venenos de serpentes iniciou-se em 1960 com a caracterização de duas frações hemorrágicas do veneno de serpente *Trimesurus flavoviridis* (Ohsaka et al., 1960).

Na literatura podem-se encontrar diversas estratégias de purificação para as metaloproteases de veneno de serpentes (SVMP), as quais combinam a cromatografia convencional e a de alta eficiência, além de explorar as diversas características estruturais presentes na molécula de SVMP. Estas características podem estar relacionadas à massa molecular, ao ponto isoelétrico (pI), à hidrofobicidade, à glicosilação, dentre outros fatores (Ibrahim-Granet & Bertrand, 1996; Peichoto et al, 2007; Stroka et al 2005).

No presente trabalho foi utilizada uma coluna Superdex G-75 de Exclusão Molecular acoplada a um sistema de HPLC como primeiro passo de purificação (Figura 6). Sabe-se que as metaloproteases de veneno de serpentes são classificadas segundo o seu tamanho molecular, devido à adição de domínios no extremo C-terminal das proteínas (desintegrin-like e cystein-rich). A adição de domínios aumenta a massa molecular, a qual faz com que os quatro grupos presentes na classificação atual, P-I: domínio metaloprotease, P-II: domínio metaloprotease mais domínio desintegrin-like, P-III: domínios metaloprotease/desintegrin-like/cystein-rich e P-IV: domínios metaloprotease/desintegrin-like/cystein-rich/lectin-like, apresentem, em geral, uma faixa de massas moleculares definidas (Bjárnason & Fox, 1995; Fox & Serrano, 2005; Takahashi & Mashiko, 1998). Sob este critério e à maior seletividade da resina Superdex G-75, a utilização desta coluna poderia sugerir, no perfil cromatográfico que corresponde ao perfil da massa molecular, a possível presença ou ausência das diferentes classes de SVMP, ajudando no planejamento posterior para o estudo desta família de proteínas.

Além disso, o uso da cromatografia de exclusão molecular como ferramenta capaz de permitir inferir tendências na composição dos venenos de serpente, como foi demonstrada por Graham et al. (2008). Os pesquisadores encontraram padrões gerais no veneno das famílias *Elapidae* e *Viperidae*; os quais concordam, de modo geral, com a ação do veneno. Os membros da família *Elapidae* apresentam venenos que são, geralmente, neurotóxicos; no outro lado, os membros da família *Viperidae* possuem venenos hemotóxicos. As tendências obtidas permitiram-lhes classificar de forma geral os venenos destas famílias como neurotóxico e hemotóxico, respectivamente.

Na literatura, também foi descrito que as SVMP apresentam variações na polaridade de sua superfície (Ramos & Selistre-de-Araujo, 2004), características que podem ser exploradas mediante o uso da cromatografia de Fase Reversa. A fração, isolada em cromatografia de exclusão molecular (figura 6), é purificada em um sistema de HPLC de fase reversa (Figura 7), nomeada BmHF-I possui um tempo de retenção de 38 ± 1.5 s e foi eluída em uma concentração de 68% do tampão B.

A utilização dos critérios de massa molecular e de hidrofobicidade, das metaloproteases de veneno de serpente (SVMP) permitiu-nos elaborar uma estratégia de combinação de dois passos cromatográficos, baseados em Exclusão Molecular e de HPLC em fase reversa, usados no presente trabalho, o que permitiu a purificação da metaloprotease BmHF-1, cujo grau de pureza foi confirmado pela cromatografia em HPLC de Fase reversa (figura 8). BmHF-1 é uma metaloprotease de baixa massa molecular (27162.36 Da), formada por uma cadeia polipeptídica. Estas observações são confirmadas pela espectrometria de massa MALDI-Tof (figura 9).

Na literatura, a avaliação da atividade proteolítica de venenos de serpentes, das frações isoladas e das toxinas purificadas tem sido feita pelo uso do substrato protéico caseína (Lomonte & Gutierrez, 1983) e seus derivados, como a azocaseína (Charney & Tomarelli, 1947; Wang & Huang, 2002) ou a N'N' dimetilcaseína (Lin et al, 1969; Sanchez et al, 2003). A padronização no uso de substratos para a avaliação da atividade proteolítica de outras SVMP, de diferentes espécies de serpentes, poderia ser comparada, o que permitiria estabelecer uma relação entre a afinidade pelos substratos naturais das SVMP e a sua atividade biológica.

Sabe-se que a caseína é um substrato protéico não específico e que as duas classes de proteases presentes no veneno de serpente (Metaloprotease e Serinoproteases) podem agir

cataliticamente sobre ela. A discriminação entre as duas classes de proteases é feita pela utilização de inibidores sintéticos ou protéicos (Cominetti, 2007). A figura 13 mostra os resultados quando a BmHF-1 é pré-incubada com os quelantes EDTA e EGTA, o inibidor de serinoproteases PMSF e o inibidor tipo Kunitz purificado da soja SBT-I. Observa-se que a atividade caseinolítica residual de BmHF-1 foi diminuída significativamente pelos quelantes EDTA (2,6%) e EGTA (1,3%), no entanto, os inibidores PMSF e SBT-I não tiveram efeito significativo algum na atividade proteolítica residual de BmHF-1, o que sugere que esta toxina isolada do veneno total de *B. marajoensis* pertence à família das metaloproteases.

Alem do efeito de inibidores, foram avaliados os parâmetros cinéticos de temperatura e pH, os quais contribuem para a caracterização físico-química da metaloprotease BmHF-1. As figuras 14 e 15 apresentam resultados que mostram que a atividade proteolítica da BmHF-1 sobre a caseína possui uma temperatura ótima na faixa dos 30-40 °C e o pH ótimo na faixa de 7-8. Estes resultados são comparáveis a outras metaloproteases descritas na literatura (Bello et al, 2006; Berger et al, 2008; Gutierrez et al, 1995; Sanchez et al, 2007; Stroka et al, 2006) e mostram que a estabilidade estrutural e funcional das SVMP depende desses fatores. A estrutura das metaloproteases pode explicar parcialmente os resultados mostrados, dentre eles o número de pontes dissulfeto e as interações das estruturas secundárias poderiam tornar as metaloprotease susceptíveis à desnaturização pelo efeito das temperaturas maiores que 50°C (Jaenicke & Böhm, 1998). Como mostra a figura 14, não foi observada atividade significativa abaixo dos 30°C, e acima dos 50°C a atividade diminui drasticamente. No caso do pH, segundo Xu et al. (2004), os resultados apresentados na figura 15, a diminuição significativa da atividade catalítica em pH maiores de 10, podem ser parcialmente explicados devido ao efeito de precipitação do Zn (OH)₂ em pH alcalinos, o que sugeriria que o cofator Zn⁺², necessário para a atividade catalítica das SVMP, poderia precipitar em pH maiores a 10, o qual produziria a inativação da enzima.

O fibrinogênio é conhecido como um dos fatores importantes envolvidos no equilíbrio hemostático, participando na formação do coágulo, seja como precursor da fibrina ou ativando e unindo as plaquetas por meio da glicoproteína IIB/IIIa (Davie et al, 1991). As metaloproteases de veneno de serpente apresentam atividade proteolítica sobre o fibrinogênio, hidrolisando com maior eficiência a cadeia α que a cadeia β do fibrinogênio (Swenson & Markland Jr, 2005). A maioria das metaloproteases de baixa massa molecular caracterizadas a

partir do veneno de espécies do gênero *Bothrops* apresentam atividades α -fibrinogênicas: BaP1 (*B. alternatus*, Baldo et al, 2008), Leu-a (*B. leucurus*, Bello et al, 2006), Bothrojaractivase (*B. jararaca*, Berger et al, 2008), BmooMPa-I (*B. moojeni*, Bernardes et al, 2008), Neuwiedase (*B. neuwiedi*, Rodriguez et al, 2001).

Já no presente estudo a metaloprotease BmHF-1 isolada degrada rápida e completamente a cadeia α do fibrinogênio, mas não apresenta atividade alguma frente às cadeias β e γ (Figura 11). Estes dados nos permitem classificar a BmHF-1 como protease de tipo α -fibrinogênica segundo a classificação de Swenson & Markland (2005).

O uso de outro tipo de substratos, como o substrato cromogênico DL-BAPNA, pode dar informações importantes sobre as características da arquitetura das metaloproteases de veneno de serpente. O DL-BAPNA apresenta o sítio de corte entre o aminoácido básico arginina e a *p*-nitroanilina (cromóforo). Devido à polaridade da arginina, as SVMP's não apresentam atividade sobre este substrato, o que é confirmado por inúmeros trabalhos (Bello et al, 2006; Datta et al, 1995; Gutierrez et al, 1995; Jagadeesha et al, 2002; Omori-Sato et al, 1995). As metaloproteases de veneno de serpente de qualquer classe carecem de atividade sobre substratos sintéticos derivados da arginina devido à arquitetura do sítio ativo das metaloproteases (Stöcker & Bode, 1995). A arquitetura do sítio ativo das metaloproteases de veneno de serpentes apresenta preferência por substratos de caráter hidrofóbico e com menor polaridade (Chen et al, 2008). A BmHF-1 não apresenta atividade sobre o substrato BAPNA, como é mostrado na figura 12, o que sugere que o sítio ativo da BmHF-1 apresenta sua arquitetura semelhante às descritas na literatura, o que corrobora a sua natureza metaloprotease.

Além de substratos, o uso de inibidores naturais presentes no sangue de serpentes e de mamíferos, também, pode dar informações valiosas acerca da arquitetura das SVMP. A figura 16 mostra o efeito inibitório, significativo, produzido pelo soro e os fatores DA2-I e DA2-II isolados do soro de *D. albiventris* (gambá-de-orelha-branca; Farah et al, 1996) sobre a atividade proteolítica da toxina BmHF-1. Os dados obtidos (figura 16) estão de acordo com os resultados apresentados por Farah et al, (1996); no caso do fator DA2-I, ele não apresenta atividade de inibição nos efeitos hemorrágicos e proteolíticos do veneno de *B. jararaca*. Este fenômeno pode ser explicado pelo modo de ação dos inibidores naturais isolados do soro de animais resistentes aos venenos de serpentes os quais se ligam às proteases formando complexos não

covalentes (Neves-Ferreira et al, 2002). É possível que a metaloprotease isolada BmHF-1 possua características próprias na sua arquitetura (estrutura terciária) que sejam diferentes das apresentadas pelas metaloproteases de *B. jararaca*, como a Bothrojaractivase (Berger et al, 2008). Estas características diferenciadas permitiriam a formação de complexos com os fatores do soro de *D. albiventris* e podem estar relacionadas com as atividades biológicas observadas para nossa proteína. Esta hipótese é sugerida pelo fato de que a metaloprotease BmHF-1 não apresentou homologia estrutural com metaloproteases isoladas do veneno de *B jararaca* (figura 17).

O primeiro dado que mostra a tabela de composição de aminoácidos (Tabela 1), a massa molecular calculada da BmHF-1 é de 25 968,77 Da, que, em comparação, com a massa molecular determinada pela espectrometria de massas MALDI-Tof, (27162,36 Da), existe uma diferença de massa que pode corresponder à glicosilações na nossa proteína. Na literatura pode-se observar que um número significativo de metaloproteases possuem um ou vários sítios de glicosilação e que estes sítios podem estar relacionados com a potência hemorrágica da metaloprotease segundo a posição de estas glicosilações no domínio metaloprotease (Chen et al, 2008; Ramos & Selistre de Araújo, 2004).

Por outro lado, pela composição de aminoácidos (Tabela 1) pode-se sugerir algumas outras características estruturais da BmHF-1. Esta enzima possui, na sua composição, aminoácidos básicos e ácidos os quais conferem o caráter ácido ou básico desta enzima. No cálculo final, o número total de aminoácidos ácidos (25,11% do total) é maior que os aminoácidos básicos (12,18% do total), sugerindo que a BmHF-1 apresenta um caráter ácido. Tsai et al. (2000) propuseram dividir as SVMP da classe P-I em três subclasses, baseados na construção de uma árvore filogenética usando a sequência do domínio metaloprotease de 30 SVMP da classe P-I. As subclasses propostas foram: hemorraginas ácidas (AH), hemorraginas básicas (BH) e fibrinogenases (F). Segundo esta classificação, a BmHF-1 pertenceria à classe AH pelo fato de apresentar um caráter ácido, mas a atividade hemorrágica que possui não concorda com a atividade mostrada por representantes deste grupo, como a DaH1 (*Deinagkistrodon acutus*; Dose Hemorrágica Mínima, DHM = 0,1 µg). A aparente contradição não se apresenta só com a BmHF-1, outras metaloprotease não hemorrágicas de caráter ácido foram agrupadas na subclasse BH (fibrolase, *Agkistrodon c. contotrix*), evidenciando que o fato

só do caráter ácido ou básico das toxinas não é critério suficiente para a classificação proposta (Ramos & Selistre-de-Araujo, 2004; Tsai et al. 2000).

Outra característica que mostra a tabela de composição de aminoácidos (tabela 1) é que a BmHF-1 apresenta 6 resíduos de cisteína, sugerindo a possível formação de 3 pontes dissulfeto na estrutura terciária, mas nas SVMP's da classe P-I não apresentam padrões definidos de pontes dissulfeto; devido a possuírem um número variável de resíduos de cisteína, em consequência são observados padrões alternativos de pontes dissulfeto e, portanto, diferentes estruturas terciárias (Fox & Serrano, 2005).

A seqüência N-terminal mostra a presença de um resíduo cisteína (Cys posição 2; figura 17) no início da seqüência de BmHF-1. Os resíduos de cisteína responsáveis pela formação de pontes dissulfeto nas SVMP da classe P-I (hemorrágicas e não hemorrágicas) apresentam-se, na maioria delas, na região perto do motivo metaloprotease (Fox & Serrano, 2005), o que sugere que este resíduo de cisteína (Cys posição 2; figura 15) não estaria envolvido na formação das pontes dissulfeto. Algumas SVMP da classe P-I apresentam estes resíduos de cisteína “solitários” como a Trimerelysin II (*Trimeresurus flavoviridis*) e a Acutolysin A (*Agkistrodon acutus*).

O estudo de homologia seqüencial da BmHF-1 foi feito com as seqüências de Atrolysin b de *C. atrox* (gi: 82216949); Contorstratin de *A. contortrix contortrix* (gi: 48428162); Piscivostatin de *A. piscivorus piscivorus* (gi: 50400453); HT2 de (gi: 462318); Atroxase de *C. atrox* (gi: 172045825); Atrolysin c e Atrolysin d de *C. atrox* (gi: 82216950; gi: 1708301, respectivamente); Mt-d de *A. halys brevicaudus* (gi: 82223367) e HR2a de *T. flavoviridis* (gi: 50403719).

A BmHF-1 compartilha homologia seqüencial com alta identidade com a Atrolysin b (75%), a qual é uma SVMP hemorrágica (DHM = 3 µg) da classe P-I isolada do veneno de *C. atrox*; o fato de que a BmHF-1 apresente uma alta identidade com uma SVMP hemorrágica mostra a complexidade dentro deste grupo de toxinas.

Também a BmHF-1 (figura.17) mostra homologia seqüencial com os domínios metaloproteases das desintegrinas Contorstratin isolada do veneno de *A. contortrix contortrix* e a PVS-β (Piscivostatin) isolada do veneno de *A. piscivorus piscivorus*, os quais apresentam uma identidade de 72,5% em ambos os casos. A Contorstratin (Zhou et al, 2000) e a PVS-β (Okuda et al, 2002) são desintegrinas diméricas contidas numa seqüência de nucleotídeos que

codifica o domínio metaloprotease e desintegrin-like, designada como N-II (Bjarnason & Fox, 1994). As SVMP da classe P-II são consideradas precursores das desintegrinas presentes nos venenos de serpente; algumas possuem só o domínio metaloprotease e desintegrin-like, como é o exemplo da Jerdonitin isolada a partir do veneno bruto de *Bothrops jerdonii* (Chen et al, 2003).

Está descrito na literatura que a maioria das SVMP P-II é produzida como zimogênios, os quais liberam, por proteólise, o domínio metaloprotease e o domínio desintegrin-like, como a Atrolysin E purificada do veneno total de *Crotalus atrox* (Hite et al. 1994). Estes dados poderiam sugerir que a BmHF-1 seja produto da proteólise (ativação) de um zimogênio que contém um domínio desintegrin.-

Entretanto, a inspeção detalhada da seqüência N-terminal da metaloprotease BmHF-I oferece informações que permitem maior segurança na sua classificação. Os resíduos Arg posição 17 – Tyr posição 18 e Val posição 44 – His posição 45 (figura 17) são altamente conservados nas SVMP classe P-I (Ramos & Selistre de Araújo, 2004), além disso, sete das dez seqüências (Atrolysin b, HT-2, Atroxase, Atrolysin c, Atrolysin d, Mt-d, HR2a) que usamos no estudo da homologia seqüencial pertencem à classe P-I. Estas informações, junto com as extraídas da composição de aminoácidos, sugerem fortemente que a BmHF-1 pertence à subclasse das P-1 das SVMP's.

Na literatura é descrito que as metaloproteases de veneno de serpente são as responsáveis da atividade hemorrágica, que é um dos principais efeitos farmacológicos dos venenos das espécies pertencentes à família Viperidae (Bjarnason & Fox, 1994; Gutierrez & Rucavado, 2000). A BmHF-1 isolada do veneno total de *B. marajoensis* responde pela atividade hemorrágica do veneno total, como pode observar-se na Figura 18a. Esta afirmação têm concordância com o fato de que a Dose Hemorrágica Mínima (DHM) da BmHF-1 (figura 18b) é similar à calculada para o veneno total. A DHM obtida para a metaloprotease BmHF-1 foi de 41.14 µg, permitindo classificar a metaloprotease como não hemorrágica de acordo com a classificação descrita na literatura (Bjarnason & Fox, 1994; Gutierrez & Rucavado, 2000; Selistre de Araújo, 2007).

O fato de a BmHF-1 apresentar a dose hemorrágica mínima de 41,14 µg (figura 18b), a qual é classificada como não hemorrágica (Selistre de Araújo, 2007), e baixa massa molecular

(27162.36 Da, figura 9), concorda com as características das metaloprotease estudadas da classe P-I (Gutierrez & Rucavado, 2000; Hati et al, 1999; Takahashi & Mashiko, 1998).

Na literatura podem-se encontrar exceções de metaloprotease de veneno de serpente classe P-I, que possuem atividade hemorrágica significativa, como a Atrolysin B, com dose hemorrágica mínima menor a 10 µg (Hite et al, 1994); mas a maioria das metaloproteases da classe P-I possuem baixa atividade hemorrágica, só apresentando a síndrome hemorrágica em doses maiores a 10 µg (Gutierrez et al, 2005; Selistre de Araújo, 2007).

Independentemente da potência hemorrágica apresentada pelas SVMP, a atividade hemorrágica destas toxinas está associada à sua atividade proteolítica, e a adição dos domínios nas classes P-II (domínio metaloprotease e domínio desintegrina) e P-III (domínios metaloprotease -"desintegrin-like"- "cystein-Rich") aumenta a potencia de sua atividade hemorrágica (Bjarnason & Fox, 1994; Fox & Serrano, 2005; Gutierrez & Rucavado, 2000; Hati et al, 1999).

Nos últimos anos, foram descritas SVMP's que participam nos processos inflamatórios apresentados nos acidentes ofídicos, especialmente os produzidos pela família Viperidae (Texeira et al, 2005). As SVMP's estão envolvidas na formação de edemas, bolhas, liberação de citokinas inflamatórias e recrutamento de neutrófilos (Gutierrez & Rucavado, 2000). Os processos inflamatórios da SVMP's estão relacionados à sua atividade catalítica do domínio metaloprotease. A diferença da atividade hemorrágica, as adições dos domínios Desintegrin-like e Cystein-rich não aumentam a atividade inflamatória das SVMP (Gutierrez & Rucavado, 2000; Texeira et al, 2005).

As SVMP não hemorrágicas da classe P-I, como BaP1 de *Bothrops atrox* (Rucavado et al, 1995; Fernandez et al, 2006), LHF-II de *Lachesis muta* (Rucavado et al, 1999) e Leucorolysin-a de *Bothrops leucurus* (Gremsky et al, 2007) produzem edema e outros efeitos inflamatórios em doses nas quais não foi observada atividade hemorrágica. A incubação destas metaloproteases com quelantes como EDTA inibem os efeitos inflamatórios, como a liberação de citokinas IL-1β, IL-6 e TNF-γ, o qual apóia a hipótese de que a atividade proteolítica está relacionada ao efeito inflamatório (Fernandez et al, 2007).

Os dados, apresentados na figura 19, sugerem que a metaloprotease BmHF-1 possui atividade edematogênica que se estende até 6 horas, após ser injetado na região plantar de camundongos nas doses de 10 e 20 µg. O comportamento edematogênico de BmHF-1

demonstrado é consistente com a determinação de sua dose mínima edematogênica de 10,27 µg; com doses menores a sua dose edematogênica mínima a BmHF-1 não produz edema, significativamente ($p < 0,05$). Aos 30 minutos após a injeção da toxina, observa-se que a dose de 5 µg produz um edema de 40%, mas após 1 hora o efeito edematogênico é menor que 30% e continua descendendo ao longo do tempo; o que sugere que a BmHF-1 pode participar no efeito inflamatório produzido pelo veneno total de *B. marajoensis*, o qual é um efeito característico dos venenos botrópicos (Gutierrez & Rucavado, 2000; Ministério de Saúde, 2001).

Alem do efeito hemorrágico as metaloproteases de veneno de serpente apresentam variados efeitos sobre a hemóstase. Estes enzimas podem apresentar atividade procoagulante, ativando fatores da cascata de coagulação como os fatores V, VII e X (Kini et al, 2001b; Tans & Rosing, 2001) ou agindo como ativadores da protrombina (Lu et al, 2005; Kini et al, 2001a). Recentemente foi isolada a Cotiaractivase do veneno de *Bothrops cotiara* (Senis et al, 2006), metaloprotease da classe PI, que age como ativador da protrombina. As metaloproteases apresentam também atividade inibitória da cascata da coagulação e da agregação plaquetária (Andrews & Berndt, 2000; Du et al, 2006; Kini, 2006). Na literatura encontra-se exemplos como a BjussuMP-II isolada do veneno de *B. jararacussu* (Marcusi et al, 2007) que inibe a agregação plaquetária mediada pelo colágeno e o ADP.

A figura 20 mostra que a metaloprotease BmHF-1 age como um agonista da agregação plaquetária, quando foi incubada com o plasma rico em plaquetas (PRP) e que este efeito é dependente da sua atividade proteolítica, já que o a pré-incubação da enzima com EDTA inibe a sua atividade agonista. Além disso, o efeito da agregação da BmHF-I é similar ao exercido pela trombina, a qual foi usada como controle positivo (figura 18).

Os dados obtidos nos sugerem que a metaloprotease BmHF-1 é um agonista da agregação plaquetária. Como foi mencionado, as metaloproteases da classe P-I podem exercer efeitos agonistas da agregação plaquetária, pela ativação direta da protrombina, como no caso Bothrojaractivase (Berger et al., 2008); esta metaloprotease, mesmo apresentando atividade fibrinogênolítica, atua como uma potente enzima procoagulante por um mecanismo similar ao apresentado pelos ativadores da classe A da protrombina. Esses dados sugerem que a BmHF-1 pode ativar diretamente a protrombina por um mecanismo similar ao descrito para a Bothrojaractivase, devido ao seu efeito agonista estar relacionada à atividade proteolítica.

Na literatura o veneno de *B. marajoensis* é descrito como um potente ativador do fator X da cascata de coagulação (Tans & Rosing, 2001), o que nos induz a especular que a BmHF-1 possa estar envolvida neste fenômeno, já que o fator X ativado ativa ao fator V, e este fator V ativado age como ativador da protrombina, gerando trombina (Davie et al, 1991), produzindo a agregação plaquetária, como a observada em nossos resultados (figura20), e apresenta um comportamento similar à trombina.

As características biológicas da BmHF-1 como a menor atividade hemorrágica (DHM = 41.14 µg) e sua capacidade de produzir agregação plaquetária em doses de 3 µg fazem dela um possível modelo biológico para o desenvolvimento de drogas que atuem ativando a cascata de coagulação ou como método de avaliação da atividade de fatores da coagulação.

5. CONCLUSÕES

Nossas pesquisas utilizando metodologias otimizadas de purificação em HPLC de exclusão molecular e de fase reversa permitiram purificar uma nova toxina a partir do veneno total de *Bothrops marajoensis*, a fração BmHF-1; com um alto grau de pureza e homogeneidade molecular e sem perda da atividade biológica, apresentado uma massa molecular de 27 162,36 Da obtida pela espectrometria de massas MALDI-Tof.

A BmHF-1 possui atividade proteolítica sobre a caseína e apresenta atividade caseinolítica ótima em pH de 7,0 e 8,0, sendo inativa em temperaturas maiores a 50°C. A atividade caseinolítica da BmHF-1 é inibida pelos quelantes EDTA e EGTA e não pelo inibidor sintético PMSF e o SBTI, confirmando que a BmHF-1 é uma metaloprotease.

A metaloprotease isolada foi ativa preferencialmente sobre a cadeia α do fibrinogênio, sendo uma protease α -fibrinogênolítica, e não possui atividade arginina amidase através do substrato BApNA.

O efeito inibidor da atividade caseinolítica do soro e dos fatores anti-hemorrágicos DA2I e DA2II de *Didelphis albiventris* sobre a BmHF-1 mostram a existência de diferenças estruturais importantes com metaloproteases encontradas no veneno de *Bothrops jararaca*, o qual mostra o potencial uso deste tipo de inibidores como ferramentas no estudos estrutural das metaloproteases.

A metaloprotease BmHF-1 isolada possui efeito hemorrágico fraco, apresenta ação edematogênica dose dependente. Além disso, a BmHF-1 apresentou-se como um agonista da agregação plaquetária ao promover a formação de coágulo no plasma rico em plaquetas (PRP).

A BmHF-1 é uma metaloprotease de caráter ácido, com 6 resíduos de cisteína e, pelo alinhamento múltiplo da seqüência N-terminal desta metaloprotease, possui homologia seqüencial com metaloproteases da classe P-I de diferentes espécies de serpentes. Assim, de acordo com a massa molecular, características estruturais encontradas e propriedades

biológicas, concluímos que a BmHF-1 pertence às metaloproteases de veneno de serpente (SVMP) da classe P-I .

Este trabalho apresentou resultados originais, os quais possibilitam compreender as SVMP da classe P-I quanto às características funcionais e estruturais, e também os princípios para estabelecer uma relação entre a estrutura e função das SVMP do veneno de serpentes com metaloproteases que regulam várias funções biológicas.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Andrews, R. K; Berndt, M. C. (2000). Snake venom modulators of platelet adhesion receptors and their ligands. *Toxicon*. Vol.38: pags775-791.
- Assakura, M. T; Reichl, A. P; Asperti, M. C. A; Mandelbaum, F. R. (1985). Isolation of the major proteolytic enzyme from the venom of the snake *Bothrops moojeni* (caissaca). *Toxicon*. Vol. 23(2): pags341-345.
- Assakura, M. T; Reichl, A. P; Mandelbaum, F. R. (1986). Comparison of immunological, biochemical and biophysical properties of three hemorrhagic factors isolated from the venom of *Bothrops jararaca* (jararaca)
- Baldo, C; Tanjoni, I; León, I. R; Batista, I. F. C; Della-Casa, M. S; Clissa, P. B; Weinlich, R; Lopes-Ferreira, M; Lebrun, I; Amarante-Mendes, G. P; Rodrigues, V. M; Perales, J; Valente, R. H; Moura-da-Silva, A. M. (2008). BnP1, a novel P-I metalloproteinase from *Bothrops neuwiedi* venom: Biological effects benchmarking relatively to jararhagin, a P-III SVMP. *Toxicon*, Vol. 51(1): pages 54-65.
- Bello, C.A; Hermogenes, A. L. N; Magalhaes, A; Veiga, S. S; Gremski, L. H; Richardson, M; Eladio F. Sanchez, E. F. (2008). Isolation and biochemical characterization of a fibrinolytic proteinase from *Bothrops leucurus* (white-tailed jararaca) snake venom. *Biochimie*. Vol. 88: pags189–200.
- Berger, M; Pinto, A. F. M; Guimarães, J. A. (2008). Purification and functional characterization of bothrojaractivase, a prothrombin-activating metalloproteinase isolated from *Bothrops jararaca* snake venom. *Toxicon*. Vol. 51: pags488-501.
- Bernardes, C. P; Santos-Filho, N. A; Costa, T. R; Gomes, M. S. R; Torres, F. S; Costa, J; Borges, M. H; Richardson, M; dos Santos, D. M; de Castro Pimenta, A. M; Homs-Brandeburgo, M. I; M. Soares, A. M; de Oliveira, F. Isolation and structural characterization of a new fibrin(ogen)olytic metalloproteinase from *Bothrops moojeni* snake venom. *Toxicon*. Vol. 51: pags574–584.
- Björnason, J. B. and Fox, J. W. (1994). Hemorrhagic metalloproteinases from snake venoms. *Pharmacology and Therapeutics*. Vol. 62(3): pags325-372.
- Bidlingmeyer, B. A; Cohen, S. A. and Tarvin, T. L. (1984), Rapid analysis of amino acids using pre-column derivatization. *Journal of Chromatographic*. Vol. 33: pags93-104.
- Braud, S; Bon, C; Wisne, A. (2000). Snake venom proteins acting on hemostasis. *Biochimie*. Vol. 82: pags851–859.
- Castro H. C; Zingali, R. B; Albuquerque, M. C; Pujol-Luz, M. and Rodrigues, C. R. (2004). Snake venom thrombin-like enzymes: from reptilase to now. *Cellular and Molecular Life Sciences*. Vol. 61: pags843-856.

- Cazenave, J. P; Ohlmann, P; Cassel, D; Eckly, A; Hechler, B and Gachet, C. (2004). Preparation of washed platelets suspensions from human and rodent blood. Platelets and Megakaryocytes. Methods in Molecular Biology. Vol. 272. Human Press Inc. Totowa. Nueva Jersey. USA.
- Charney, J. and Tomarelli, R. M. (1947). A colorimetric method for the determination of the proteolytic activity of duodenal juice. The Journal of Biological Chemistry. Vol. 171: pags501-505.
- Chen, R. Q; Jin, Y; Wu, J. B; Zhou, X. D; Lu, Q. M; Wang, W. Y; Xiong, Y. L. (2003). A new protein structure of P-II class snake venom metalloproteinases: it comprises metalloproteinase and disintegrin domains. Biochemical and Biophysical Research Communications. Vol. 310: pags182–187.
- Chen, H-S; Tsai, H-Y; Wang, Y-M; Tsai, I-H. (2008). P-III hemorrhagic metalloproteinases from Russell's viper venom: Cloning, characterization, phylogenetic and functional site analyses. Biochimie. Vol. 90(10): pags1-13.
- Cominetti, M. R. (2007). Caracterização da atividade proteolítica de toxinas e uso de inibidores, in: Selistre de Araújo, H. S; Ferreira de Souza, D. H. (Eds.), Métodos em Toxinologia: toxinas de Serpentes. EdUFSCAR. São Carlos. Brazil. pags45-51.
- Datta, G; Dong, A; Witt, J. and Tu, A. T. (1995). Biochemical characterization of Basilase, a fibrinolytic enzyme from *Crotalus basiliscus basiliscus*. Archives of Biochemistry and Biophysics. Vol. 317(2): pags365-373.
- Davie, E. W; Fujikawa, K. and Kiesel, W. (1991). The Coagulation Cascade: Initiation, Maintenance and Regulation. Biochemistry. Vol. 30(43): pags10363-10370.
- Dennis, E.A. (2000). Phospholipase A₂ in eicosanoid generation. American Journal of Respiration and Critical Care Medicine. Vol. 161(2): S32-5.
- Du, X. Y; Clemetson, K. J. (2002). Snake venos L-amino acid oxidases. Toxicon. Vol. 40(6): pags659-665.
- Du, X-Y; Sim, D. S; Lee, W-H; Zhang, Y. (2006). Blood cells as targets of snake toxins. Blood Cells, Molecules, and Diseases. Vol.36: pags414–421.
- Erlanger B. F; Kokowsky, N; Cohen W. (1961).The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. Archives of Biochemistry and Biophysics. Vol. 95: pags271-8.
- Escalante, T; Shannon, J; M. Moura-da-Silva, A. M; Gutiérrez, J. M; Fox, J. W. (2006). Novel insights into capillary vessel basement membrane damage by snake venom hemorrhagic metalloproteinases: A biochemical and immunohistochemical study. Archives of Biochemistry and Biophysics. Vol. 455: pags144–153.

- Farah, M. F. L; One, M; Novello, J. C; Toyama, M. H; Perales, J; Moussatché, H; Domont, G. B; Oliveira, B; Marangoni, S. (1996). Isolation of protein factors from opossum (*Didelphis albiventris*) serum which protect against *Bothrops jararaca* venom. *Toxicon*, Vol. 34(9): pags1067-1071.
- Fernandes, C. M; Zamuner, S. R; Zuliani, J. P; Rucavado, A; Gutiérrez, J. M; Catarina de Fátima Pereira Teixeira. (2006). Inflammatory effects of BaP1 a metalloproteinase isolated from *Bothrops asper* snake venom: Leukocyte recruitment and release of cytokines. *Toxicon*. Vol. 47: pags549–559.
- Fernandes, C. M; de Fátima Pereira Teixeira, C; Leite, A. C. R. M; Gutiérrez, J. M. and Rocha, F. A. C. (2007). The snake venom metalloproteinase BaP1 induces joint hypernociception through TNF- α and PGE2-dependent mechanisms. *British Journal of Pharmacology*. Vol. 151: pags1254–1261.
- Fox, J. W; Serrano, S.M.T. (2005). Structural considerations of the snake venom metalloproteinases, key members of the M12 reprotolysin family of metalloproteinases. *Toxicon*. Vol. 45: pags969-985.
- Fry, B. G; Vidal, N; Norman, J. A; Vonk, F. J; Scheib, H; Ramjan, S. F. R; Kuruppu, S; Fung, K; Hedges, B; Richardson, M. K; Hodgson, W. C; Ignjatovic, V; Summerhayes, R. & Kochva, E. (2006). Early evolution of the venom system in lizards and snakes. *Nature*. Vol. 439: pags584-588.
- Gay, C. C; Leiva, L. C; Marunák, S; Teibler, P; Acosta de Pérez, O. (2005). Proteolytic, edematogenic and myotoxic activities of a hemorrhagic metalloproteinase isolated from *Bothrops alternatus* venom. *Toxicon*. Vol. 46: pags546–554.
- Graham, R. L. J; Graham, C; Theakston, D; McMullan, G; Shaw, C. (2008). Elucidation of trends within venom components from the snake families Elapidae and Viperidae using gel filtration chromatography. *Toxicon*. Vol. 51: pags121–129.
- Grams, F; Huber, R; Kress, L. F; Moroder, L; Bode, W. (1993). Activation of snake venom metalloproteinases by a cysteine switch-like mechanism. *FEBS Journal*. Vol. 335(1): pags76-80.
- Gremski, L.H; Chaim, O. M; Paludo, K. S; YSade, Y. B; Otuki, M. F; Richardson, M; Gremski, W; Sanchez, E. F; Veiga S. S. (2007) Cytotoxic, thrombolytic and edematogenic activities of leucurolysin-a, a metalloproteinase from *Bothrops leucurus* snake venom. *Toxicon*, Vol. 50(1): pags120-134.
- Gutiérrez, J. M; Gene, J. A; Rojas, G; Cerdas, L. (1985). Neutralization of proteolytic and hemorrhagic activities of Costa Rican snake venom by a polyvalent antivenom. *Toxicon*. Vol. 23: pags887-893.

- Gutierrez, J. M; Romero, M; Diaz, C; Borkow, G. and Ovadia, M. (1995). Isolation and characterization of a metalloproteinase with weak hemorrhagic activity from the venom of the snake *Bothrops asper* (terciopelo). *Toxicon*. Vol. 33(1): pags19-29.
- Gutiérrez, J. M; Rucavado, A. (2000). Snake venom metalloproteinases: Their role in the pathogenesis of local tissue damage. *Biochimie*. Vol. 82: pags841–850.
- Gutiérrez, J. M. (2002). Comprendiendo los venenos de serpientes: 50 años de investigaciones en América Latina. *Revista de Biología Tropical*. Vol. 50: pags377-394.
- Gutiérrez, J. M; Rucavado, A; Escalante, T; Diaz, C. (2005). Hemorrhage induced by snake venom metalloproteinases: biochemical and biophysical mechanisms involved in microvessel damage. *Toxicon*. Vol. 45: pags997–1011.
- Gutiérrez, J. M; Núñez, J; Escalante, T; Rucavado, A. (2006). Blood flow is required for rapid endothelial cell damage induced by a snake venom hemorrhagic metalloproteinase. *Microvascular Research*. Vol. 71: pags55 – 63.
- Hati, R; Mitra, P; Sarker, S. and Bhattacharyya, K. K. (1999). Snake Venom Hemorrhagins. *Critical Reviews in Toxicology*. Vol. 29(1): pags1–19.
- Heinrikson, R. L. & Meredith, S. C. (1984). Amino acid analysis by reverse phase high-performance liquid chromatography: precolumn derivatization with phenylthiocyanate. *Analytical Biochemistry* 13: p.65-72.
- Hite, L. A; Shannon, J. D; Björnason, J. B. and Fox, J. W. (1992). Sequence of a DNA clone encoding zinc metalloproteinase hemorrhagic toxin e from *Crotalus atrox*: evidence for signal, zymogen and desintegrin-like structures. *Biochemistry*. Vol. 31: pags6203-6211.
- Hite, L. A; Jia, L.G; Bjarnason, J. B. and Fox, J. W. (1994) cDNA sequences for four snake venom metalloproteinases: structure, classification, and their relationship to mammalian reproductive proteins. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. Vol. 308 (1): pags182-191.
- Ibrahim-Granet, O; Bertran, O. (1996). Separation of proteases: old and new approaches. *Journal of Chromatography B*, 684 (1996) 239-263
- Iwanaga S, Oshima G, Suzuki T. (1976). Proteinases from the venom of *Agkistrodon halys blomhoffi*. *Methods in Enzymology*. Vol. 45: pags459-68.
- Jaenicke, R. and Böhm, G. (1998). The stability of proteins in extreme environments. *Current Opinion in Structural Biology*. Vol. 8: pags738-748.
- Jagadeesha, D. K; Shashidharamurthy, R; Girish, K.S; Kemparaju, K. (2002). A non-toxic anticoagulant metalloprotease: purification and characterization from Indian cobra (*Naja naja naja*) venom. *Toxicon*. Vol. 40(6): pags667-675.

- Jia, L. G; Wang, X. M; Shannon, J. D; Bjarnason, J. B; Fox, J. W. 1997. Function of disintegrin-like/cysteine-rich domains of atrolysin A. Inhibition of platelet aggregation by recombinant protein and peptide antagonists. *Journal of Biological Chemistry*. Vol. 272: pags13094–13102.
- Kamiguti, A. S; Zuzel, M. and Theakston, R. G. D. (1998). Snake venom metalloproteinases and disintegrins: interactions with cells. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. Vol. 31: pags853-862.
- Keeling, W. B; Armstrong, P. A; Stone, P. A; Bandyk, D. F. and Shames, M. L. (2005) Overview of Matrix Metalloproteinases in the Pathogenesis and Treatment of Abdominal Aortic Aneurysms. *Vascular and Endovascular Surgery*. Vol. 39(6): pags
- Kini R. M. (2003); Excitement ahead: structure, function and mechanism of snake venom phospholipase A₂ enzymes. *Toxicon*. Vol. 42(8): pags827-840.
- Kini R. M (2006). Anticoagulant proteins from snake venoms: structure, function and mechanism. *Biochemistry Journal*. Vol. 397: pags377–387.
- Kini, R. M; Zhang, C. Y. and Tan, B. K. H. (1997). Pharmacological activity of the interdomain segment between metalloproteinase and disintegrin domains. *Toxicon*. Vol. 35(4): pags529-535.
- Kini, R. M; Morita, T; Rosing, J. (2001a). Classification and Nomenclature of Prothrombin Activators Isolated from Snake Venoms. *Thrombosis and Haemostasis*. Vol. 85: pags710-711.
- Kini, R. M; Rao, V. S; Josep, J. S. (2001b). Procoagulant Proteins from Snake Venoms. *Haemostasis* Vol. 31: pags218–224.
- Koh., D. C. I; Armugam, A and Jeyaseelan, K. (2006). Snake venom components and their applications in biomedicine. *Cellular and Molecular Life Sciences*. Vol. 63: pags3030–3041.
- Leonardi, A; Gubenek, F; Križaj, I. (2001). Purification and characterisation of two hemorrhagic metalloproteinases from the venom of the long-nosed viper, *Vipera ammodytes ammodytes*. *Toxicon*. Vol. 40(1):pags55-62.
- Li, Y; Means, G. E. and Feeney, R. E. (1969). The Action of Proteolytic Enzymes on N, N-DimethylProteins: BASIS FOR A MICROASSAY FOR PROTEOLYTIC ENZYMES. *The Journal of Biological Chemistry*. Vol. 244(4): pags789-793.
- Li, Z.Y.; Yu, T.F. and 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* 32(11): 1349-1358.

- Lomonte, B and Gutierrez, J. M. (1983). Proteolytic activity of snake venoms of Costa Rica on casein. *Revista de Biologia Tropical*. Vol. 31(1): pags37-40.
- Lu, Q; Clemetson, J. M. and Clemetson, J. (2005). Snake venom and hemostasis. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. Vol. 3: pags1791-1799.
- Mandelbaum, F. R; Reich, A. P and Assakura, M. T. (1982). Isolation and characterization of a proteolytic enzyme from the venom of the *Bothrops jararaca* (jararaca). *Toxicon*. Vol. 20(6): pags955-972.
- Manual de Diagnóstico e Tratamento de Acidentes por Animais Peçonhentos. (2001). Ministério de Saúde & FUNASA. Brasília. Brasil.
- Marcussi, S; Bernardes, C. P; Santos-Filho, N. A; Mazzi, M. V; Oliveira, C. Z; Izidoro, L. F. M; Fuly, A. L; Magro, A. J; Braz, A. S. K; Fontes, M. R. M; Giglio, J. G; Soares, A. M. (2007). Molecular and functional characterization of a new non-hemorrhagic metalloprotease from *Bothrops jararacussu* snake venom with antiplatelet activity. *Peptides*. Vol. 28: pags2328-2339.
- Matsui, T; Fujimura, Y; Titani, K. (2000) Snake venom proteases affecting hemostasis and thrombosis. *Biochimica et Biophysica Acta*. Vol. 1477: pags146-156.
- McLean, R.L.; Massaro, E.J. and Elliot, W.B. Olivera B.M. (1971). A comparative study of the homology of certain enzymes in ellapide venoms. *Comparative Biochemistry and Physiology*. Vol. 39B: pags1023-1037.
- Moura-da-Silva, A. M; Ramos, O. H. P; Baldo, C; Niland, S; Hansen, U; Ventura, J. S; Furlan, S; Butera, D; Della-Casa, M. S; Tanjoni, I; Clissa, P. B; Fernandes, I; Chudzinski-Tavassi, A. M; Eble, J. A. (2008). Collagen binding is a key factor for the hemorrhagic activity of snake venom metalloproteinases. *Biochimie*. Vol. 90: pags484-492.
- I.
- Neves-Ferreira, A. G. C; Perales, J. P; Fox, J. W; Shannon, J. D; Makino, D. L; Garratt, R. C. and 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. 277(15): pags13129–13137.
- Ohsaka, A; Ikesawa, H; Kondo, H; Kondo, S; Uchida, N. (1960). Hemorrhagic activities of habu snake venom and their relations to lethal toxicity, proteolytic activities and other pathological activities. *Brazilian Journal of Experimental Pathology*. Vol. 41: pags478-486.
- Okuda, D; Koike, H. and Morita, T. (2002). A new gene structure of the disintegrin family: a subunit of dimeric disintegrin has a short coding region. *Biochemistry*. Vol. 41: pags14248-14254.

- Omori-Satoh, T; Yamakawa, Y; Nagaoka, Y; Mebs, D. (1995). Hemorrhagic principles in the venom of *Bitis arietans*, a viperous snake. I. Purification and characterization. *Biochimica et Biophysics Acta*. Vol. 1246: pags61-66.
- Peichoto, M. E; Teibler, P; Mackessy, S. P; Leiva, L; Acosta, O; Gonçalves, L. R. C; Tanaka-Azevedo, A. M; Santoro, M. L. (2007). Purification and characterization of patagonfibrase, a metalloproteinase showing α -fibrinogenolytic and hemorrhagic activities, from *Philodryas patagoniensis* snake venom. *Biochimica et Biophysica Acta*. Vol. 1770: pags810–819.
- Ponce-Soto, L. A; Toyama, M. H; Hyslop, S; Novello, J. C. and Marangoni, S. (2002). Isolation and preliminary enzymatic characterization of a novel PLA₂ from *Crotalus durissus collilineatus* Venom. *Journal of Protein Chemistry*. Vol. 21(3): pags131-136.
- Ponce Soto Luis Alberto. (2005). Estudos estrutura-função de neurotoxinas isoladas de veneno crotálico e botrópico: análise comparativa da neurotoxicidade e miotoxicidade. Tese apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Doutor em Biologia Funcional e Molecular - Área Bioquímica. Campinas. Brasil.
- Ponce-Soto, L. A; Baldasso, P. A; Romero-Vargas, F. F; Winck, F. V; Novello, J. C and Marangoni, S. (2007a) Biochemical, Pharmacological and Structural Characterization of Two PLA₂ Isoforms Cdr-12 and Cdr-13 from *Crotalus durissus ruruima* Snake Venom. *The Protein Journal*. Vol. 26(1): pags39-49.
- Ponce-Soto, L. A; Bonfim, V. L; Novello, J. C; Navarro Oviedo, R; Yarlequé Chocas, A. and Marangoni, S. (2007b). Isolation and Characterization of a Serine Protease, Ba III-4, from Peruvian *Bothrops atrox* venom. *The Protein Journal*, Vol. 26(6): pags 387-394.
- Ramos, O. H. P; Selistre de Araujo H. S. (2004). Comparative analysis of the catalytic domain of hemorrhagic and non-hemorrhagic snake venom metalloproteinases using bioinformatic tools. *Toxicon*. Vol. 44: pags529–538.
- Ramos, O. H. P; Selistre de Araujo H. S. (2006). Snake venom metalloproteinases — structure and function of catalytic and disintegrin domains. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*. Vol. 142: pags328–346.
- Rodrigues, V. M; Soares, A. M; Andrião-Escarso, S. H; Franceschi, A. M; Rucavado, A; Gutiérrez, J. M; Giglio, J. R. (2001a). Pathological alterations induced by neuwiedase, a metalloproteinase isolated from *Bothrops neuwiedi* snake venom. *Biochimie*. Vol. 83: págs 471-479.
- Rodrigues, V. M; Soares, A. M; Guerra-Sá, R; Rodrigues, V; Fontes, M. R. M. and Giglio, J. R. (2001b). Structural and functional characterization of Neuwiedase, a nonhemorrhagic fibrin(ogen)olytic metalloproteinase from *Bothrops neuwiedi* snake venom. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. Vol. 381(2): pags213–224.

- Rucavado, A; Lomonte, B; Ovadia, M; Gutiérrez, J. M. (1995). Local tissue damage induced by BaP1, a metalloproteinase isolated from *Bothrops asper* (Terciopelo) snake venom. *Experimental and Molecular Pathology*. Vol. 63(3): pags186-199.
- Rucavado A; Flores-Sánchez, E; Franceschi, A; Magalhaes, A; Gutiérrez, J. M. (1999). Characterization of the local tissue damage induced by LHF-II, a metalloproteinase with weak hemorrhagic activity isolated from *Lachesis muta muta* snake venom. *Toxicon*. Vol. 37(9): pags1297-312.
- Sales, P. B. V; Santoro, M. L. (2008). Nucleotidase and DNase activities in Brazilian snake venoms. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*. Vol. 147: 85–95.
- Sanchez, E. F; Souza, C. T; Bello, C. A; Richardson, M; Oliveira, E. B; Magalhaes, A. (2003). Resolution of isoforms of mutalysin II, the metalloproteinase from bushmaster snake venom. *Toxicon*. Vol. 41: pags1021–1031.
- Sanchez, E. F; Gabriel, L. M; Gontijo, S; aGremski, L. H; Veiga, S. S; Evangelista, K. S; Eble, J. A; Richardson, M. (2007). Structural and functional characterization of a P-III metalloproteinase, leucurolysin-B, from *Bothrops leucurus* venom. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. Vol. 468: pags193–204.
- Selistre de Araújo, H. S. (2007). Atividade hemorrágica de toxinas, in: Selistre de Araújo, H. S; Ferreira de Souza, D. H. (Eds.), *Métodos em Toxinologia: toxinas de Serpentes*. EdUFSCAR. São Carlos. Brazil. pags45-51.
- Senis, Y. A; Kim, P. Y; Fuller, G. L. J; García, A; Prabhakar, S; Wilkinson, M. C; Brittan, H; Zitzmann, N; Wait, R; Warrell, D. A; Watson, S. P; Kamiguti, A. S; Theakston, R. D. G; Nesheim, M; Laing, G. D. (2006). Isolation and characterization of cotiaractivase, a novel low molecular weight prothrombin activator from the venom of *Bothrops cotiara*. *Biochimica et Biophysica Acta*. Vol. 1764: pags863–871.
- Smolka, M. B; Marangoni, S; Oliveira, B. and Novello, J C. (1998). Purification and partial characterization of a Thrombin.like enzyme, Balterobin, from the venom of *Bothrops alternatus*. *Toxicon*. Vol. 36(7): pags1059-1063.
- Stroka, A; Donato, J. L; Bon, C; Hyslop, S; Lôbo de Araújo, A. (2005). Purification and characterization of a hemorrhagic metalloproteinase from *Bothrops lanceolatus* (Ferde-lance) snake venom. *Toxicon*. Vol. 45: pags411–420.
- Ströcker, W and Bode, W. (1995). Structural features of a superfamily of zinc-endopeptidases: the metzincins. *Current Opinion in Structural Biology*. Vol. 5: pags383-390.
- Suhr, S. M. and Kim, D. S. (1996). Identification of the snake venom substance that induces apoptosis. *Biochemistry and Biophysics Research Communications*. Vol. 224(1): pags134-9.

- Swenson, S; Markland Jr, F. S. (2005). Snake venom fibrin(ogen)olytic enzymes. *Toxicon*. Vol. 45: pags1021–1039.
- Takahashi, H; Mashiko, H. (1998). Haemorrhagic factors from snake venoms. I. Properties of haemorrhagic factors and antihemorrhagic factors. *Journal of Toxicology: Toxin Reviews*. Vol. 17(3): pags315-335.
- Takeya, H; Onikura, A; Nikai, T; Sugihara, H. and Iwanaga, S. (1990). Primary structure of a hemorrhagic metalloproteinase, HT-2, isolated from the venom of *Crotalus ruber ruber*. *Journal of Biochemistry*. Vol. 108(5): pags711-719.
- Tans, G; Rosing, J. (2001). Snake venom activators of Factor X: An overview. *Haemostasis*. Vol. 31: pags225-233.
- Teixeira, C. F. P; Fernandes, C. M; Zuliani, J. P; Zamuner, S. F. (2005). Inflammatory effects of snake venom metalloproteinases. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. Vol. 100(1): pags181-184.
- Tsai, I.H; Wang, Y, M; Chiang, T. Y; Chen, Y. L; Huang, R. J. (2000). Purification, cloning and sequence analyses for pro-metalloprotease-disintegrin variants from *Deinagkistrodon acutus* venom and subclassification of the small venom metalloproteases. *European Journal of Biochemistry*. Vol. 267(5): pags1359-1367.
- Tu, A.T. (1991) *Reptile Venoms and Toxins: Handbook of Natural Toxins*. Vol. 5. New York. Macel Dekker. Inc.
- Wang, W. J; Huang, T. F. (2002). Purification and characterization of a Novel metalloproteinase, Acurhagin, from *Agkistrodon acutus* venom. *Thrombosis and Haemostasis* Vol. 87: pags641–50.
- Wang, W-J; Shih, C-H; Huang, T-F. (2005). Primary structure and antiplatelet mechanism of a snake venom metalloproteinase, acurhagin, from *Agkistrodon acutus* venom. *Biochimie*. Vol. 87: pags1065–1077.
- Xu, X; Liu, X; Zhang, L; Chen, J; Liu, W; Liu, Q. (2006). Effects of metal ions on the conformation and activity of acutolysin D from *Agkistrodon Acutus* venom. *The Protein Journal*. Vol. 25(6): pags423-30.
- Yamada, D; Shin, Y. and Morita, T. (1999). Nucleotide sequence of a cDNA encoding a common precursor of disintegrin flavostatin and hemorrhagic factor HR2a from the venom of *Trimeresurus flavoviridis*. *FEBS Letters*. Vol. 451(3): pags299-302.
- Yamakawa, M; Nozaki, M; Hokama, Z. (1976) Fractionation of Sakishima-habu (*Trimeresurus elegans*) venom, and lethal, hemorrhagic, and edema forming activities of the fractions, in: Ohsaka, A. Hayashi, K; Sawai, Y. (Eds.), *Animal, Plant and Microbial Toxins*, Plenum Press, New York, pp. 97–109.

- Zingali, R. B & Frattani F. S. (2007). Ensaio para estudos dos efeitos das toxinas sobre a agregação plaquetária, in: Selistre de Araújo, H. S; Ferreira de Souza, D. H. (Eds.), Métodos em Toxinologia: toxinas de Serpentes. EdUFSCAR. São Carlos. Brazil. pags105-114.
- Zhou, Q; Hu, P; Ritter, M. R; Swenson, S. D; Argounova, S; Epstein, A. L; Markland, F. S. (2000). Molecular cloning and functional expression of Contortrostatin, a homodimeric disintegrin from southern copperhead snake venom. Archives of Biochemistry and Biophysics. Vol. 375(2): pags278-288.



CEEAA/Unicamp

**Comissão de Ética na Experimentação Animal
CEEAA/Unicamp**

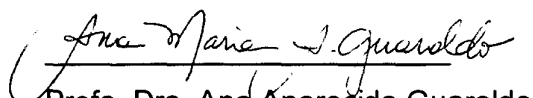
CERTIFICADO

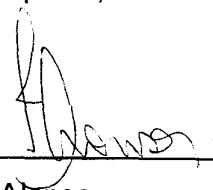
Certificamos que o Protocolo nº **1510-1**, sobre "**Caracterização estrutural e funcional de uma metaloprotease, isolada a partir do veneno total de *Bothrops marajoensis***", sob a responsabilidade de **Prof. Dr. Sergio Marangoni / Frank Denis Torres Huaco**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal – CEEAA/Unicamp em **28 de abril de 2008**.

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº **1510-1**, entitled "**Structural and functional characterization of a metalloproteinase isolated from *Bothrops marajoensis* crude venom**", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - Unicamp) on **April 28, 2008**.

Campinas, 28 de abril de 2008.


 Profa. Dra. Ana Aparecida Guaraldo
 Presidente


 Fátima Alonso
 Secretária Executiva