

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA



JOSÉ ANTONIO VALERIANO ZAPANA

“Purificação e caracterização biológica de uma nova serinoprotease com atividade trombina “like” do veneno total de *Bothrops andianus* (TLBan)”

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo(a) candidato (a) JOSÉ ANTONIO VALERIANO ZAPANA e aprovada pela Comissão Julgadora.

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

A handwritten signature in cursive script, reading "Sergio Marangoni".

Orientador: Prof. Dr. Sergio Marangoni

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

Campinas, 2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
ROBERTA CRISTINA DAL' EVEDOVE TARTAROTTI – CRB8/7430
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP

V236p Valeriano Zapana, José Antonio, 1985-
Purificação e caracterização biológica de uma nova
serinoprotease com atividade trombina “like” do veneno
total de *Bothrops andianus* (TLBan) / José Antonio
Valeriano Zapana. – Campinas, SP: [s.n.], 2012.

Orientador: Sergio Marangoni.
Coorientador: Luís Alberto Ponce Soto.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de
Campinas, Instituto de Biologia.

1. *Bothrops andianus*. 2. Serinoprotease. 3.
Enzima trombina “like”. 4. Venenos de serpentes. 5.
Veneno - Purificação. I. Marangoni, Sergio, 1951-. II.
Ponce-Soto, Luis Alberto. III. Universidade Estadual de
Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em Inglês: Purification and biological characterization of a new serine
protease with thrombin “like” activity the whole venom of *Bothrops andianus* (TLBan)

Palavras-chave em Inglês:

Bothrops andianus
Serineprotease
Thrombin “like” enzyme
Snake venom
Venom - Purification

Área de concentração: Bioquímica

Titulação: Mestre em Biologia Funcional e Molecular

Banca examinadora:

Sergio Marangoni [Orientador]
Claudio Chrysostomo Werneck
Gláucia Coelho de Mello

Data da defesa: 27-02-2012

Programa de Pós Graduação: Biologia Funcional e Molecular

Campinas, 27 de fevereiro de 2012

BANCA EXAMINADORA

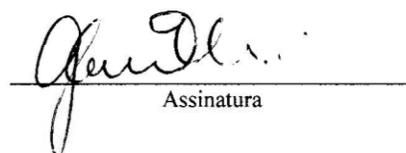
Prof. Dr. Sergio Marangoni (Orientador)


Assinatura

Prof. Dr. Claudio Chrysostomo Werneck


Assinatura

Profa. Dra. Gláucia Coelho de Mello


Assinatura

Prof. Dr. Marcelo Lancellotti

Assinatura

Profa. Dra. Thalita Rocha

Assinatura

Dedico este trabalho...

*A Deus, pela vida, a guiar o meu caminho,
por ser minha força nos momentos difíceis,
por ensinar a simplicidade do amor, no trabalho.*

*A meus pais **Fortunato e Aquilina** que, com fé e sabedoria,
me ensinaram a aceitar e a enfrentar os desafios da vida
com suas palavras de encorajamento em tempos dificuldade.
Por seu apoio incondicional em minha formação acadêmica,
eu amo vocês, queridos pais.*

*A **Milagros**, minha esposa, e a **José Gabriel**, meu filho,
os dois tesouros que tenho em minha vida.
Eu amo vocês.*

*Confia no Senhor de todo o teu coração,
e não te estribes no teu próprio entendimento.
Reconhece-O em todos os teus caminhos,
e Ele endireitará as tuas veredas.*

Provérbios 3:5-6

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual de Campinas (**UNICAMP**).

A **CAPES**, pelo auxílio financeiro, proporcionando a realização do meu trabalho.

Ao Prof. Dr. **Sergio Marangoni**, meu orientador, pela orientação crítica e pela confiança em meu trabalho desde o primeiro momento. Obrigado pela oportunidade de fazer um estágio onde me apaixonei pela bioquímica.

Ao co-orientador Prof. Dr. **Luís Alberto Ponce Soto**, pelo incentivo e pela confiança que sempre teve em meu trabalho. Você é o grande responsável por eu estar aqui hoje. Muito obrigado!

À Prof. Dra. **Laura C. Leiva**, da Universidade Nacional do Nordeste de Argentina, pelo apoio na realização de parte de minha tese, pela amizade e oportunidade de fazer um estágio, onde aprofundei mais meus conhecimentos na área de coagulação. Obrigado!

Aos Profs. Drs. Marcelo Lancellotti, Gláucia Coelho de Mello, Claudio Chrysostomo Werneck e Thalita Rocha por terem aceitado o convite para participar da minha banca examinadora, e valorizado assim o meu trabalho.

Ao amigo **Paulo Aparecido Baldasso**, pela amizade, pelo apoio técnico e pela grandiosa ajuda que sempre tive no desenvolvimento do meu trabalho.

A meus amigos de modo geral, do **LAQUIP**, muito obrigado pela amizade e pelos bons momentos que sempre me proporcionaram, fazendo com que meus dias fossem de muita alegria e tranquilidade, longe do meu país, Perú, e da minha família.

Aos funcionários do **Instituto de Biologia** da Unicamp, desde as secretárias, os porteiros e seguranças, até os responsáveis pela limpeza dos laboratórios, que sempre me receberam com um sorriso no rosto e um “bom dia” que certamente me incentivaram em muitos dias de desânimo.

ÍNDICE

Lista de Abreviações	viii
Resumo	x
Abstract	xii
INTRODUÇÃO	13
1. Animais peçonhentos: As Serpentes	13
2. Veneno Botrópico	14
2.1 Ação hemorrágica	14
2.2 Atividade inflamatória	14
2.3 Ação coagulante	15
3. <i>Bothrops andianus</i>	15
4. Hemostasia	16
4.1. Hemostasia primária	17
4.2. Hemostasia secundária	17
5. Proteases	23
6. Serinoproteases	23
6.1. Serinoproteases da subfamília S I	24
7. Trombina like de venenos de serpentes (SVTLE's)	26
8. SVTLE's na cascata de coagulação	27
OBJETIVOS	29
MATERIAIS E MÉTODOS	30
1. Veneno	30
2. Animais	30
3. Reagentes	30
4. Purificação da Trombina “like” procedente do veneno total de <i>Bothrops andianus</i>	30
4.1 Cromatografia de exclusão molecular em coluna de Sephadex G – 75	30
4.2 Cromatografia em HPLC de fase reversa	31
5. Determinação da massa molecular da fração I-4 (TLBan)	31
5.1. Eletroforese em SDS – PAGE	31
5.2. Ensaio de glicosilação	32
5.3. Espectrometria de massas Maldi-Tof	32
6. Análise de composição de aminoácidos da fração I-4 (TLBan)	32
7. Determinação da caracterização estrutural primária (sequenciamento) da trombina “like” procedente do veneno total de <i>Bothrops andianus</i>	33
7.1. Redução e alquilação	33
7.2. Hidrólise enzimática	33
7.3. Espectrometria de massa	33
7.4. Análise das proteínas nativas e alquiladas	34
7.5. De novo sequenciamento de peptídeos trípticos	34
8. Atividade proteolítica	34
9. Estudos cinéticos da fração I-4 (TLBan)	35
9.1. Efeito da concentração do substrato	35
9.2. Efeito da temperatura	35
9.3. Efeito do pH	35

9.4. Efeito dos íons divalentes na atividade proteolítica	35
9.5. Inibição da atividade serinoprotease	36
10. Determinação da atividade biológica da trombina “like” isolada do veneno de <i>Bothrops andianus</i>	36
10.1. Atividade coagulante	36
10.2. Degradação do fibrinogênio	36
10.3. Efeito dos íons divalentes na atividade fibrinogenolítica	37
10.4. Efeito do pH na atividade fibrinogenolítica	37
10.5. Determinação da Agregação plaquetária	37
11. Análise Estatística	38
RESULTADOS	39
1. Isolamento da serinoprotease com atividade trombina “like” do veneno de <i>Bothrops andianus</i>	39
1.1. Cromatografia de exclusão molecular em coluna de Sephadex G – 75	39
1.2. Atividade proteolítica das frações do veneno total de <i>B.andianus</i>	40
1.3. Cromatografia em HPLC de fase reversa	41
1.4. Atividade proteolítica da fração do HPLC	42
2. Determinação da massa molecular da fração I-4 (TLBan)	43
2.1. Eletroforeses em SDS – PAGE	43
2.2. Análise de espectrometria de massa (MALDI-Tof) da trombina “like” TLBan	44
3. Análise de composição de aminoácidos da fração I-4 (TLBan)	45
4. Caracterização estrutural da TLBan	46
4.1. Determinação da sequência de aminoácidos da TLBan	46
4.2. Homologia sequencial da TLBan isolada do veneno de <i>Bothrops andianus</i> .	48
5. Estudo da atividade cinética da fração I- IV (TLBan)	49
5.1. Efeito da concentração do substrato	49
5.2. Efeito do pH	51
5.3. Efeito da temperatura	52
5.4. Avaliação do efeito inibitório de íons sobre a atividade proteolítica da fração TLBan	54
5.5. Avaliação do efeito de íons na atividade proteolítica da fração I-4 (TLBan)	53
6. Estudo da atividade biológica da trombina “like” TLBan	55
6.1. Avaliação da atividade coagulante	55
6.2. Avaliação da dose mínima coagulante sobre o plasma humano	56
6.3. Degradação do fibrinogênio pela ação da trombina “like” TLBan e sua análise por SDS-PAGE	57
6.4. Efeito dos diferentes íons e pH na atividade fibrinogenolítica da TLBan	58
6.5. Determinação da Agregação Plaquetária	59
DISCUSSÃO	60
CONCLUSÕES	71
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	72
ANEXO	78

Lista de Abreviações

Lista de Abreviações

➤ Cromatografias.

Sephadex G-75	Coluna de exclusão molecular com matriz composta de dextrano
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
RP HPLC	HPLC de Fase Reversa
C-18	18 carbonos de alta Carga, sílica de atividade alta
μ-Bond pack C18	Coluna de HPLC com n-octadecyl como base da fase estacionária

➤ Reagentes, sais, tampões.

DL-BAPNA	<i>N</i> α-BENZOIL-DL-ARGINIL <i>p</i> -NITROANILIDA
DMSO	Dimetilsulfóxido
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
FB	Fibrinogênio bovino
DTT	Ditiotreitol
FL	Fosfolipídios
FT	Fator tisular
g	Gravidade
kDa	Kilo Daltons, 1 Da é aproximadamente o peso molecular de um átomo de hidrogênio.
Milli Q	Água destilada, apirogênica, deionizada e com uma electrocondutividade controlada, purificada com filtros de Walters.
PAGE	Eletroforese em Gel de poliacrilamida
PMSF	Fenilmetilsulfonilfluor
SBTI	Inibidor tripsina de soja
pH	Concentração de íons hidrogênio numa solução
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio, Laurel Sulfato de Sódio.
Tampón A	TFA 0,1% utilizado para cromatografia de HPLC-FR
Tampón B	Acetonitrila 66% utilizado em cromatografia de HPLC-FR
TFA	Ácido trifluoracético
Tris	Tris[Hidroximetil]aminometano
μ (micro)	Fator de multiplicação 10 ⁻⁶
p(pico)	Fator de multiplicação 10 ⁻¹²
DHB	Ácido 2,5-dihidroxibenzoico
v/v	Volume/volume
kV	Kilovolts
J/cm²	Joule/centímetro quadrado
ns	Nanosegundo

Fração

TLBan	Trombina “like” <i>Bothrops andianus</i>
TLEs	Enzima trombina “like”

Aminoácidos.

Ácido Aspártico	Asp	D
Ácido Glutâmico	Glu	E
Alanina	Ala	A
Arginina	Arg	R
Asparagina	Asn	N
Aspartato/Asparagina	Asx	
Cisteína	Cys	C
Fenilalanina	Phe	F
Glicina	Gly	G
Glutamato/Glutamina	Glx	Q
Histidina	His	H
Isoleucina	Ile	I
Leucina	Leu	L
Lisina	Lys	K
Metionina	Met	M
Prolina	Pro	P
Serina	Ser	S
Tirosina	Tyr	Y
Treonina	Thr	T
Triptofano	Trp	W
Valina	Val	V

RESUMO

No presente trabalho, uma nova serinoprotease com atividade trombina “like” do veneno de *Bothrops andianus* (TLBan), serpente dos Andes do Perú, foi isolada mediante duas etapas: cromatografia de exclusão molecular G-75 e cromatografia líquida em HPLC de fase reversa; com um alto grau de pureza e homogeneidade molecular.

Através da eletroforese em SDS-PAGE a TLBan mostrou ter uma massa relativa de 29 kDa sob condições redutoras e 26 kDa em condições não redutoras que foi confirmada com exatidão pela espectrometria de massa MALDI-TOF com uma massa molecular de 25 835,65 Da, após de ser submetida à glicosilação com a PNGase F e a neuraminidase, a massa relativa de TLBan diminuiu a 22 kDa e 25 kDa, respectivamente.

Os estudos da atividade cinética mostraram que a serinoprotease com atividade trombina “like” possui um comportamento michaeliano frente ao substrato DL-BAPNA, registrando as constantes cinéticas de $V_{max} = 5.4 \times 10^{-1}$ nmoles p-NA/min e $K_m = 7.9 \times 10^{-1}$ mM apresentou ser estável entre 25 °C e 60 °C e na faixa de pH entre 4 e 10.

Na presença de diferentes íons (Mg^{2+} , Ca^{2+} , Mn^{2+} , Cd^{2+} e Zn^{2+}) e inibidores (PMSF, EDTA e SBTI), sua atividade proteolítica e fibrinogenolítica foi mantida, com exceção para os íons Cd^{2+} , Zn^{2+} e inibidor PMSF. TLBan foi capaz de evidenciar sua atividade fibrinogenolítica frente ao fibrinogênio bovino, hidrolisando a cadeia alfa (α) e beta (β), comportando-se como uma trombina “like” de tipo venobim AB, apresentou um IC de $144,93 \text{ s}^{-1}$, uma dose mínima coagulante (DMC) de $1,33 \pm 0,25 \text{ } \mu\text{g/mL}$ e induz á agregação plaquetária.

A caracterização estrutural de TLBan foi determinada por sua massa molecular via espectrometria de massa. A análise estrutural da sequência foi deduzida utilizando a base de dados: <http://www.expasy.ch/sprot/>, com a ajuda da sequência dos peptídeos trópticos, mostrando uma alta homologia seqüencial dos aminoácidos com outras serinoproteases de veneno de serpente. Sua cadeia polipeptídica da TLBan mostrou a presença da tríade catalítica nas posições de His (44), Asp (90) e Ser (185).

A reprodutibilidade da atividade biológica por meio dos efeitos farmacológicos só é possível com a utilização de frações quimicamente homogêneas para manter a integridade da molécula. Essas frações são obtidas com metodologias de alta eficiência: HPLC e espectrometria de massa. Os resultados podem ser associados com sua atividade biológica, eliminando a subjetividade causada pelo veneno ou frações impuras. Este tipo de abordagem será aplicado para

pautar os estudos bioquímicos, estrutura-função, fisiológico e farmacológico; pode ainda revelar mecanismos desconhecidos na relação estrutura-função da serinoprotease com atividade trombina “like” do veneno de serpente.

No caso da serpente *Bothrops andianus*, são valorizados os estudos devido ao fato de não haver trabalhos realizados, provavelmente pelo fato de tratar-se de uma espécie ainda não estudada, mas que tem interesse para o campo científico no campo da venômica.

ABSTRACT

In this work, a new serine protease with thrombin "like" activity the venom of *Bothrops andianus* (TLBan), snake of the Andes of Peru, was isolated by two steps: molecular exclusion chromatography G-75 and liquid chromatography in reversed-phase HPLC; with a high degree of purity and molecular homogeneity.

Through of electrophoresis on SDS-PAGE shows the TLBan have a relative mass of 29 kDa under reducing conditions and 26 kDa in reducing conditions that was not confirmed for precision by mass spectrometry MALDI-TOF, with a molecular mass of 25 835.65 Da after when was sometida a desglycosilation with PNGase F and neuraminidase, The TLBan relative mass decreased 22 kDa and 25 kDa, respectively.

The kinetic studies of the activity showed that the serine protease thrombin "like" activity features a opposite behavior michaeliano substrate DL-BAPNA, recording the kinetic constants of $V_{max} = 5.4 \times 10^{-1}$ nmol p-NA/min and $K_m = 7.9 \times 10^{-1}$ mM had to be stable between 25 ° C and 60 ° C and at pH between 4 and 10.

In the presence of different ions (Mg^{2+} , Ca^{2+} , Mn^{2+} , Cd^{2+} and Zn^{2+}) and inhibitors (PMSF, EDTA and SBTI), its proteolytic activity and fibrinogenolítica was maintained, except for the ions Cd^{2+} , Zn^{2+} and inhibitor PMSF. TLBan was able to enhance its activity against the fibrinogen fibrinogenolítica veal, hydrolyzing the alpha chain (α) and beta (β), behaving like a thrombin "like" type venobim AB, presented a CI of 144.93 s⁻¹, a minimum coagulant dose (DMC) of 1.33 ± 0.25 mg / mL and induces platelet aggregation.

The structural characterization of TLBan was determined by its molecular mass via mass spectrometry. Structural analysis of the sequence was deduced using the database: <http://www.expasy.ch/sprot/>, with the help of the sequence of tryptic peptides, showing a high homology with other amino acid sequence of the serine protease from snake venom. Its polypeptide chain TLBan showed the presence of a catalytic triad in positions His (44), Asp (90) and Ser (185).

The reproducibility of the biological activity through the pharmacological effects is only possible with the use of chemically homogeneous fractions to maintain the integrity of the molecule. These fractions are obtained with high efficiency methods: HPLC and mass spectrometry. The results may be associated with its biological activity, eliminating the

subjectivity caused by poison or impure fractions. This approach will be applied to govern the biochemical studies, structure-function, physiological and pharmacological, may also reveal unknown mechanisms in the structure-function relationship of serine protease with thrombin "like" activity from snake venom.

In the case of the snake *Bothrops andianus*, studies are valued due to the fact that there is no work done, probably because this is a species not yet studied, but that is of interest to the scientific field of venom.

INTRODUÇÃO

1. Animais peçonhentos: As Serpentes

As serpentes ou cobras, pertencem à classe dos répteis, ordem dos Escamados e subordem Serpentes (ofídios) (Vizotto, 2003). Os acidentes com serpentes venenosas são bastante comuns e são um problema para a saúde pública, em especial nos países tropicais, pela frequência com que ocorrem, pela gravidade e por possíveis sequelas deixadas nas vítimas (Pinho e Pereira, 2001).

Entre os países sul-americanos, o Brasil é o que apresenta maior número de acidentes por ano. O território brasileiro conta com 250 espécies de serpentes, sendo 70 delas consideradas peçonhentas (Pinho e Pereira, 2001). Somente no ano de 2005, foram notificados pelo Sistema de Informação de Agravos de Notificação (Sinan) 97.244 envenenamentos por animais peçonhentos, dentre os quais as serpentes contribuíram com 28.702 casos (29,52%) (Sinan, 2006).

Dos vários tipos de serpentes existentes no Brasil, destacam-se as dos gêneros Bothrops, Lachesis, Crotalus e Micrurus, sendo o primeiro o de maior interesse com respeito a acidentes ofídicos. As serpentes deste gênero são as responsáveis por cerca de 90% dos acidentes no território nacional

O veneno de serpente é uma mistura complexa de componentes proteicos (oxidoredutases, proteases, glicosidases, e lipases (PLA₂)), que produzem danos ao sistema orgânico da presa envenenada. Muitos destes componentes tóxicos são proteínas biologicamente ativas que têm a função de matar ou imobilizar presas, bem como auxiliar no processo de digestão (Braud *et al.*, 2000; Mackessy *et al.*, 2003, Rodriguez-Acosta *et al.*, 2010). Os componentes não proteicos, também chamados de substâncias simples, são ainda divididas em inorgânicas (íons Mg²⁺, Ca²⁺, Zn⁺²) e orgânicas (aminoácidos, lipídios, carboidratos, ácidos nucleicos e amins biogênicas), com diferentes estruturas e funções, sendo, por exemplo, usadas para imobilização e morte da presa (Bjarnason e Fox, 1994).

Muitas dessas toxinas que interferem na hemostasia são enzimas como as L-aminoxidases, fosfodiesterases, serino e metaloproteases, fosfolipases A₂ e nucleotidasas, enquanto outros, como desintegrinas e lectinas tipo C, não tem atividade enzimática. Os componentes ativos de venenos de serpentes que interferem na hemostasia podem afetar várias etapas, quer por degradação proteolítica inespecífica ou seletiva, ativando ou inibindo os fatores específicos envolvidos na coagulação, agregação plaquetária e fibrinólise

(Markland, 1998; Arocha-Piñango *et al.*, 2000; Kini, 2005; Markland, 2005; Rodriguez-Acosta *et al.*, 2010).

2. Veneno Botrópico

Numerosos estudos experimentais têm demonstrado que o veneno botrópico possui em sua composição uma gama bastante diversa e complexa de componentes que atuam sobre o sistema hemostático, e a literatura é bastante vasta. O veneno produz dano tecidual local marcado que inclui dor, edema, hemorragia (Teixeira *et al.*, 2003). Há, ainda, outros efeitos tóxicos / farmacológicos, incluindo sua ação hemorrágica sistêmica, insuficiência renal, hemolítica (Gutiérrez e Lomonte, 1997; Ownby, 1998; Valentín e Lambeau, 2000; Maruñak *et al.*, 2007) e necrose (Gutiérrez e Ownby, 2003; Harris, 2003).

2.1. Ação hemorrágica

O efeito hemorrágico é causado por um grupo de toxinas hemorrágicas ou hemorraginas, que são enzimas proteolíticas do tipo metaloproteinase, já que sua atividade enzimática depende da presença de um átomo de zinco no seu sitio ativo (Bjarnason e Fox, 1994). Estas agem por fragilizar a integridade do endotélio vascular, degradando colágeno, fibronectina; tem atividade de desintegrina, além de serem potentes antiagregantes plaquetários. Acredita-se que a clivagem específica em pontos-chave possa levar ao desencadeamento de um mecanismo endógeno amplificador, tendo um ataque proteolítico da lâmina basal vascular (França e Málaque, 2003).

2.2. Atividade inflamatória

É causada por diversas frações do veneno botrópico, por exemplo, aminas biogênicas pré-formadas do tipo histamina, até pequenos peptídeos, ou proteínas como as fosfolipases A₂, esterases, proteases, enzimas liberadoras de cinina (calicreínas, cininogenases) e lectinas. Outros mediadores da inflamação, incluídos a bradicinina, as prostanglandinas, os leucotrienos e os tromboxanos, entre outros, exercem papel em etapas posteriores o tardias da formação do edema (Costa *et al.*, 2002). A atividade edematogênica é muito potente, evidenciada nos casos clínicos e nos modelos experimentais. Nesses últimos, as doses de veneno ou frações requeridas para induzir um efeito significativo variam de uns poucos microgramas a décimos de microgramas (Teixeira *et al.*, 2003).

2.3. Ação coagulante

O veneno botrópico possui capacidade de ativar fatores da coagulação sanguínea, ocasionado consumo de fibrinogênio e formação de fibrina intravascular, induzindo freqüentemente à incoagulabilidade sanguínea, além de ativar a protrombina da cascata de coagulação sanguínea. A fração do veneno que possui esta ação coagulante atua de maneira diferente da trombina fisiológica, pois, não é neutralizada pela heparina (Kini, 1997, 2005a).

3. *Bothrops andianus*

Classificação:

REPTILIA

SQUAMATA

Viperidae

Crotalinae

Bothrops

Bothrops andianus

Esta serpente pode crescer até os 125 cm, enquanto o tamanho médio adulto é entre 60 e 70 cm. A cor dorsal do corpo é verde-oliva e café, sendo mais escura anteriormente. Têm entre 18 e 25 marcas escuras triangulares no dorso; alguns autores mencionam que essas manchas parecem fones de ouvido por apresentarem uma mancha alongada em forma de arco em cada extremo, que acabam numa mancha redonda. Este padrão dorsal é contínuo no corpo; a cauda tem entre 5 e 12 manchas bordejadas em negro. A cor fica mais escura em exemplares velhos, até ser marrom escuro uniforme, em alguns casos. A ponta da cauda nos filhotes é preta ou amarela. O ventre é de cor creme ou amarelo com fortes manchas escuras de cor cinza, marrom ou preto. A parte de trás da cabeça é mais escura que o corpo e alguns exemplares apresentam manchas irregulares de tons marrons ou pretos na área parietal. Os lados da cabeça acima do focinho são de cor verde-oliva ou verde amarelado e por debaixo deste são mais claros e algumas vezes com tons marrons. Aprecia-se uma linha bem definida de cor chocolate que vem por trás do olho e vai para baixo diagonalmente para o canto da boca, que é delimitada ventralmente por uma fina linha clara. O lado ventral da cabeça é de cor creme ou amarelo manchado com pontos pretos. A íris é amarelada ou amarela verdosa e a língua é de cor roxa escura, marrom ou preta (Campbell e Lamar, 1985).

Encontra-se distribuída no centro dos Andes do Peru, nos departamentos de Cuzco, Puno e na Bolívia, nos departamentos de La Paz, Cochabamba e Santa Cruz. (Campbell e Lamar, 2004).



Figura 1: Serpente *Bothrops andianus*

4. Hemostasia

O termo hemostasia é definido como um conjunto de fatores responsáveis pela manutenção do sangue fluido no interior dos vasos sanguíneos (Garcia e Navarro, 2005) ou que é a parada de sangramentos ou hemorragias (Baker, 2006) e que está relacionada ao controle da hemorragia e dissolução do coágulo por meio de eventos mecânicos e bioquímicos (Lopes *et al.*, 2007).

O conceito mais claro é que a hemostasia é a cessação fisiológica de sangramento por um mecanismo complexo que envolve uma mudança de estado físico, do líquido ao sólido, com a formação do coágulo de fibrina e da ligação em uma malha insolúvel (Quintana e González, 2002).

4.1. Hemostasia Primária

A primeira resposta à injúria vascular é um espasmo ou vasoconstrição, que resulta na diminuição do fluxo sanguíneo distal ao local da lesão (Plaisier, 2001; Cheville, 2009). Esta fase inicial corresponde a uma resposta transitória resultante de mecanismos neurogênicos reflexos (resposta central), no local da lesão pelas endotelinas potentes vasoconstritores derivados das células endoteliais (resposta local). A redução do fluxo sanguíneo diminui a perda de sangue, além de possibilitar uma reação enzimática mais eficaz nos processos de coagulação e agregação plaquetária (Cheville, 2009).

Numa etapa seguinte, as plaquetas circulantes são expostas ao colágeno subendotelial e, rapidamente, se aderem ao mesmo e à parede do vaso (Plaisier, 2001). Podem aderir também à fibronectina e a outras glicoproteínas e proteoglicanos. Entretanto, a adesão mais eficiente ocorre quando o fator de Von Willebrand (FvW) é liberado. O FvW age como uma ponte entre o colágeno e o receptor GpIb da membrana das plaquetas (Plaisier, 2001; Mosier, 2007; Cheville, 2009).

Neste estágio e sem estimulação mais profunda, as plaquetas aderidas e agregadas podem se separar. Entretanto, as plaquetas agregadas secretam o conteúdo dos seus corpos densos e α -grânulos para acelerar a hemostasia. A adenosina-difosfato (ADP) liberada dos grânulos densos faz a ligação do fibrinogênio ao receptor GpIIb-IIIa das plaquetas, resultando na formação de pontes que ligam as plaquetas à rede de fibrina frouxa. A contração plaquetária promove a retração desse coágulo frouxo, formando um tampão denso, que encobre a área danificada. Quando a injúria vascular é mínima, os tampões de plaquetas são suficientes para resolver o dano. Caso contrário, o colágeno exposto e os fosfolípidios plaquetários agregados promovem a hemostasia secundária do local (Mosier, 2007).

4.2. Hemostasia Secundária

A hemostasia secundária culmina com a ativação dos fatores de coagulação. McFarlene, Davie e Ratnoff, em 1964, foram os primeiros a descreverem o mecanismo de formação do coágulo, como uma série de conversões de proteínas ou zimogênios conectados, para ativar outras proteínas ou enzimas (Iskander e Cheng, 1999).

À primeira vista, as muitas interações, retroalimentações, ativadores, aceleradores e inibidores dos fatores de coagulação parecem complicadíssimos, entretanto, os eventos relacionados a esta fase podem ser didaticamente categorizados numa estruturação básica, em que os fatores da coagulação são diferenciados *in vitro* num sistema intrínseco, num sistema

extrínseco e, finalmente, num sistema comum. Reforça-se que tais categorias são, estritamente, tratadas separadamente *in vitro*, uma vez que, quando um destes sistemas é ativado *in vivo*, o outro sistema também sofre ativação em virtude da ativação cruzada dos sistemas (Baldwin *et al.*, 1998).

Os fatores de coagulação são formados por uma família de proteínas que possuem similaridade em suas sequências, estruturas e, em certo grau, função. Há aproximadamente 50 membros nesta família. As proteases, em geral, clivam cadeias de polipeptídeos das moléculas, quebrando o elo que mantém as proteínas da coagulação em estado inativo, sendo denominadas pró-proteínas ou zimogênios (Moran e Viele, 2005).

Para facilitar o entendimento da hemostasia, o Comitê de Nomenclatura de Fatores de Coagulação Sanguínea determinou que cada proteína envolvida na cascata de coagulação fosse designada por um numeral romano (Iskander e Cheng, 1999). A letra “a” deve ser colocada depois do numeral romano para indicar que a proteína está na forma ativa. Observa-se que, embora os fatores sejam designados por numerais romanos, os mesmos podem ser designados por outros nomes (Moran e Viele, 2005).

Todas as proteínas plasmáticas envolvidas no processo de coagulação são sintetizadas no fígado. Os fatores II, VII, IX e X são dependentes da vitamina K e circulam na forma inativa (Soliman e Broadman, 2006).

Todos os fatores que participam do processo de coagulação estão listados no Quadro 1 segundo Moran e Viele (2005) descreveram que, além dos fatores de coagulação, existem outras proteínas regulatórias que são essenciais para a formação do coágulo, dentre elas, as principais são a Antitrombina III, proteína C, proteína S, trombomodulina e fator de Von Willebrand (FvW).

a) Via Intrínseca

A coagulação intrínseca (Figura 2) é um processo complexo e altamente interdependente que se inicia pelo grupo de fatores de coagulação. A pré-caliceína e o fator XI normalmente circulam em direção ao cininogênio de alto peso molecular (HMWK), que age como catalisador para ativação dos mesmos. Seguindo a injúria vascular, a pré-caliceína, o HMWK e o fator XII formam um complexo na superfície endotelial ou subendotelial negativamente carregada, que resulta na ativação do fator XII (fator XIIa). O fator XIIa inicia uma complexa série de reações que ativa as cininas do sistema complemento e a fibrinólise. O fator XIIa ativa o fator XI (XIa) e interage com pré-caliceína para formar a caliceína, que

interage com HMWK para formar cininas. A clivagem do fator XIIa pela calicreína, plasmina e outras enzimas proteolíticas forma fragmentos, que possuem atividade similar, porém bem mais fraca que a do fator XIIa. Ambos, calicreína e fator XIIa, com o Ca^{2+} , podem ativar o fator IX (IXa). O fator IXa, então, liga os fosfolípidos de plaquetas em um complexo com Ca^{2+} e fator VIII. Após a modificação do fator VIII em VIIIa, pela trombina, o complexo VIIIa-fator IXa/ Ca^{2+} -fosfolípido ativa o fator X para iniciar a via de coagulação comum (Baldwin et al., 1998; Mosier, 2007; Cheville, 2009).

Quadro 1. Fatores de coagulação, vias ou sistemas em que participam e suas respectivas funções.

FATOR	NOME COMUM	VIA	FUNÇÃO
I	Fibrinogênio	Comum	Forma o coágulo (fibrina)
II	Protrombina	Comum	Ativa I, V, VII, XII, proteína C e plaquetas.
III	Fator tecidual	Extrínseca	Cofator de VIIa
IV	Pro-acelerina	Comum	Requerido por fatores de coagulação para ligar-se a fosfolípidos
V	Acelerina	Comum	Cofator X, com o qual forma o Complexo protrombinase.
VII	Pro-convertina, acelerador de conversão da protrombina sérica, cotromboplastina.	Extrínseca	Fator Va
VIII	Fator A anti-hemofílico, globulina anti-hemofílica.	Intrínseca	Cofator IX
IX	Fator Christmas, fator B antihemofílico, componente de tromboplastina plasmática.	Intrínseca	Ativa o fator X
X	Fator Stuart-Power	Comum	Ativa o fator II, forma o complexo protrombinase com o fator V.
XI	Antecedente de tromboplastina plasmática	Intrínseca	Ativa os fatores XII, IX e precalicreína.
XII	Fator Hageman	Intrínseca	Ativa precalicreína e fibrinólise
XIII	Pro-transglutaminase, fator estabilizador de fibrina ou FAF, fibrinoligase.	Comum	Ligações cruzadas da fibrina
Pré-calicreína	Fator Fletcher	Intrínseca	Ativa XII e calicreína e cliva HMWK
HMWK*	Cofator de ativação de contato; Fitzgerald, Flaujeac, Williams	Intrínseca	Dá suporte à ativação dos fatores XII, XI e pré-calicreína.

*Abreviação: high-molecular-weight kininogen (cininogênio de alto peso molecular)

Fonte: Adaptado de Moran e Viele (2005)

b) Via Extrínseca

A liberação do fator III (FT) pelas células que circundam o endotélio lesionado, ou do endotélio ativado, inicia a via extrínseca (Figura 2). FT é um fosfolípídeo que contém glicoproteína de alto peso molecular encontrado na membrana plasmática de muitas células, incluindo o endotélio ativado. A produção do FT pelas células endoteliais é estimulada por substâncias como endotoxinas, FNT, IL-1, fator de crescimento transformador β (TGF- β) e trombina. Quando o fator circulante VII entra em contato com o FT, ocorre a formação do complexo FT: VII Ca^{2+} - dependente na superfície do FT exposto. Apesar de este complexo possuir alguma atividade enzimática, a ativação do fator VII por substâncias como os fatores XIIa, IXa, IIa e calicreína resulta muito mais ativa do complexo FT: VIIa. Este fator, unido ao Ca^{2+} , ativa o fator X, para dar início à via comum (Baldwin *et al.*, 1998; Mosier, 2007, Cheville, 2009).

c) Via Comum

Segundo Mosier (2007), as vias intrínsecas e extrínsecas fundem-se com a ativação do fator X (Figura 2). O fator Xa é encontrado no endotélio ou membrana fosfolipídica de plaquetas, onde pode converter o fator II em IIa (trombina). Entretanto, quando o fator Xa é combinado como fator Va e Ca^{2+} (complexo protrombinase), esta reação ocorre mais rapidamente. A trombina é um mediador multifuncional cuja principal função é clivar os fibrinopeptídeos A e B do fator I (fibrinogênio), para formar monômeros de fibrina. A remoção destes fibrinopeptídeos reduz as forças repulsivas intermoleculares, assim, os monômeros de fibrina espontaneamente formam elos com H^+ e transformam-se em polímeros solúveis de fibrina. O fator XIIIa, formado pela ação conjunta dos fatores Xa e IIa, junto ao Ca^{2+} , catalisa a formação de elos covalentes que ligam as moléculas de fibrina para formar um polímero insolúvel. O elemento de ligação transversal da rede de fibrina, aliado à contração das plaquetas e à presença abundante de cálcio, trombina e adenosina-trifosfato (ATP), causa a retração do trombo de fibrina-plaqueta. A retração reduz o tamanho do trombo para permitir que o fluxo sanguíneo continue e ocorra a união dos bordos da lesão, para uma cicatrização eficiente (Baldwin *et al.*, 1998; Mosier, 2007; Cheville, 2009).

d) Fibrinólise

Segundo Carlson & Desancho (2010), a deposição de fibrina é limitada por um sistema anticoagulante endógeno, composto por:

- **Antitrombina** - proteína plasmática, membro da família das serpinas (inibidores de proteases séricas), que inibe a atividade de todas as outras proteases ativadas.
- **Proteína C** - proteína dependente da vitamina K que age sobre os fatores Va e VIIIa para inativar fragmentos. Liga-se a um receptor de proteína C endotelial (EPCR) e é ativada pela trombina, gerando trombomodulina, outra proteína de base da membrana celular endotelial, em uma reação modulada por um cofator, a proteína S.
- **Inibidor do Fator Tecidual** - proteína plasmática que forma um complexo quaternário com o fator tecidual, fator VIIa e fator Xa, promovendo, assim, a inibição da via de coagulação extrínseca.

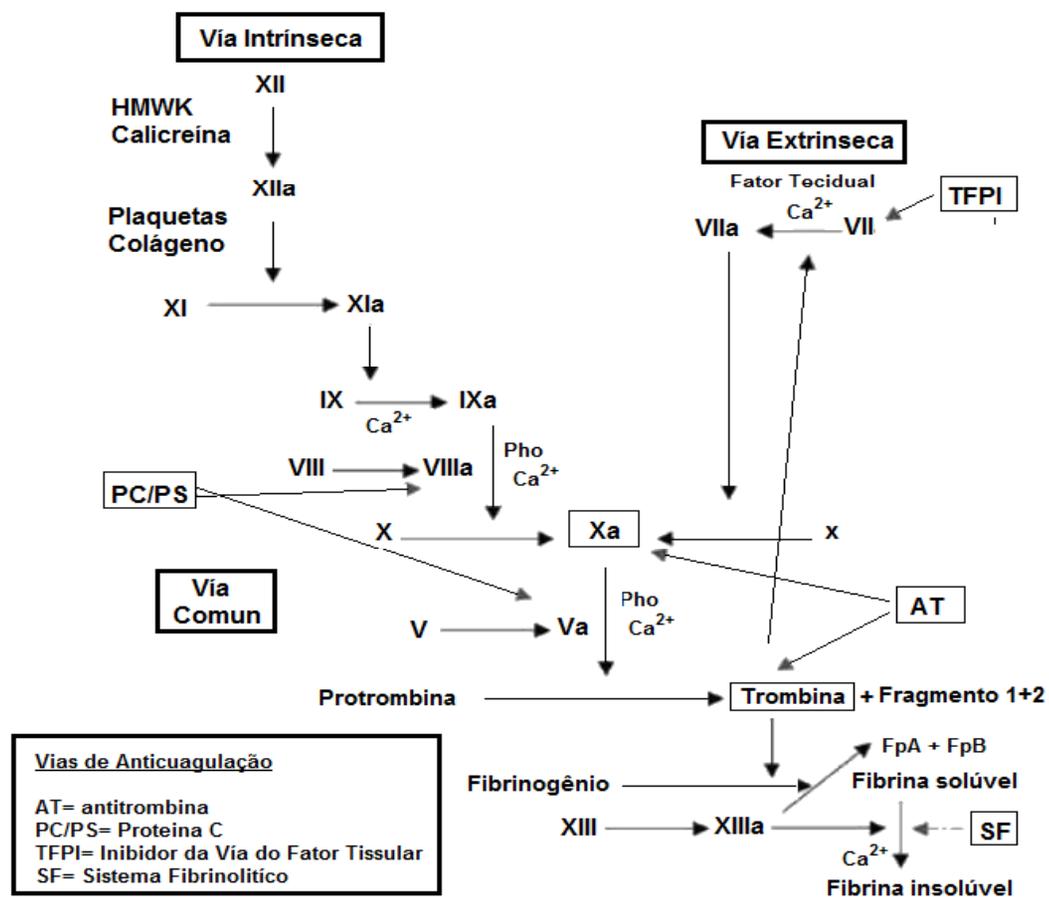


Figura 2. Esquema de ativação da cascata de coagulação pelas vias intrínseca, extrínseca e comum. Fonte: Adaptado de Mosier, 2007.

O coágulo plaquetário primário é reforçado pela formação da fibrina. A força elástica é aumentada pelas malhas cruzadas do polímero de fibrina, mediadas pelo fator XIIIa, que converte α 2-antiplasmina em fibrina, além de proteger o coágulo contra fibrinólise. Entretanto, a fibrinólise constitui um pré-requisito para a hemostasia, por uma possível tendência à formação de trombos em indivíduos com deficiência de plasminogênio. O

Ativador de Plasminogênio Tecidual (APT) é liberado pelas células endoteliais e converte plasminogênio em plasmina, uma protease. Esta reação é promovida quando o APT é liberado da fibrina e submetido a feedback positivo. A plasmina quebra o APT em uma molécula de duas cadeias, aumentando a exposição de sítios de ligação e promovendo a formação do complexo. A plasmina hidrolisa arginina e lisina, resultando na proteólise de vários substratos, incluindo o fibrinogênio, a fibrina e os fatores V, VIII e XIII. A clivagem da fibrina e do fibrinogênio gera os fragmentos X e Y, que inibem a polimerização da trombina e da fibrina, respectivamente. A excessiva fibrinólise resulta no consumo do fibrinogênio. A hemorragia é prevenida pela inibição do APT e da plasmina, pelo Ativador de Inibidor de Plasminogênio (AIP) e pela α_2 - antiplasmina (Allfor e Machin, 2004). O processo de fibrinólise encontra-se esquematizado na Figura 3.

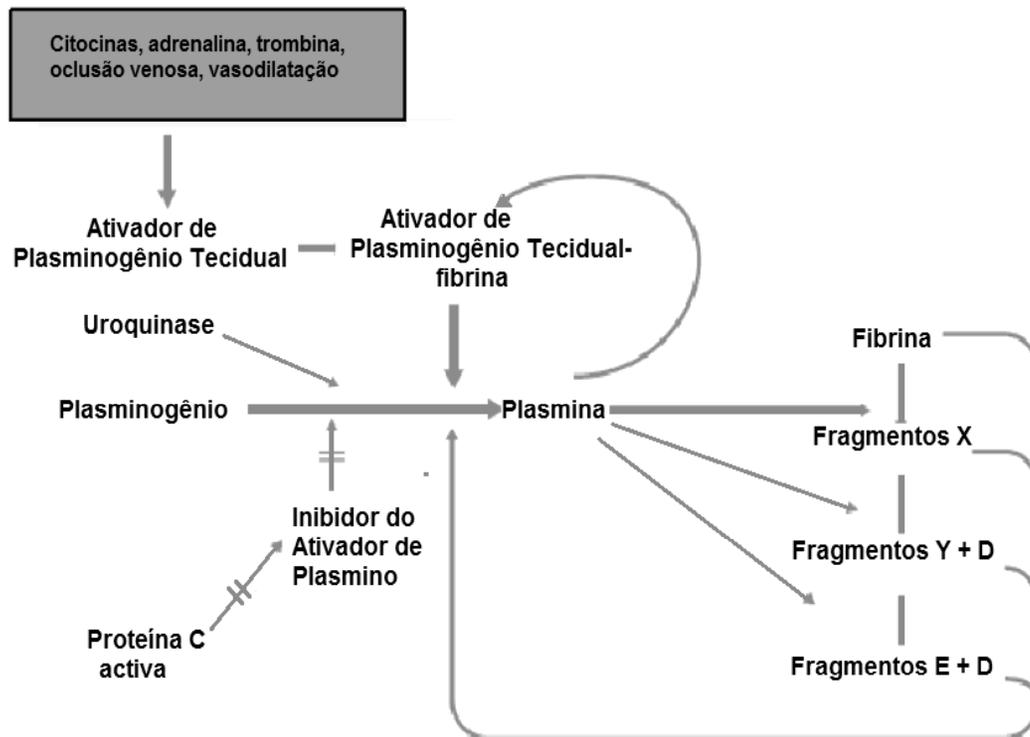


Figura 3. Esquema da fibrinólise. O Ativador do plasminogênio tecidual é liberado pelas células endoteliais na forma de cadeia simples, induzindo significativa atividade proteolítica, que é aumentada tanto pela ligação da fibrina quanta pela clivagem da plasmina na forma de cadeia dupla. A plasmina também exerce feedback positivo, convertendo o plasminogênio ativo em plasminogênio-lisina, que possui preferência pela ligação com a fibrina. Isso aumenta a produção de plasmina, focaliza a fibrinólise em direção ao coágulo e protege a plasmina gerada pela inibição promovida pela α_2 - antiplasmina. A plasmina cliva a fibrina, promovendo a formação sequencial dos fragmentos X, Y, D e E, que induzem feedback positivo. Conseqüentemente, a fibrinólise é simultaneamente iniciada. Entretanto, o APT torna-se mais acessível a seus inibidores, à medida que o coágulo é dissolvido. Isto previne excessiva fibrinólise (Fonte: Allfor e Machin, 2004).

5. Proteases

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

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

No Brasil, os estudos de proteases com ação na coagulação sanguínea têm sido realizados principalmente com as encontradas em serpentes peçonhentas do gênero *Bothrops* e *Crotalus*. De acordo com a natureza de seus sítios ativos as proteases são classificadas em serinoproteases I e II, cisteinoproteases, metaloproteases I e II e aspartilproteases, ver Quadro 2 (Neurath, 1984; Vilca-Quispe *et al.*, 2010).

Quadro 2. Classificação das proteases de acordo com a natureza dos sítios ativos

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

Fonte: Neurath, H. (1984).

6. Serinoproteases

A classe de enzimas muito bem estudadas e caracterizadas é a das serinoproteases, tendo como exemplos a tripsina, quimiotripsina e elastase, das quais a mais estudada é a tripsina. Essas enzimas apresentam elevado grau de homologia e mecanismo de catálise semelhante, embora apresentem diferenças acentuadas quanto à especificidade por substratos. Alguns mecanismos de catálise enzimática foram propostos para as serinoproteases, sendo mais aceito o mecanismo da dupla transferência de prótons do resíduo Ser₁₉₅ para o resíduo

His₅₇, e em seguida para o resíduo Asp₁₀₂, precisamente os aminoácidos que compõem o sítio ativo das serinoproteases. O resultado dessa transferência é a formação de uma carga negativa parcial que será a responsável pela catálise enzimática propriamente dita, que ocorre por meio de um ataque nucleofílico aos radicais carbonila dos resíduos de arginina e lisina dos substratos susceptíveis à tripsina (Barrett e Rawlings, 1995).

6.1. Serinoproteases da subfamília S I

As serinoproteases da subfamília S I (família da quimotripsina bovina) apresentam como principal característica um domínio tripsina é a maior de todas as famílias de proteases, com mais de 4875 sequências de enzimas identificadas até o momento. Apresentam a tríade catalítica His-Asp-Ser e as sequências de aminoácidos ao redor do sítio catalítico formam motivos muito conservados. Suas estruturas tridimensionais são extremamente conservadas.

Até o momento, todas as proteases da família S I são endopeptidases. Diversas serinoproteases da família da quimotripsina já tiveram sua estrutura tridimensional determinada, a Figura 4 ilustra a estrutura da quimiotripsina.

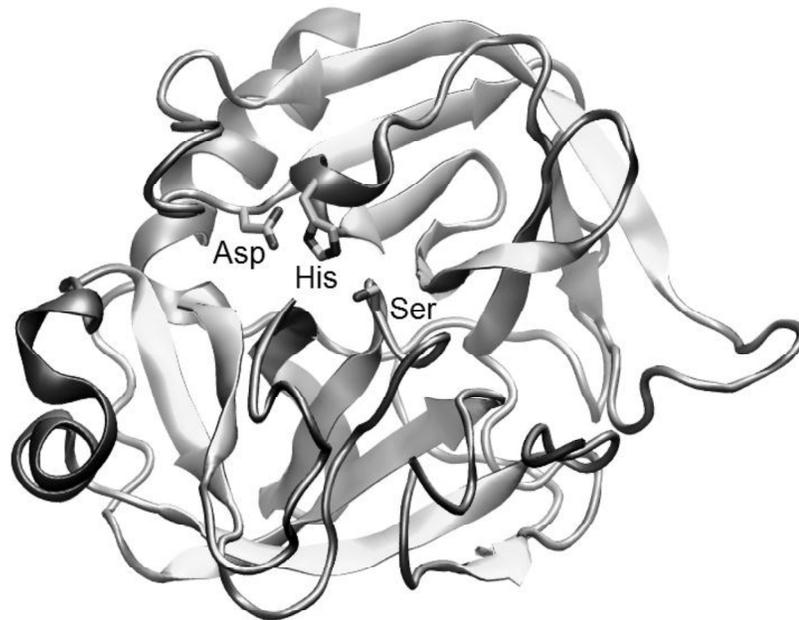


Figura 4: Estrutura da quimotripsina (Blevins & Tulinsky, 1985). Em formato cartoon, folhas betas em branco e alfa hélices em preto. Tríade catalítica; ácido aspártico, histidina e serina (da esquerda para a direita). A serina inicia a reação de clivagem enzimática via ataque nucleofílico da cadeia de substrato do grupo carbonila levando à clivagem do substrato; histidina e ácido aspártico funcionando como uma rede de retransmissão de carga com histidina, também brevemente a aceitação de uma molécula de água (Humphrey *et al.*, 1996).

As proteases desta família desempenham muitos papéis biológicos, principalmente na digestão (*p.ex.* a tripsina e a quimotripsina), homeostase (fatores da coagulação), resposta

imune mediada por Ig A (p.ex. a triptase e a *chymase* encontradas em células citotóxicas e em mastócitos), entre muitas outras atividades importantes. Por essa razão, elas têm relevância farmacêutica e biológica como alvo de drogas, relacionadas à hemóstase e ativação do sistema complemento.

As serinoproteases de venenos de serpentes (SVSPs - Snake venom serine protease) apresentam muitas destas funções, sendo bem estabelecidas as ações na cascata da coagulação, conforme ilustrado para algumas toxinas mostradas na Figura 5.

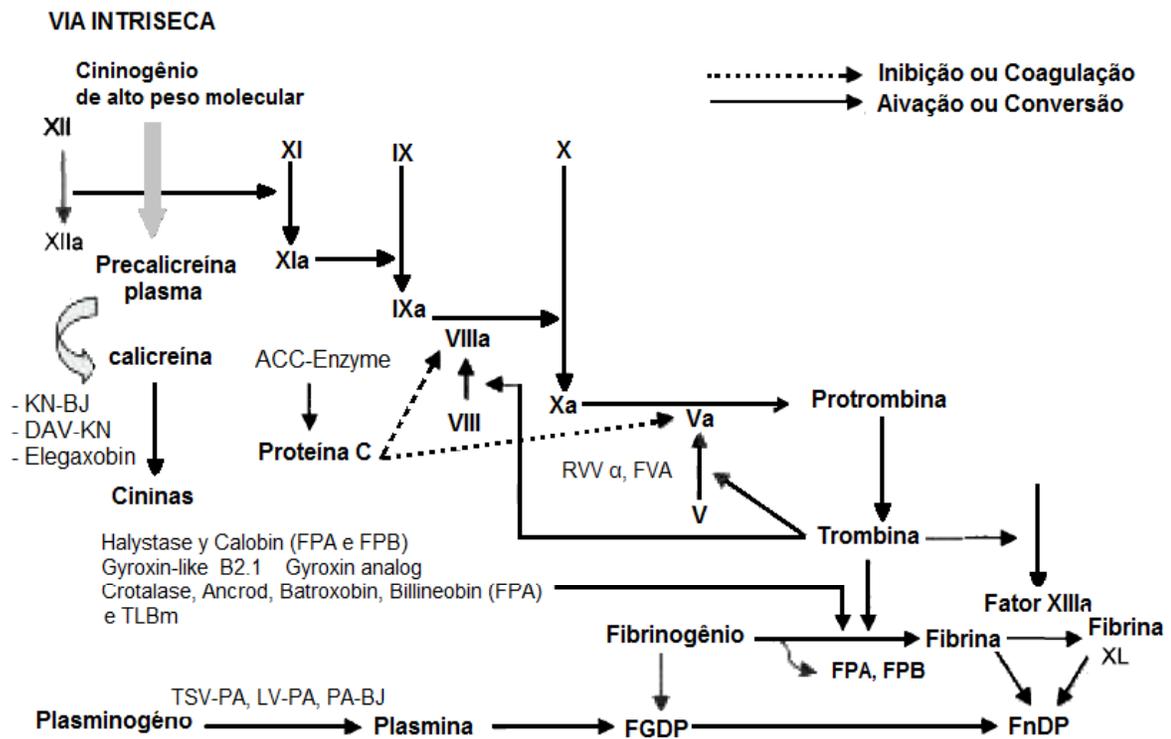


Figura 5. Algumas serinoproteases do veneno de serpentes agindo na cascata de coagulação. (Baseado em MARKLAND, 1998). **FGDP:** Fibrinogen degradation products; **FNDP:** Fibrin degradation products; **FPA:** Fibrinopeptide A; **FPB:** Fibrinopeptide B. **KN-BJ,** *Bothrops jararaca* (Serrano et al.,1998); **Dav-KN,** *Agkistrodon acutus* (Wang et al., 2001); **Elegaxobin-1,** *Trimeresurus elegans* (Oyama et al., 2002); **ACC-C** Protein C activator; *Agkistrodon contortrix contortrix* (McMullen et al, 1989); **R W - V a** *Vípera russelli proteinase*, *Daboia russelli siamensis* (Tokunaga et al., 1988); **FVA** **F**actor **V**-activating enzyme. *Vípera lebetina* (Siigur et al, 1999), **Halystase,** *Agkistrodon halys blomhofni* (Matsui et al. 1998); **Calobin,** *Agkistrodon caliginosus* (Hahn et al., 1996), **Gyroxin-like 82.1,** *Crotalus durissus terrificus*, **Gyroxin analog,** *Lachesis muta muta* (Magalhães et al.,1993); **Crotalase,** *Crotalus adamanteus* (Henschen-Edman et al.,1999); **Ancrod,** *Agkistrodon rhodostoma* **Batroxobin,** *Bothrops atrox* (Itoh et al, 1987) **Bilineobin** *Agkistrodon bilineatus* (Nikai et al., 1995);**TSV-PA,** *Trimeresurus stejnegeri* (Zhang et al., 1995); **LV-PA,** *Lachesis muta muta* (Sanchez et al, 2000); **PA-BJ,** *Bothrops jararaca* (Nikai et al., 1995); **TLBm,** *Bothrops marajoensis* (Vilca-Quispe et al., 2010).

7. Trombina “like” de venenos de serpentes (SVTLE’s)

Os venenos de serpentes contêm uma variedade de enzimas proteolíticas, como as trombinas “like” que atuam de maneira semelhante à trombina, proteína humana responsável pela coagulação do sangue. Distribuídas em vários gêneros de serpentes (*Agkistrodom*, *Bothrops*, *Lachesis* e *Trimeresurus*), assim como em víboras verdadeiras (*Bitis* e *Cerastes*) e nos colubrídeos *Dispholidus typus* (Pirkle, 1998), que são responsáveis por vários efeitos farmacológicos, como a transformação de fibrinogênio em fibrina (Meier e Stocker, 1991; Zhang *et al.*, 1998; Castro *et al.*, 2004; Vilca-Quispe *et al.*, 2010), ativando o fator V de coagulação (Kisiel, 1979; Tokunaga *et al.*, 1988) e proteína C no plasma (Kisiel *et al.*, 1987), liberando cininas de cininogênios (Petretski *et al.*, 2000) e clivando componentes do complemento C3 (Tambourgi *et al.*, 1994; Yamamoto *et al.*, 2002).

Os genes que expressam as trombinas “like” de venenos de serpentes (SVTLE’s) são membros da família da tripsina/calicreína, compostos por cinco éxons e quatro íntrons, sendo a enzima em sua forma madura codificada pelo éxons 2 até 5 a tríade catalítica sendo codificada por éxons diferentes (Itoh *et al.*, 1988). Análise comparativa da sequência primária de diversas trombinas “like” de venenos de serpentes (SVTLE’s) com serinoproteases clássicas, tais como quimotripsina, calicreína, trombina e tripsina, mostram esta relação genética (Castro *et al.*, 2004):

- a tríade catalítica clássica das serinoproteases (His57, Asp102, Ser195, tomando como base a sequência da quimotripsina) é bastante conservada nas trombinas “like” de venenos de serpentes. A trombina e a quimotripsina apresentam baixos graus de similaridade com as SVTLE’s na sequência primária (26-33% e 24-31% respectivamente), mas ainda são funcionalmente análogas a estas (Castro *et al.*, 2004).

- as trombinas “like” de venenos de serpentes (SVTLE’s) são mais semelhantes à calicreína e à tripsina (34-40% e 31-44% de semelhança estrutural, respectivamente). Compartilham não só da tríade, mas também de cinco pontes dissulfeto topologicamente equivalentes.

- a estrutura secundária das trombinas “like” de venenos de serpentes (SVTLE’s) contém estruturas do tipo folhas beta, estrutura bastante encontrada em outras serinoproteases relacionadas à quimotripsina (Perona e Craik, 1997; Krem *et al.*, 2000).

As trombinas like de venenos de serpentes (SVTLE’s) apresentam geralmente 12 resíduos de cisteína, que formam 6 pontes dissulfeto (Amiconi *et al.*, 2000; Nikai *et al.*, 1995; Parry *et al.*, 1998; Vilca-Quispe *et al.*, 2010). Estas pontes dissulfeto mostram ser essenciais para a atividade catalítica destas enzimas, uma vez que o tratamento com agentes redutores,

como β -mercaptoetanol ou ditioneitol (DTT) as inativa, como descrita para outras serinoproteases de veneno de serpente (Pirkle *et al.*, 1998; Tatematsu *et al.*, 2000). As trombinas “like” de venenos de serpentes (SVTLE’s) são inibidas por moléculas inibidoras clássicas de serinoproteases, tais como DFP (fluorofosfato de diisopropil) e PMSF (fluoreto de fenilmetilsulfonil), o que confirma a função de serinoprotease destas enzimas. (Pirkle, 1998).

As trombinas “like” de venenos de serpentes (SVTLE’s) são compostas geralmente por uma cadeia polipeptídica. A maioria apresenta glicosilações em resíduos de asparagina, mas não em posições conservadas. O conteúdo de carboidratos ligados varia largamente (0 a 30% do peso), tendo participação, às vezes, no reconhecimento de substratos pela enzima e, principalmente, na estabilização da estrutura terciária destas enzimas (Castro *et al.*, 2004).

Embora a região central próxima à tríade catalítica das trombinas “like” de venenos de serpentes (SVTLE’s) seja bastante conservada, estas enzimas apresentam consideráveis diferenças estruturais de uma para outra, o que explica as diferentes especificidades e atividades em relação aos diversos inibidores e substratos em que atuam (Krem e Di Cera, 2001). A discussão deste tema é facilitada pelo uso da nomenclatura sugerida por Schechter e Berger (1967), que será utilizada neste trabalho. Nesta nomenclatura, os aminoácidos na porção N-terminal da ligação peptídica clivada pela protease são enumerados de acordo com sua posição na cadeia, partindo da ligação (P1, P2, P3 e assim por diante). Os aminoácidos da porção C-terminal são numerados como P1’, P2’, P3’, etc. Já os sítios da enzima (um ou mais aminoácidos) que interagem com os substratos são enumerados como S1, S1’, de acordo com o aminoácido do substrato com o qual interage.

8. SVTLE’s na cascata de coagulação

A trombina cliva o fibrinogênio em duas ligações Arg-Gly, uma na cadeia A α (liberando fibrinopeptídeos A) e outra na cadeia B β (liberando fibrinopeptídeos B). Algumas trombinas “like” de venenos de serpentes (SVTLE’s) clivam o fibrinogênio em ambas cadeias, mas a maioria delas cliva o fibrinogênio em apenas uma cadeia (A α ou B β), Figura 6. As trombinas “like” de veneno de serpente podem então ser classificadas de acordo com sua atividade sobre fibrinogênio: SVTLE’s FP-A ou venobim A (clivam preferencialmente a cadeia A α liberando fibrinopeptídeos A), SVTLE’s FP-B ou venobim B (clivam preferencialmente a cadeia B β liberando fibrinopeptídeos B) e SVTLE’s FP-AB ou venobim

AB (clivam as cadeias A α e B β liberando fibrinopeptídeos A e B) (Kornalik, 1990; Markland, 1997; Braud *et al.*, 2006; Ponce-Soto *et al.*, 2007; Vilca-Quispe *et al.*, 2010).

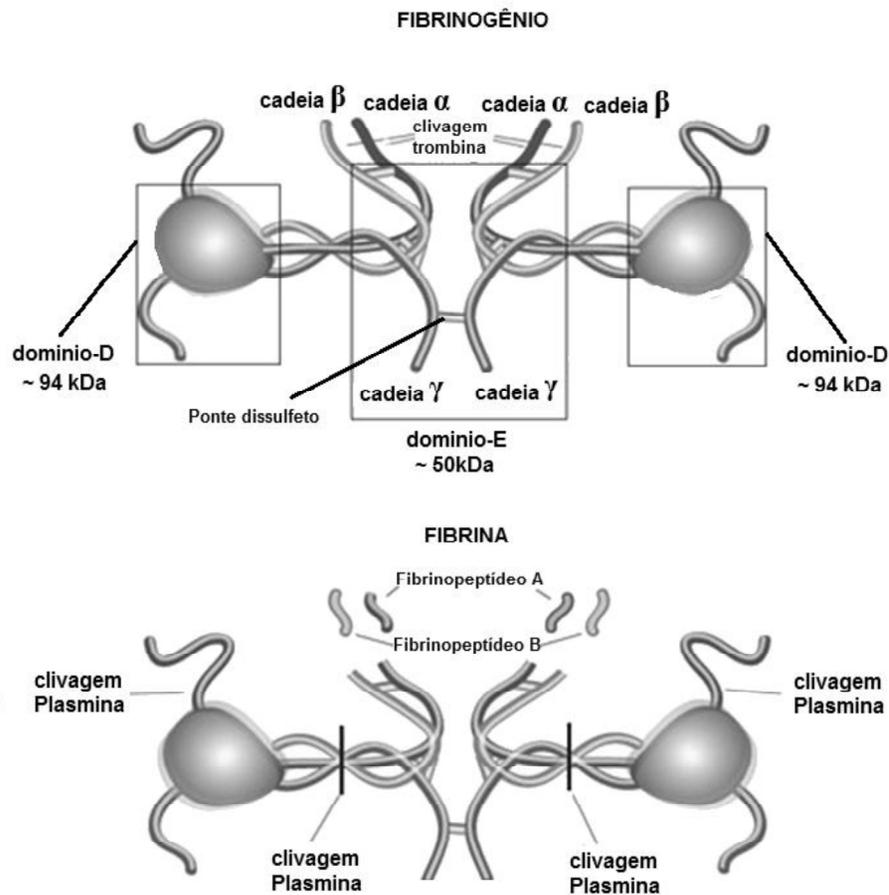


Figura 6. Na Primeira figura, representação esquemática da molécula de fibrinogênio. Esta composta de três regiões, os dois fragmentos terminais são chamados de domínio D, compostos de duas cadeias compactas dobradas (β e γ). Cada região terminal também contém uma cadeia α que é hidrofílica e flutua livremente na solução. O fragmento central é chamado de domínio E. A distância média entre o domínio E e domínio D é de aproximadamente 22 nm. Na presença de trombina, a molécula de fibrinogênio polimeriza para formar uma rede tridimensional, um fragmento E ser capaz de interagir com os fragmentos terminal D de quatro outras moléculas de fibrinogênio. **Na segunda figura**, degradação do fibrinogênio na cadeia A α (liberando FPA) e outra na cadeia B β (liberando FPB). (Adaptado de Zaganelli *et al.*, 1996)

9. Justificação do trabalho

Para esse estudo, foi escolhida a serpente *Bothrops andianus*, motivada, pela ausência de trabalhos publicados como também pelo habitat que faz que o veneno tenha uma microevolução e apresente fenótipo clínico diferenciado sobre a vítima em relação aos outros acidentes botrópicos.

A análise dos sintomas das vítimas picadas pela *Bothrops andianus* incluem hemorragia, edema e até necrose, a existência de uma mistura complexa de componentes fisiológica e farmacologicamente ativos na constituição do veneno que impedem o sangue de coagular. São esses componentes estudados para aumentar o conhecimento sobre o estado clínico da vítima.

Também como modelo molecular contribui para os estudos futuros do desenho de novos fármacos que poderá ser usado, de maneira individual ou em conjunto, com outras drogas já disponíveis no mercado, no tratamento de doenças hemostáticas.

Pensar hoje em um medicamento que ajude no tratamento dessas patologias nada mais é que pensar em um futuro próximo. Porém, há um longo caminho entre o estudo da enzima TLBan e a elaboração de uma nova droga que possa estar disponível no mercado. Pode levar anos para um medicamento ser comercializado, mas o primeiro passo para que isso aconteça já foi dado neste presente trabalho.

OBJETIVOS

Objetivo geral

- Purificar e caracterizar biologicamente uma nova serinoprotease com atividade trombina “like” do veneno total de *Bothrops andianus*.

Objetivos específicos

- Purificar uma serinoprotease com atividade trombina “like” por meio da combinação da cromatografia líquida convencional (exclusão molecular) e de alta eficiência (RP-HPLC) a partir do veneno total de *Bothrops andianus*.
- Determinar a massa molecular da trombina “like” purificada, por meio da eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) e espectrometria de massa (MALDI-TOF) e
- Caracterizar estruturalmente a trombina “like” purificada através da sequência de aminoácidos, homologia sequencial e composição de aminoácidos.
- Avaliar a atividade cinética e os fatores (PMSF, EDTA, SBIT e íons divalentes) que afetam a velocidade de reação, da trombina “like” purificada.
- Caracterizar a atividade biológica da trombina “like”: atividade fibrinogenolítica, efeito dos íons divalentes sobre atividade fibrinogenolítica, efeito do pH sobre a atividade fibrinogenolítica, índice de coagulação (IC), dose mínima coagulante (DCM) e agregação plaquetária.

MATERIAIS E MÉTODOS

1. Veneno

O veneno total de *Bothrops andianus* foi cedido pela Profa. Dra. Corina Vera Gonzáles, da Escola de Química da Universidade Nacional de San Agustín de Arequipa – Peru.

2. Animais

Foram utilizados camundongos da linhagem SWISS, com peso entre 18-20g, fornecidos pelo Biotério Central da Unicamp. Os animais foram mantidos em gaiolas abastecidas com água e ração, em ambiente com temperatura e iluminação controladas (12 horas com luz e 12 horas sem luz). Todos os experimentos foram feitos de acordo com as normas estabelecidas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal – COBEA e aprovado pela CEVA, protocolo N° 2288-1 (Anexo 1).

3. Reagentes

Todos os solventes, produtos e reativos químicos utilizados foram de alto grau de pureza, procedentes de Aldrich (Aldrich Chemical Co, Inc. - Wisconsin, U.S.A.), Applied Biosystems (Applied Biosystems - Perkin Elmer Division, U.S.A.), Bio-Rad (Bio Rad Laboratories - California, U.S.A.), Merck (Merck - Darmstadt, Germany), Sigma (Sigma Chemical Co - St. Louis, U.S.A.), Pierce (Pierce Chemical Company - Illinois, U.S.A.).

4. Purificação da Trombina “like” procedente do veneno total de *Bothrops andianus*

4.1. Cromatografia de exclusão molecular em coluna de Sephadex G – 75

50 mg do veneno total foram homogeneizados em 1,0 mL de tampão bicarbonato de amônio (AMBIC) 50 mM, pH 8.0 e centrifugados a 4,528 x g durante 5 minutos. O sobrenadante límpido obtido foi aplicado numa coluna exclusão molecular Sephadex G-75 (Kontex Flex Colum 78 x 2cm) previamente equilibrada com tampão AMBIC 50 mM. A amostra foi coletada a um fluxo constante de 0,25 mL/min no coletor de frações automático da Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden. O perfil proteico foi monitorado na absorvância de 280 nm, utilizando o espectrofotômetro 700 Plus (Femto, Brasil). O pico de interesse foi liofilizado e armazenado a -20 °C (Ponce-soto *et al.*, 2007).

4.2. Cromatografia em HPLC de fase reversa

A fração com atividade trombina “like” foi submetida à cromatografia em HPLC de fase reversa, utilizando a coluna μ - Bondapak C-18 (0,78 X 30 cm) (Waters Corporation). 5 mg da fração foram homogeneizados com 200 μ L de tampão A (ácido trifluoroacético TFA 0,1 %) e centrifugados a 4,528 x g, por um tempo de 9 minutos. O sobrenadante límpido obtido foi aplicado na coluna μ -Bondapak C-18, previamente equilibrada com tampão A por 15 minutos. A eluição do material é realizada a um fluxo constante de 1,0 mL/min com gradiente linear de acetonitrila 66% (Tampão B) + TFA 1% (Tampão A) e monitorada na absorbância de 280 nm. As frações coletadas foram liofilizadas e armazenadas a -20 °C. (Ponce-Soto *et al.*, 2006 e Vilca - Quispe *et al.*, 2010).

5. Determinação da massa molecular da fração I-4 (TLBan)

5.1. Eletroforeses em SDS – PAGE

A eletroforese em gel de poliacrilamida foi realizada segundo a metodologia descrita por Laemmli (1970). Géis de poliacrilamida (SDS-PAGE) descontínuos, apresentando um gel de concentração de 5 % (stacking gel) e gel de corrida de 10 % (Running gel). O gel de corrida foi preparado utilizando-se o tampão Tris-HCl 1,0 M, pH 8,8 contendo SDS 20 % para solubilização das amostras, 0,1% de N-N-N-N-Tetrametiletilenediamina (TEMED) 0,1 % e persulfato de amônio (PSA) 10 % para polimerização. Após a polimerização deste, foi preparado o gel superior (gel de concentração) com 5% de acrilamida em tampão Tris-HCl 1,0 M; pH 6,8; SDS 0,2%, TEMED 0,1% e persulfato de amônio 10%).

As amostras foram dissolvidas em tampão de amostra (Tris HCl 0,075 M; pH 6,8 glicerol 10 %; SDS 4% e azul de bromofenol 0,001%) na proporção de 1:1. As quais foram fervidas a 95 °C durante 5 minutos. 15 μ l de amostras e marcadores moleculares foram aplicadas no gel. A corrida eletroforética foi realizada em amperagem constante de 30 mA e voltagem livre durante 90 minutos. Foram usados os seguintes marcadores de massa molecular: Fosforilase b (97,4 kDa), albumina sérica bovina (66,2 KDa), Ovoalbumina (45 KDa), anidrase carbônica (31 KDa), inibidor de tripsina de soja (21,5 KDa), lisozima (14,4 KDa). Após corrida o gel foi corado overnight com solução de comassie blue 0,05 % O excesso de corante foi retirado com solução de ácido acético 10 %.

5.2. Ensaio de glicosilação

Para análise de N-glicosilação e do ácido siálico, a fração I-4 (TLBan) foi previamente tratada com PNGase F e neuraminidase, respectivamente. O procedimento foi realizado de acordo com as instruções de fabricação (NewEngland Biolabs Inc, Ipswich, MA), a incubação da fração I-4 (TLBan) foi feita com tampões e enzimas do kit a 37 ° C por 2h. Os produtos da reação foram visualizados por SDS-PAGE.

5.3. Espectrometria de massa Maldi-Tof

A massa molecular da fração I-4 (TLBan) foi confirmada pela espectrometria de massa utilizando-se um Voyager de PRO MALDI-TOF mass spectrometry (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). 1 µL da amostra em TFA 0,1 % foi misturada em 2 µL da matriz de ácido sinapínico (ácido 3,5-dimethoxy-4-hydroxycinnamic). A matriz foi preparada com 30 % de acetonitrila e 0,1 % de TFA. As condições de trabalho foram: aceleração de voltagem 25 kV, laser ajustado a 2890 mJ/cm² em 300 ns e a análise foi realizado no modo linear (Ponce-Soto *et al.*, 2010).

6. Análise de composição de aminoácidos da fração I-4 (TLBan)

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

A reação de hidrolises foi feita dissolvendo as amostras em solução de acetonitrila 66 %, 10 µl dessa solução o equivalente a 2 nmoles de amostra foram secadas em vácuo, seguida de uma reação ácida de HCl/Fenol por 24 horas. As seguintes etapas antes da análise foram de redryng (basificar o ácido depois da hidrólise para conseguir o pH correto) e a derivatização

A análise dos aminoácidos PITC foi realizada em HPLC, usando coluna C-18 µ-Bondapak (3,9 mm X 15 cm) em cromatografia de fase reversa com uma gradiente linear de 0 a 100% de acetonitrila 60% por 21 min. A identificação de cada aminoácido foi feita em relação a um corrido padrão de aminoácidos PITC (Bidingmeyer et al., 1984).

7. Determinação da estrutura primária (sequenciamento e homologia) da fração I-4 (TLBan)

7.1. Redução e alquilação.

A fração I-4 (TLBan) foi ressuspenso em uréia 8 M contendo DTT 10 mM a pH 8,0 e os pontes de dissulfeto foram então reduzidas por incubação a 37 °C por 2 h. Como o número de resíduos de cisteína na proteína foi inicialmente desconhecida, a concentração ótima de iodoacetamida, alquilantes para a tióis livres, foi obtido de forma empírica com base nos resultados obtidos a partir de incubações, utilizando diferentes concentrações de quantidades iodoacetamida, com cada mistura sendo analisados por espectrometria de massa (Ponce-Soto *et al.*, 2010). Com base nesses experimentos preliminares, um excesso de 30% molar relativa de iodoacetamida ao número total de tióis acabou por ser escolhida e a mistura foi incubada por 1,5 h a 37 ° C no escuro. A reação foi cessada, injetando a mistura em uma coluna RP-HPLC seguido de liofilização do pico coletado.

7.2. Hidrólise enzimática.

A fração I-4 (TLBan) foi hidrolisada com tripsina pancreática bovina de grau sequência em bicarbonato de amônio 0,4 % a pH 8,5 durante 4 horas a 37°C, numa proporção enzima:substrato de 1:100 (v/v). A reação foi parada por liofilização.

7.3. Espectrometria de massa

Todos os espectros de massa foram adquiridos através de um quadrupolo de tempo de voo (Q-TOF) híbrido espectrômetro de massa Q-TOF Ultima em Micromassa (Manchester, UK) equipado com um sistema operacional de fonte nano Zspray em modo íon positivo. As condições de ionização de uso, incluem uma capilaridade de voltagem de 2,3 kV, um cone de voltagem e lente RF1 de 30 V e 100 V, respectivamente, e uma energia de colisão de 10 V. A temperatura da fonte foi de 70 °C e o cone gás foi N₂ em um fluxo de 80 L/h; o gás nebulizado não foi usado para obter o sprays. O Argônio foi utilizado para o resfriamento da colisão e fragmentação dos íons na colisão da célula. Calibração externa com iodeto de sódio foi feita em uma faixa de massa 5-30 m/z. Todos os espectros foram adquiridos com o analisador de TOF em “vmode” (TOF = 9,1 kV) e a voltagem conjunto de MCP foi 2150 V.

7.4. Análise das proteínas nativas e alquiladas

As frações de proteínas nativas e alquiladas intactas foram dissolvidas em acetonitrila 10% em TFA 0,1% e foi introduzida na fonte de espectrômetro de massa com uma bomba de seringa, a um fluxo de 500 nL/min. Os espectros de massa foram adquiridos na faixa de massa de 1000-2800 m/z para a proteína nativa e sobre o rango de 800-2000 m/z para as proteínas alquiladas, ambas a uma velocidade de varredura de 1 s/scan.

As massas foram analisadas pelo algoritmo de deconvolução MassLynx-MaxEnt 1. Os dados obtidos foram processados usando o software Mascote MS/MS Íon Search. <http://www.matrixscience.com>

7.5 De novo sequenciamento de peptídeos trípticos

Os peptídeos trípticos alquilados, fracionados por RP-HPLC foram liofilizadas e ressuspensas em acetonitrila 20 % em TFA 0,1 % antes da injeção na fonte de espectrômetro de massa num fluxo de 500 nL/min. Antes de realizar um espectro de massa em tandem, um ESI/MS espectro de massa (TOF MS mode) foi feito para cada fração de HPLC na faixa de massa de 4-200 m/z, a fim de selecionar o íon de interesse, posteriormente, estes íons foram fragmentada na célula de colisão (TOF modo MS / MS). As diferentes energias de colisão foram usadas, dependendo da relação massa e carga dos íons. O resultado espectros de íon-produto foram adquiridos pelo analisador TOF e deconvoluídos usando o algoritmo MassLynx-MaxEnt 3. Espectros cargados foram processadas manualmente utilizando o aplicativo PepSeq incluído no MassLynx.

8. Atividade proteolítica

A determinação da atividade proteolítica da trombina “like” purificada do veneno de *Bothrops andianus* foi realizada segundo a metodologia descrita por Erlanger, *et al.*, (1961) e modificado por Ponce-Soto *et al.*, (2007).

Foi usado o substrato cromogênico sintético N α -BENZOIL-DL-ARGININA P-NITROANILIDA (BAPNA). Este substrato foi dissolvido em dimetilsulfoxido (DMSO), 43,6 mg/ml e 10 μ L desta solução foi misturado em 1 mL de tampão (Tris-HCl 10 mM, CaCl₂ 10 mM, NaCl 100 mM, pH=7.8) que foi a solução substrato cromogênico (0,1 M). A mistura para o ensaio da atividade proteolítica conteve 45 μ L de tampão (Tris-HCl 10 mM, CaCl₂ 10 mM, NaCl 100 mM, pH=7.8), 180 μ L de solução de substrato cromogênico BAPNA (0,1 M), 10 μ L de água e 5 μ L da amostra, com volume final de 240 μ L. Após a adição de 5 μ L da

amostra em teste, a mistura foi colocada em um meio de incubação, por 40 minutos, a 37°C, e as absorbâncias foram lidas em intervalos de 10 minutos. A atividade enzimática foi baseada no aumento da absorbância após 20 minutos, através da liberação do cromóforo *p*-nitroanilina, que é detectado na absorbância de 410 nm. O ensaio foi realizado em triplicata num VERSA Max microplate reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA).

9. Estudos cinéticos da fração I-4 (TLBan)

9.1. Efeito da concentração do substrato

Para a determinação do efeito da concentração do substrato sobre a atividade da trombina “like” de *Bothrops andianus*, foi realizado o método descrito no item 8. A variação da concentração do substrato foi feita em diluição seriada (10; 5; 2.5; 0.62; 0.3125; 0.1563; 0.0782; 0.0391; 0.0195 e 0.0097 mM). O ensaio foi realizado em triplicata e lido a 410 nm no leitor de microplacas VERSA Max (Molecular Devices, Sunnyvale, CA).

9.2. Efeito da temperatura

O efeito da temperatura sobre a atividade da trombina “like” de *Bothrops andianus* foi analisado durante o ensaio descrito no item 8 variando a temperatura de 25 a 60 °C foram feitos em triplicata e a reação lida na absorbância de 410 nm no equipamento já descrito.

9.3. Efeito do pH

Da mesma forma, o efeito de pH foi analisado durante a realização do ensaio descrito no item 8, utilizando tampões com valores diferentes de pH (6,0 a 10,0). Os tampões utilizados neste experimento foram tampões fosfato–NaCl (pHs 6.0 e 7.0), tampão Tris–HCl (pH 8.0) e tampão glicina–NaOH (pHs 9.0 e 10.0), respectivamente.

9.4. Efeito dos íons divalentes na atividade proteolítica

Da mesma forma, o efeito dos íons divalentes foi analisado durante a realização do ensaio descrito no item 8. TLBan foi diluída em tampão Tris–HCl 0,1 M pH 7.4 na proporção de 1 mg/ml e pré-incubada com os íons por 10 minutos a 37 °C. Os íons divalentes foram: Mg^{+2} , Mn^{+2} , Cd^{+2} , Zn^{+2} e Ca^{2+} (1 mM) os quais foram dissolvidos com tampão Tris-HCl 10 mM pH 8.0.

9.5. Inibição da atividade serinoprotease

A atividade específica da trombina “like” de *Bothrops andianus* frente aos diferentes inibidores foi calculada seguindo o mesmo protocolo para a determinação da atividade proteolítica no item 8. TLBan foi diluída em tampão Tris-HCl 0,1 M pH 7.4 na proporção de 1 mg/ml e foram pré-incubada com os inibidores por 15 minutos a 37°C, as proporções da enzima TLBan com o inibidor estão em 1:1 (v/v) após isso a amostra pré-incubada foi colocada no meio de reação e a velocidade de reação é expresso em quantidades de produto formado de p-nitroanilina liberado após a catálise.

Os inibidores testados foram: polimetilsulfonilfluoride PMSF (5 mM) dissolvido em água, inibidor tripsina de soja SBT-I (5 µg/µL) dissolvido em tampão Tris-HCl 50 mM pH 7,8 e o ácido etilendiamintetracético EDTA (5 mM) dissolvido em água, como agente quelante de íons metálicos.

10. Determinação da atividade biológica da trombina “like” isolada do veneno de *Bothrops andianus*

10.1. Atividade coagulante

20 µL de veneno total e das frações foram adicionados a tubos de vidro (1,0 x 7,0 cm), contendo 900 µL de fibrinogênio bovino purificado (2,0 mg/mL) e 100 µL de CaCl₂. A preparação foi incubada a 37 °C e os tempos de coagulação foram determinados. A coagulação é expressa como índice de coagulação (IC) obtido pela equação: $IC = t^{-1} \times 1000$, onde t^{-1} = inversa do tempo. A dose mínima coagulante (MCD) é definida como a menor quantidade de veneno ou fração purificada completamente capaz de coagular o fibrinogênio dentro de 1 min (Cavinato *et al.*, 1998) .

10.2. Degradação do fibrinogênio

Esta atividade foi avaliada em gel descontinuo de Poliacrilamida (SDS-PAGE) como estabelecido por Ware e Seegers (1949) e modificada por Rodrigues *et al.*, (2000). 450 µL de fibrinogênio bovino (2 mg/mL tampão Tris-HCl 10mM pH 7,8) e misturado com 50 µL de uma solução salina (CaCl₂ 10 mM pH 7,8) após foi preincubada por 10 minutos a 37 °C.

10 µL da enzima TLBan foi adicionada à solução de fibrinogênio, foram incubadas por diferentes períodos de tempo: 0, 0:30, 1, 2, 3, 6, 9, 12 e 24 h a 37 °C após destes tempos, as reações foram interrompidas com 300 µL de uma solução desnaturante (8,5 M Ureia, β-

Mercaptoetanol 10%, SDS 2%, EDTA 2 mM; Tris-HCl 20 mM pH 8,0), amostras foram analisadas em SDS-PAGE 10 %.

10.3. Efeito dos íons divalentes na atividade fibrinogenolítica

Efeito dos íons divalentes sobre a atividade fibrinogenolítica da TLBan foi realizado segundo o método descrito no item 10.2. Variando o tampão de trabalho da solução de fibrinogênio pelos íons divalentes: Mg^{+2} , Mn^{+2} , Cd^{+2} , Zn^{+2} e Ca^{2+} 10 mM, os quais foram dissolvidos com tampão Tris-HCl pH 7,8.

10.4. Efeito do pH na atividade fibrinogenolítica

Efeito do pH sobre a atividade fibrinogenolítica da trombina “like” de *Bothrops andianus* foi realizado segundo o método descrito no item 10.2. Com tampões preparados com diferentes valores de pH (4,0–10,0). Os tampões utilizados neste experimento foram tampão citrato de sódio–HCl (pHs 4,0 e 5,0), tampão fosfato NaCl (pHs 6,0 e 7,0), tampão Tris–HCl (pH 8,0) e tampão glicina–NaOH (pHs 9,0 e 10,0).

10.5. Determinação da Agregação plaquetária

Para a dosagem da agregação plaquetária foi utilizada o método de Born (1963) que quantifica a formação dos agregados plaquetários in vitro quando as plaquetas são estimuladas.

Para este ensaio foram coletados 10 mL de sangue de 10 camundongos com 8 semanas de idade com pesos de 20 g. O sangue foi coletado da aorta abdominal em uma seringa de poliestireno contendo 1 volume de ACD (Citrato trissódico dihidratado 85 mM, ácido cítrico monohidratado 66.6 mM e D(+) glicose anida 111 mM) para 6 volumes de sangue. A quantidade de sangue obtido de cada camundongo com peso de 20g foi de 1 mL, aproximadamente. Para a preparação dos estudos da agregação plaquetária, o sangue total foi colocado em banho-maria a 37 °C por 30 minutos.

Para a obtenção do plasma rico em plaquetas (PRP) o sangue foi centrifugado a 180g por 10 minutos logo o sobrenadante foi transferido a outro tubo de poliestireno para a obtenção do plasma pobre em plaquetas (PRP) o sangue foi centrifugado a 1500 g por 10 minutos.

Antes de começar o ensaio, o agregômetro foi previamente calibrado com PRP no mínimo de transmitância e com PPP no máximo de transmitância. Com isso, foi possível

determinar uma amplitude para o registro de agregação. A determinação da agregação plaquetária foi realizada com uma solução de trombina bovina (10 unidades NIH/ml) como controle positivo, a enzima serinoprotease TLBan (1 mg/mL) e a mesma TLBan pré-incubado com PMSF (5 mM) (volumem 1/1) como controle negativo.

11. Análise Estatística

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

Os dados foram analisados fazendo uso do pacote Office – Microsoft Excel e do Software Origin 6,0.

RESULTADOS

1. Isolamento da serinoprotease com atividade trombina “like” do veneno de *Bothrops andianus*

1.1. Cromatografia de exclusão molecular em coluna de Sephadex G – 75

O perfil cromatográfico do veneno de *Bothrops andianus* em Sephadex G - 75 mostrou três picos, denominados I, II e III (Fig. 7). As frações foram submetidas a ensaios de atividade proteolítica sobre substrato cromogênico DL-BApNA (Fig. 8), sugerindo a presença da serinoprotease de interesse na fração I, que logo foi liofilizada e submetida à cromatografia de HPLC de Fase Reversa (Fig. 9).

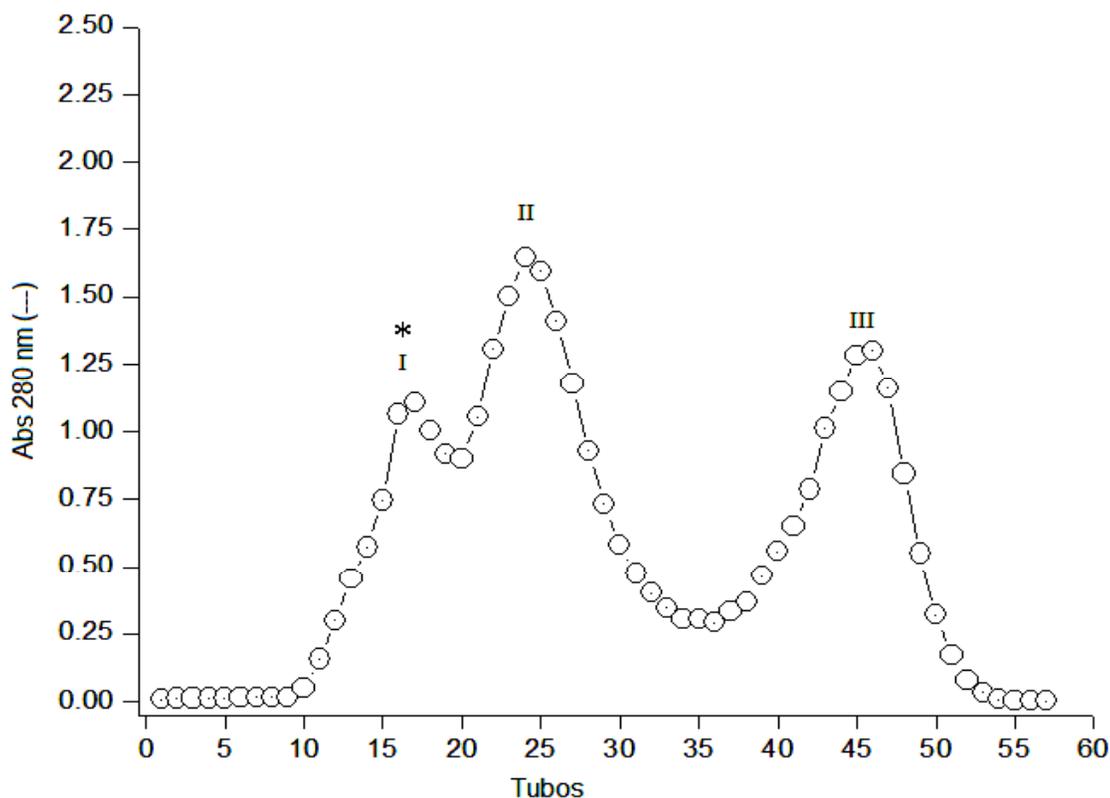


Figura 7. Perfil cromatográfico da purificação do veneno total de *Bothrops andianus* em uma coluna de Sephadex G-75. 50 mg do veneno total foram homogeneizados em 1,0 mL de tampão bicarbonato de amônio (AMBIC) 50 mM, pH 8,0 e centrifugadas a 4,528 x g durante 5 minutos. O sobrenadante límpido obtido anteriormente foi aplicado na coluna exclusão molecular Sephadex G-75 (Kontex Flex Colum 78 x 2 cm) previamente equilibrada. (*) Pico I, que apresenta a proteína de interesse.

1.2. Atividade proteolítica das frações do veneno total de *B. andianus*

A Figura 8 mostra a atividade proteolítica medida no veneno total e nas frações obtidas da cromatografia de exclusão molecular Sephadex G - 75.

O veneno total de *B. andianus* apresentou $0,072 \pm 0,005$ nmoles/min e a fração I resultante da cromatografia em Sephadex foi de $0,197 \pm 0,05$ nmoles/min. O perfil da atividade proteolítica frente ao substrato cromogênico DL-BApNA mostra que a fração I contém a maior atividade proteolítica, podendo sugerir a presença da serinoprotease de interesse.

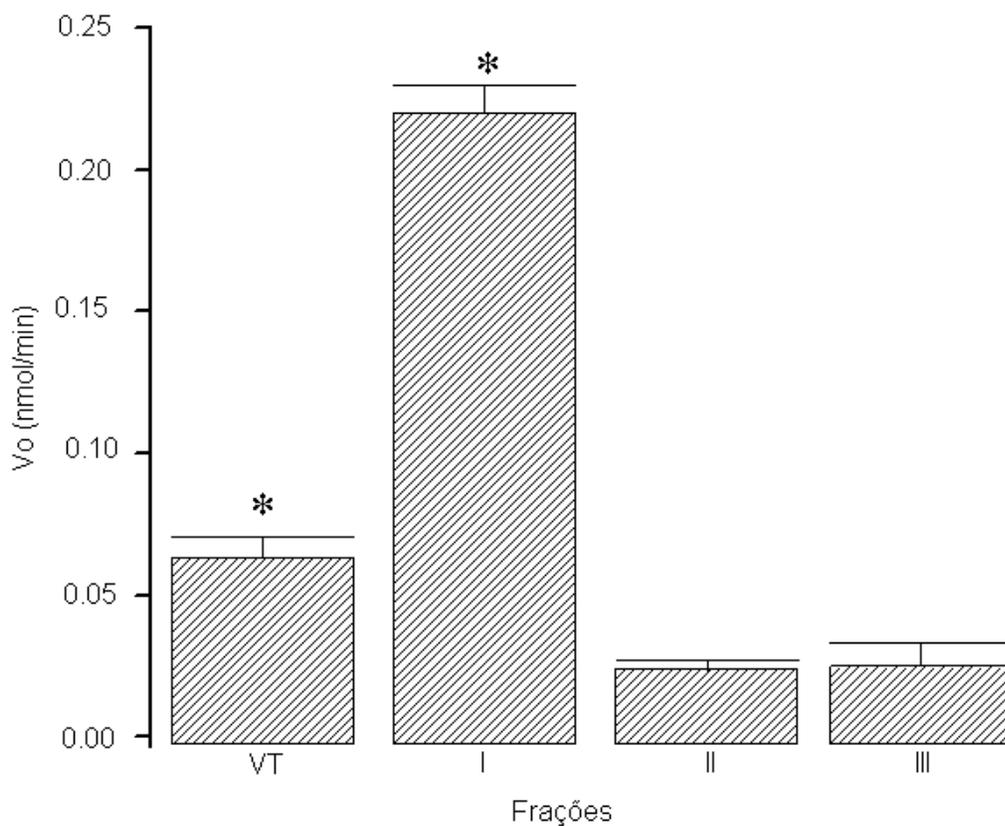


Figura 8. Atividade proteolítica das frações obtidas da cromatografia de exclusão molecular em Sephadex G-75 e do veneno total de *Bothrops andianus*. Foram usados 43,6 mM de substrato cromogênico DL-BApNA por 20ug da amostra de cada fração. O perfil da atividade proteolítica foi monitorado na absorvância de 410 nm. (*) Frações que apresentaram atividade proteolítica.

1.3. Cromatografia em HPLC de fase reversa

A Figura 9 mostra o perfil cromatográfico da fração I, quando submetida à coluna analítica μ -Bondapak C-18 (Waters), acoplada a um sistema de HPLC de fase reversa, observamos a presença de 10 picos, que foram submetidos a ensaios de atividade proteolítica sobre substrato cromogênico DL-BAPNA (Fig.10) sugerindo a presença da serinoprotease de interesse no pico I-4 (TLBan), este pico foi novamente submetido a HPLC nas mesmas condições já mencionadas, mostrando um alto grau de pureza (Figura inserida ao lado esquerda do perfil cromatográfico).

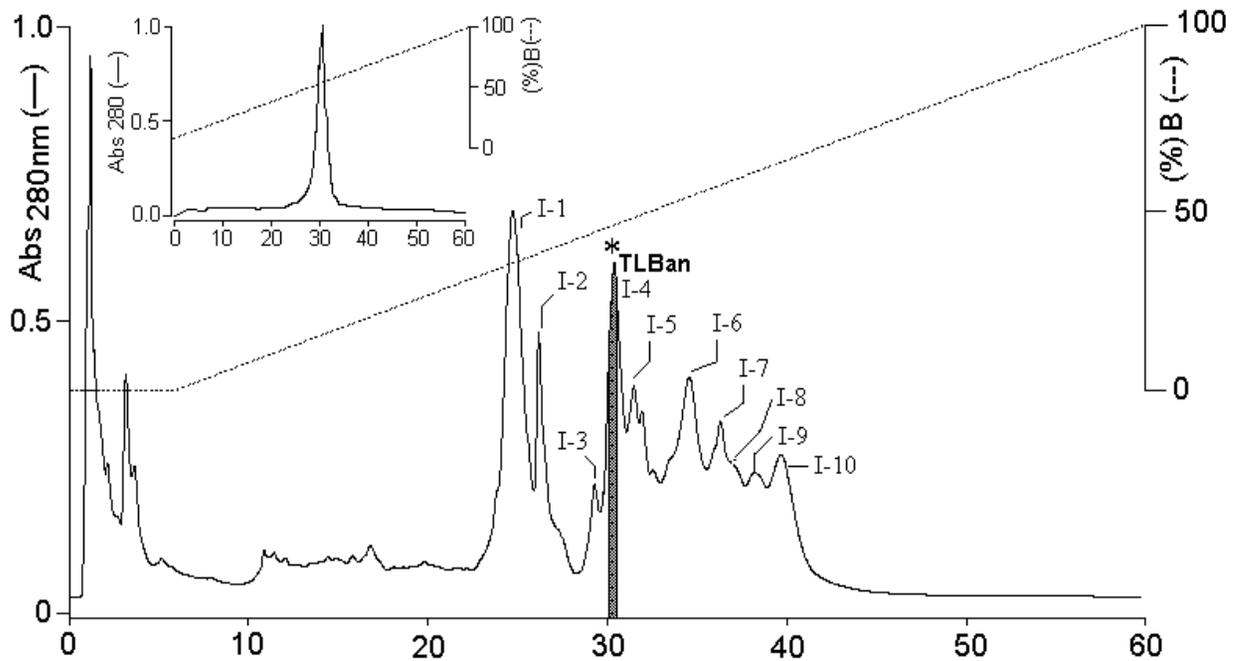


Figura 9. Perfil cromatográfico da fração I utilizando uma coluna analítica μ -Bondapak C-18 (Waters) acoplada a um sistema de HPLC de fase reversa. 5mg da fração I foram dissolvidos em 200 μ L de TFA 0,1% e foi aplicado na coluna. A eluição da amostra é usando um gradiente linear contínuo de concentração do tampão B (Acetonitrila 66%), tampão A (TFA 0,1%). O perfil cromatográfico foi monitorado na absorvância de 280 nm. As frações foram eluídas em um fluxo constante de 1 mL/min. Figura inserida na esquerda no perfil cromatográfico mostra a fração com alto grau de pureza.

1.4. Atividade proteolítica da fração TLBan

Os resultados evidenciam que a fração I-4 foi a que apresentou maior atividade proteolítica frente ao substrato cromogênico DL-BAPNA, 19.39 ± 0.698 nmol/min de acordo com a Figura 10.

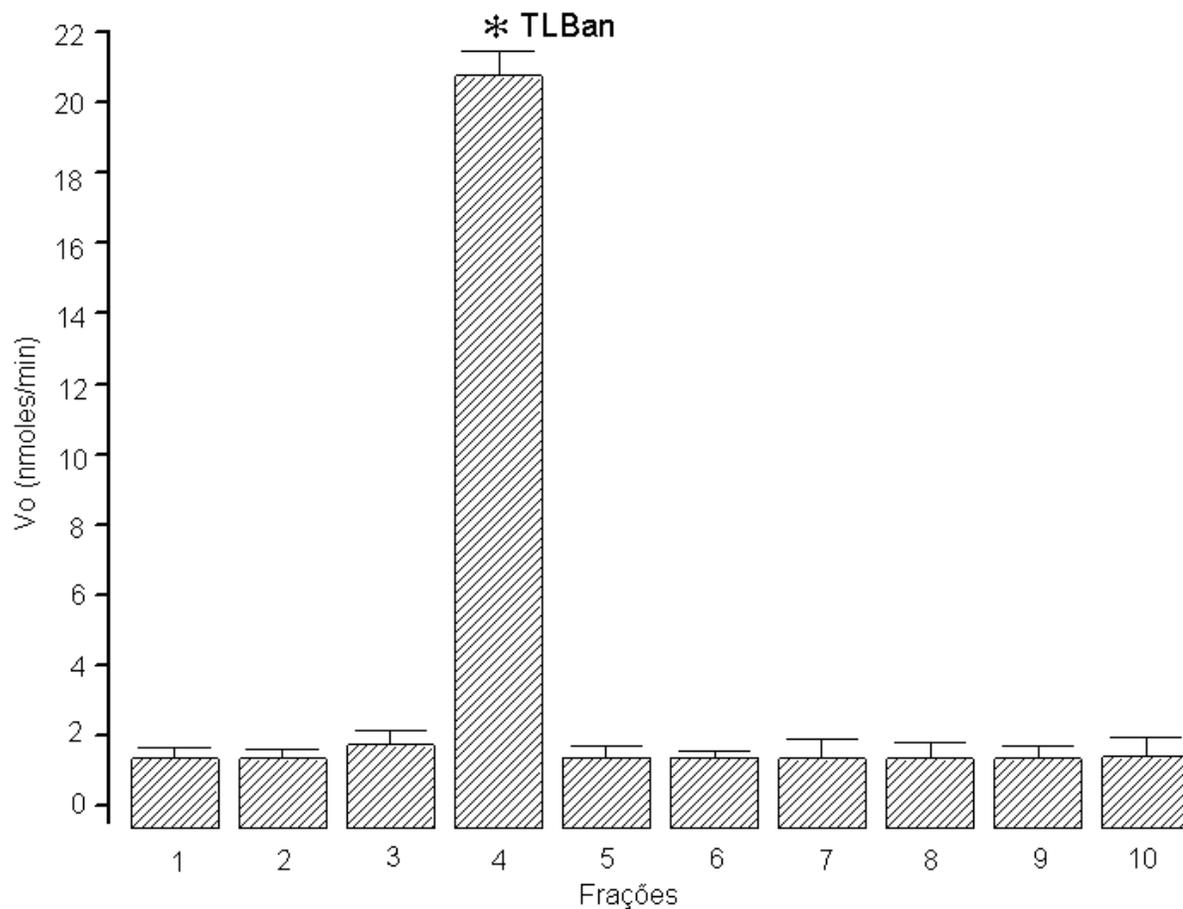


Figura 10. Determinação do perfil da atividade proteolítica das frações obtidas do sephadex G-75 cromatografia do veneno total de *B. andianus* em Cromatografia HPLC-fase reversa. Foram usados 43,6 mM de substrato cromogênico DL-BAPNA por 20 µg de amostra. O perfil da atividade proteolítica foi monitorado na absorbância de 410. (*) Proteína que será considerada nas caracterizações bioquímicas e biológicas.

2. Determinação da massa molecular da fração I-4 (TLBan)

2.1. Eletroforeses em SDS – PAGE

A Figura 11 mostra que a fração I-4 (TLBan) em SDS-PAGE (10 %) em condições reduzidas (29 kDa) e não reduzida (26 kDa) existe uma diferença entre a massa relativa, (Fig. 11-A). Indicando que a TLBan tem mais de uma ligação dissulfeto.

A fim de investigar a presença de hidratos de carbono na estrutura da enzima, TLBan foi previamente tratado com desglicosidases como a PNGase F e neuraminidase, que remove res-duos de ácido siálico N-ligações de açúcares, respectivamente, mostrando no gel de SDS-PAGE sob condições redutoras (Fig. 11-B) que a massa relativa de TLBan diminuiu a 22 kDa com a PNGase e 25 kDa com a neuraminidase.

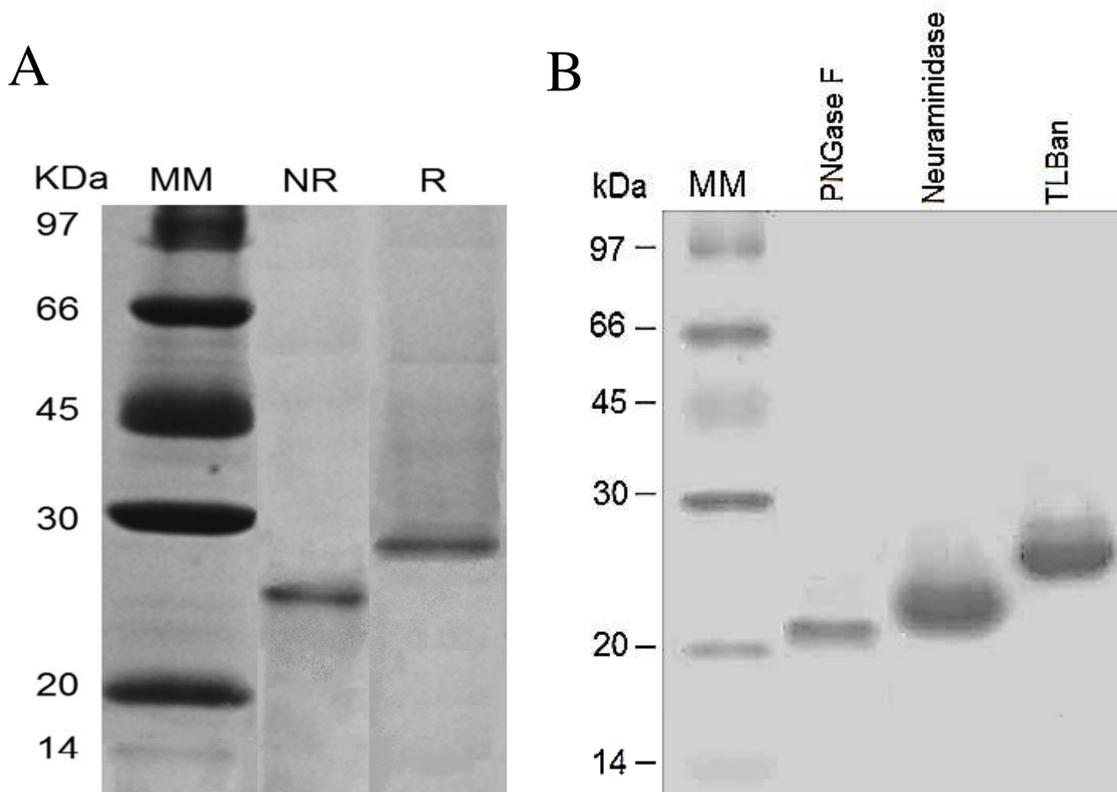


Figura 11. A. SDS-PAGE (10%) da TLBan em condições reduzidas (R) e não reduzidas (NR). (MM) Marcadores de massa molecular, B. Eletroforese em SDS-PAGE (14%). TLBan baixo condições não reduzidas. Desglicosilações: tratadas com PNGase F e neuraminidase.

2.2. Análise de espectrometria de massa (MALDI-Tof) da trombina “like” TLBan

A fração I-4 (TLBan) com atividade trombina “like” apresentou uma massa molecular de 25835,65 Da (Figura 12). Em análise realizada por espectrometria de massa (MALDI-Tof), pode-se notar a presença de um pico a mais, com uma massa de 12547,38 Da, que representa a massa real dividida por dois, mais um próton (H^+), o que confirma que os parâmetros empregados na determinação de tipo linear foram adequadamente calibrados.

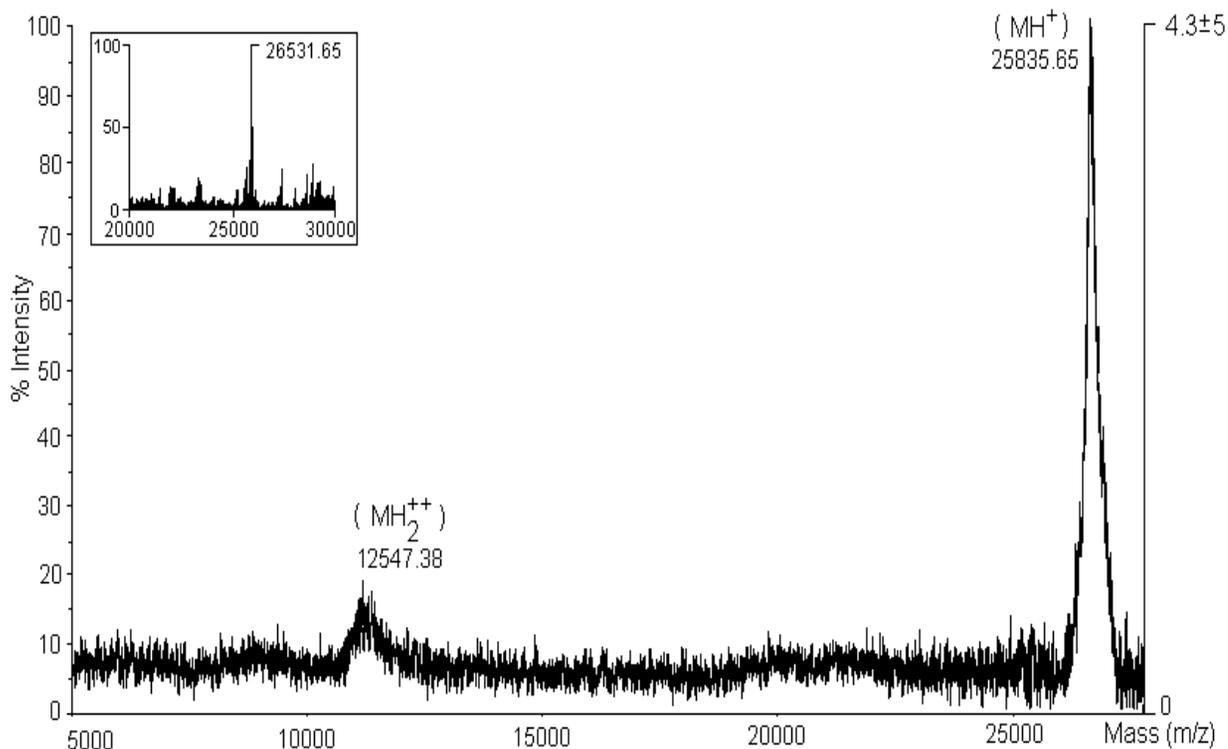


Figura 12. A massa molecular da fração trombina “like” TLBan de *B. andianus* é foi determinada por Espectrometria de Massa, sendo a massa molecular de 25835,65 Da. 1 μ L da amostra em TFA 0,1% é misturada em 2 μ L da matriz e analisada nas condições de aceleração de voltagem 25 kV, o laser ajustado a 2890 mJ/cm², em 300 ns e o modo de análise é linear.

3. Análise de composição de aminoácidos da fração I-4 (TLBan)

Com relação à análise da composição de aminoácidos a Tabela 1 mostra que a TLBan tem um total de 269 aminoácidos dos quais o 21 % dos aminoácidos totais são ácidos (Glu e Asp) e uma elevada percentagem de aminoácidos hidrofóbicos, tais como Gly, Pro, Leu e Ile. As 12 cisteínas detectadas evidenciam a possível presença de 6 pontes dissulfeto. Todas estas características sugerem que a TLBan é uma serinoprotease.

Tabela 1. Composição de aminoácidos da fração I-4 (TLBan) Os valores são expressos em mol de aminoácidos por mol de proteína. (*) não determinado

Aminoácido	TLBan	%
Asx	34	13
Glx	23	9
Ser	17	6
Gly	18	7
His	5	2
Arg	13	5
Thr	14	5
Ala	19	7
Pro	21	8
Tyr	14	5
Val	14	5
Met	3	1
Cys	12	4
Ile	19	7
Leu	22	8
Phe	8	3
Lys	13	5
Trp*		
Total	269	100

4. Caracterização estrutural da TLBan

4.1. Determinação da sequência de aminoácidos da TLBan

Para obter informações estruturais detalhadas, a proteína nativa foi alquilada e digerida para ser analisado através ESI-MS/MS. A proteína alquilada e digerida foi fracionada por RP-HPLC e cada pico cromatográfico marcado no cromatograma foi manualmente coletado e liofilizado. De novo sequenciamento por ESI-MS/MS foi realizado para cada pico de peptídeo. As seqüências foram deduzidas utilizando ESI-MS/MS e 11 peptídeos foram obtidos a partir da TLBan alquilada (Tabela 2).

Não foram discriminados os resíduos de lisina e isoleucina em nenhuma das seqüências reportadas devido a que não são indistinguíveis no espectro de baixa energia. Devido à calibração externa aplicada a todos os espectros, não foi possível resolver a diferença de 0,036 Da entre resíduos de glutamina e lisina, exceto para as lisinas que foram deduzidas da clivagem da tripsina (Tripsina cliva no extremo carboxi terminal de lisina ou arginina). Cada peptídeo sequenciado “de novo” foi submetido à base de dados NCBI usando o programa BLAST-p protein search com uma procura restrita a proteínas com atividade trombina “like”.

Tabela 2. Medida das massas moleculares e a sequência de aminoácidos deduzidos. Obtidas por ESI-MS/MS baseados sobre os peptídeos trípticos da TLBan alquilada. Os peptídeos foram sequenciados por espectrometria de massa. C = cisteína alquilada. Os resíduos de lisina (K) mostrados em negrito foram deduzidos da clivagem pela tripsina. Todas as massas moleculares são reportadas como monoisotópicas.

TLBan HPLC fraction	Measured mass (Da)	Amino acid Sequence	Theoretical mass (Da)
1	2645.035	PVSNSEHIAPLSLPSSPPSVGVCVK	2645.00
2	1144.365	YFIFCPNNK	1144.33
3	690.845	PALYTK	690.81
4	2352.665	VIGGDECNINEHPFLVALYYS	2352.63
5	373.455	LDK	373.42
6	2224.615	VFDYLLWIQSIIAGNTATCP	2224.58
7	389.495	FPK	389.46
8	2181.575	TFFCGMTLINQEWWLTAAH	2181.54
9	593.655	ESEK	593.62
10	758.995	DIMLIR	758.96
11	274.325	EK	274.29

A Figura 13 mostra o espectro de massa em tándem pertencente ao peptídeo tríptico número 8, o qual tem a sequência: TFFCGMTLII/LNQ/KEWVLTAAH, contendo o resíduo de histidina na posição 44 da sequência de aminoácidos.

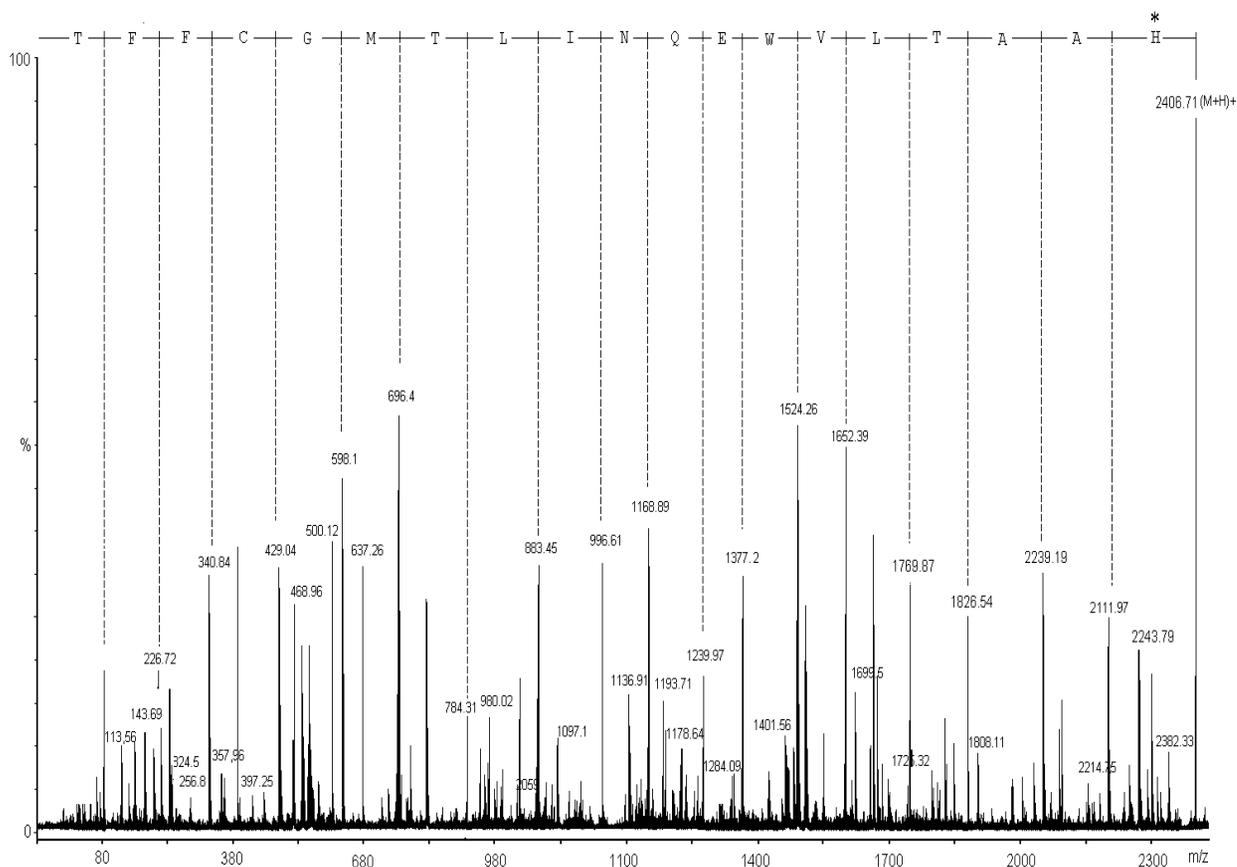


Figura 13 Espectro ESI-QTOF-MS/MS do peptídeo tríptico de 2181.54 Da. Íons do peptídeo (contendo 19 resíduos de aminoácidos) eluído no pico 8 do HPLC de fase reversa da TLBan.

4.2. Homologia sequencial da TLBan isolada do veneno de *Bothrops andianus*.

A sequência de aminoácidos da TLBan foi deduzida utilizando a database NCBI-BLAST, demonstrando possuir um alto grau de similaridade (Figura 14) com Bat de *Bothrops atrox* (Petretski *et al.*, 2000), Cal de *Gloydus ussuriensis* (Hahn *et al.*, 1996), Gir de *Lachesis muta muta* (Castro *et al.*, 2001), Cro de *Crotalus adamanteus* (Pirkle *et al.*, 1991), Fla de *Trimeresurus flavoviridis* (Deshimaru *et al.*, 1996), e Anc de *Agkistrodon rhodostoma* (Burkhart *et al.*, 1992).

A região encerrada da sequência de aminoácidos da TLBan com outras trombinas “like” provenientes de serpentes, indicam as regiões altamente conservadas quanto variáveis. Os traços (-) correspondem aos gerados pelo software usado no alinhamento para maximizar a homologia da sequência.

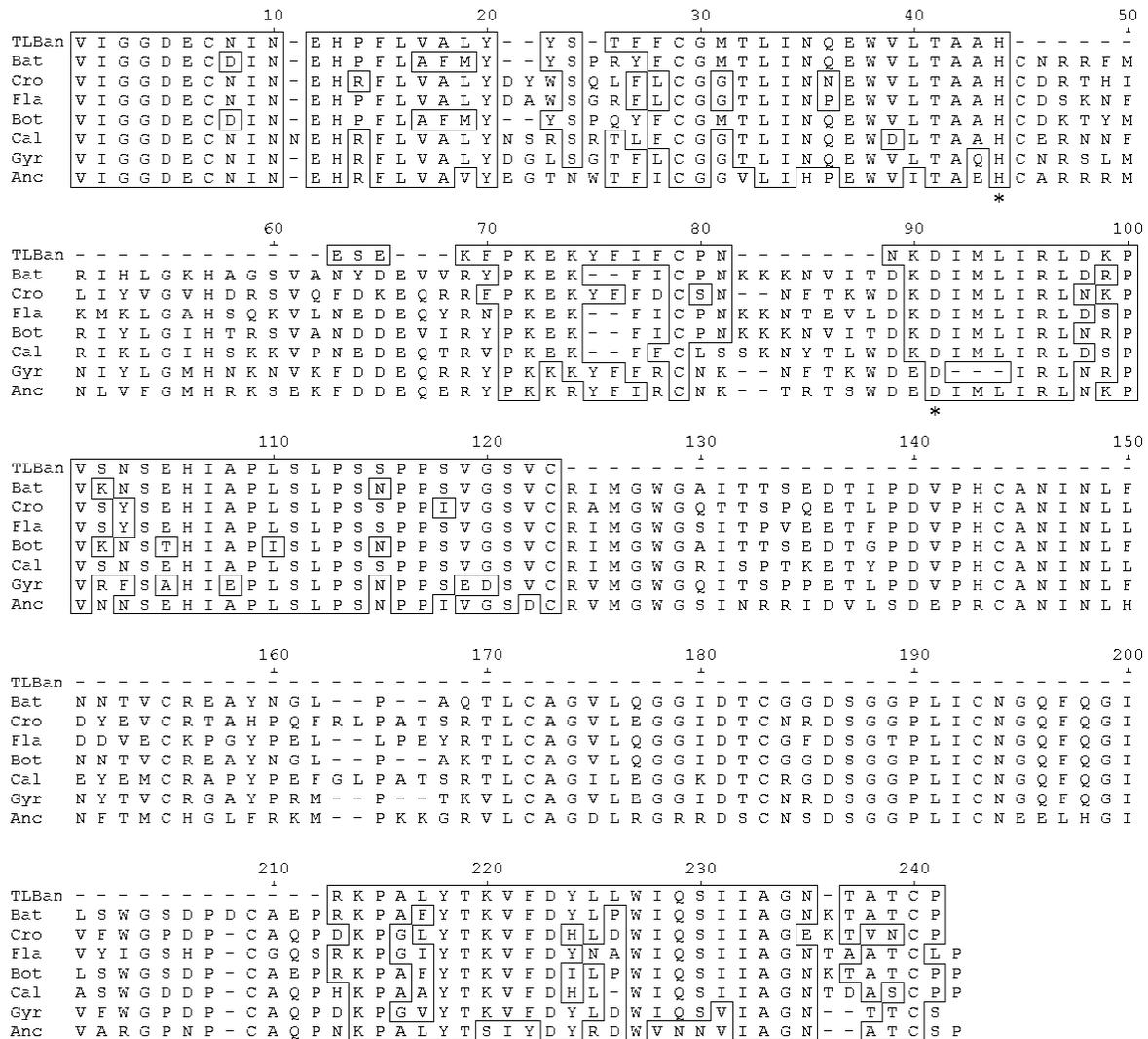


Figura 14. Análise comparativa da sequência de aminoácidos da trombina “like” de *Bothrops andianus* (TLBan) com outras serinoprotease semelhantes obtidas da base de dados BLAST-protein data bank (Pubmed. Medline) onde o símbolo (*) representa os aminoácidos que compõem o sítio catalítico desta classe de enzimas.

5. Estudo da atividade cinética da fração I-4 (TLBan)

A medida da atividade enzimática proteolítica foi determinada nas condições de ensaio descritas no Item 8 utilizando o substrato cromogênico sintético DL - BApNA.

5.1. Efeito da concentração do substrato

O efeito da concentração do substrato na atividade proteolítica frente ao substrato cromogênico DL - BApNA mostra que nessas condições experimentais a fração I-4 (TLBan) tem um comportamento michaeliano (Fig. 15).

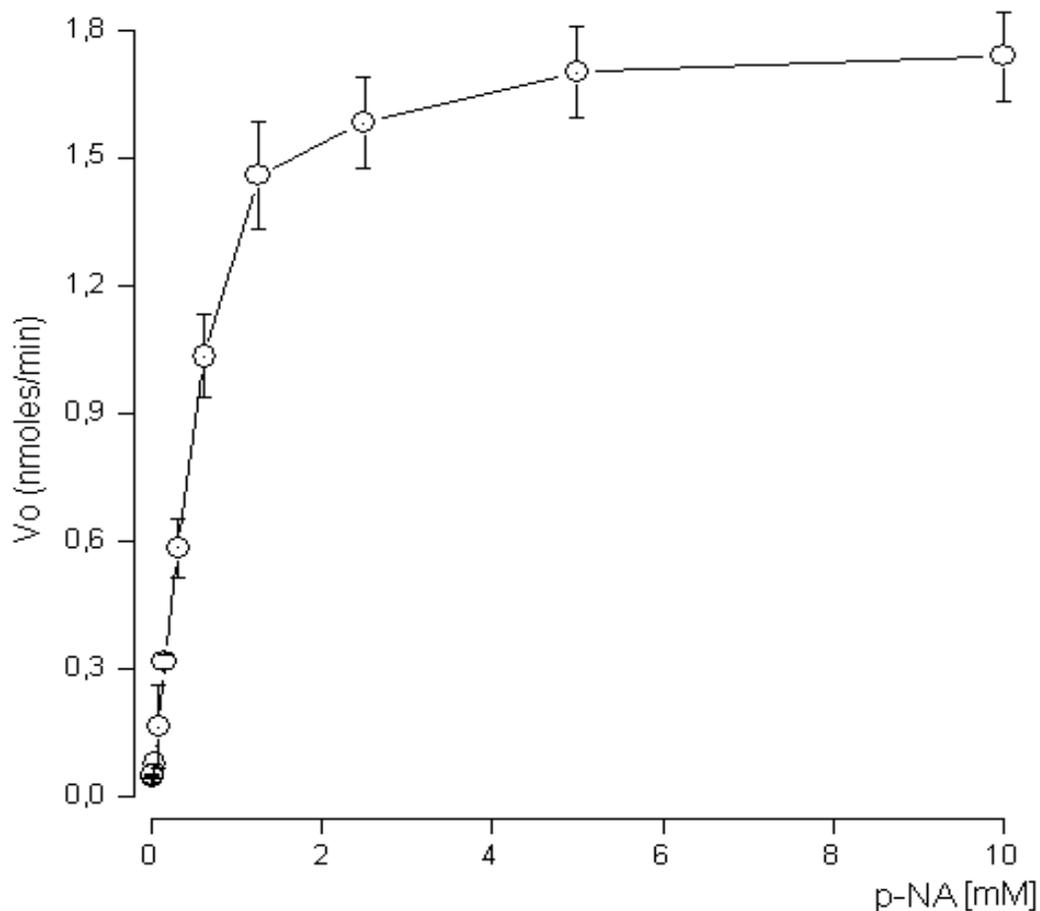


Figura 15. Efeito da concentração do substrato na atividade proteolítica da trombina like (TLBan). As concentrações, empregadas foram: 0.0097; 0.0195; 0.0391; 0.0782; 0.1563; 0.3125; 0.625; 2.5, 5 e 10 mM do substrato cromogênico BApNA. Depois foi incubada durante 40 minutos a 37 ° C. A leitura de absorbância foi monitorada a 410 nm.

Pelo método de Lineweaver-Burk (duplos recíprocos) foi possível calcular as constantes cinéticas de k_m e V_{max} . Assim, os valores obtidos foram: $V_{max}=5.4 \times 10^{-1}$ nmoles p-NA/min e o $K_m=0,79 \times 10^{-1}$ mM.

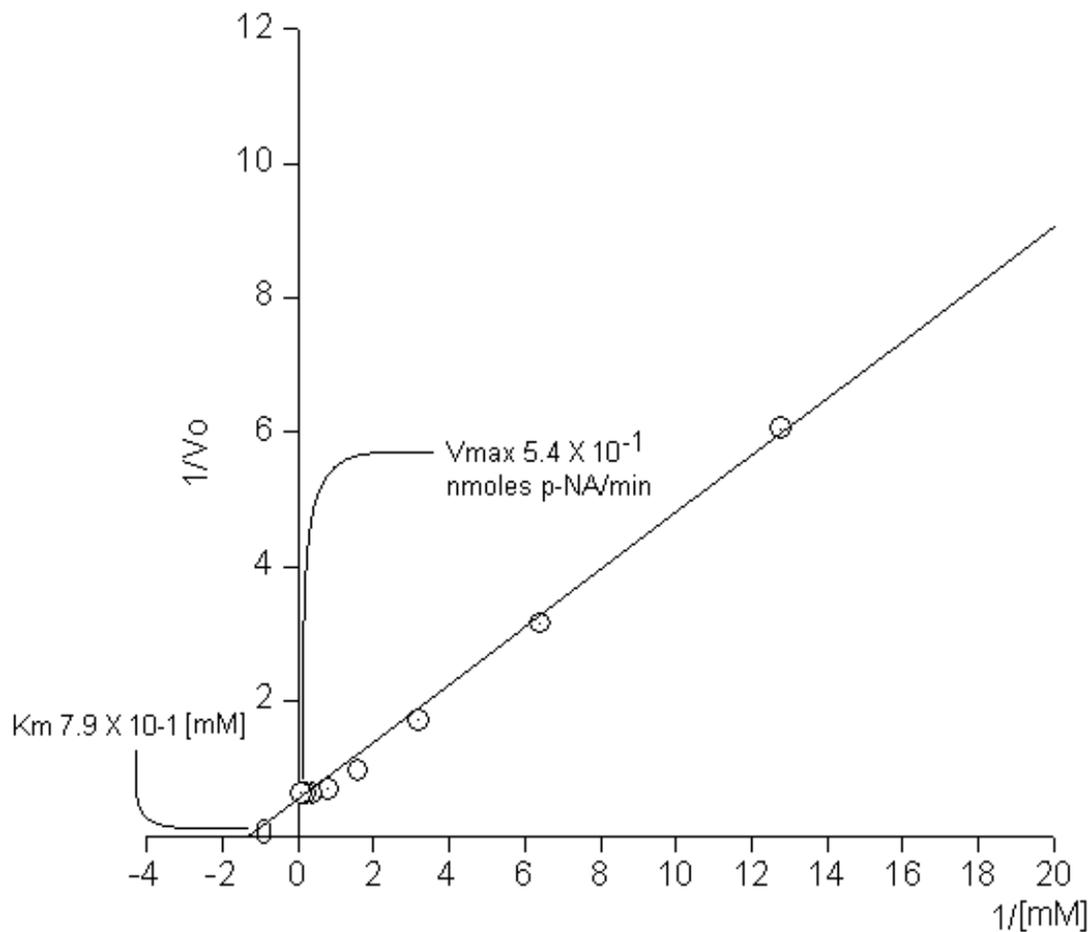


Figura 16. Gráfico do efeito da concentração do substrato na atividade proteolítica da trombina like TLBan empregando o método de Lineweaver-Burk (duplos recíprocos). Os valores encontrados para as constantes cinéticas de V_{max} e K_M foram calculados estabelecendo o grau de regressão e correlação (linearidade da reta), entre os inversos da velocidade ($1/V_o$) e os inversos ($1/[mM]$) da concentração do substrato.

5.2. Efeito do pH

O pH ótimo da trombina “like” TLBan, foi determinado incubando a enzima a diferentes pHs (4 – 10). A atividade da enzima a pH 8 foi considerada como ótima, tal como se mostra na Figura 17.

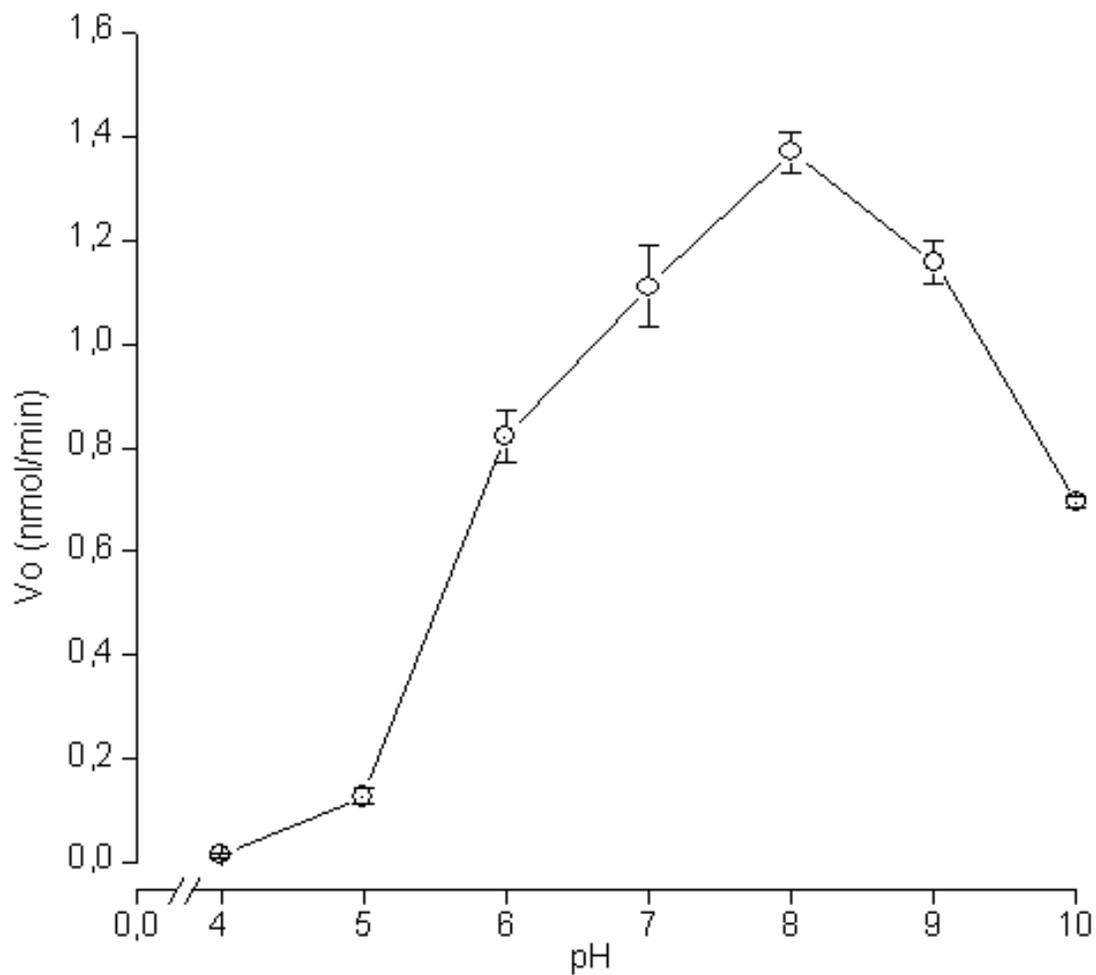


Figura 17. Efeito do pH na atividade proteolítica da trombina “like” TLBan. Os rangos de pH empregados foram: 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 10 respectivamente e incubadas durante 40 min a 37°C. A leitura de absorvância foi monitorada a 410 nm. A atividade é expressa como a velocidade de reação (V_0) e é calculada baseada na *p*-nitroanilina liberada após a catálise. Os experimentos foram realizados em triplicata e as barras representam o desvio padrão.

5.3. Efeito da temperatura

O efeito da temperatura na atividade proteolítica foi determinado incubando a TLBan a diferentes temperaturas (25 – 60 °C). A atividade da enzima a 45 °C foi considerada como ótima tal como se mostra na Figura 18.

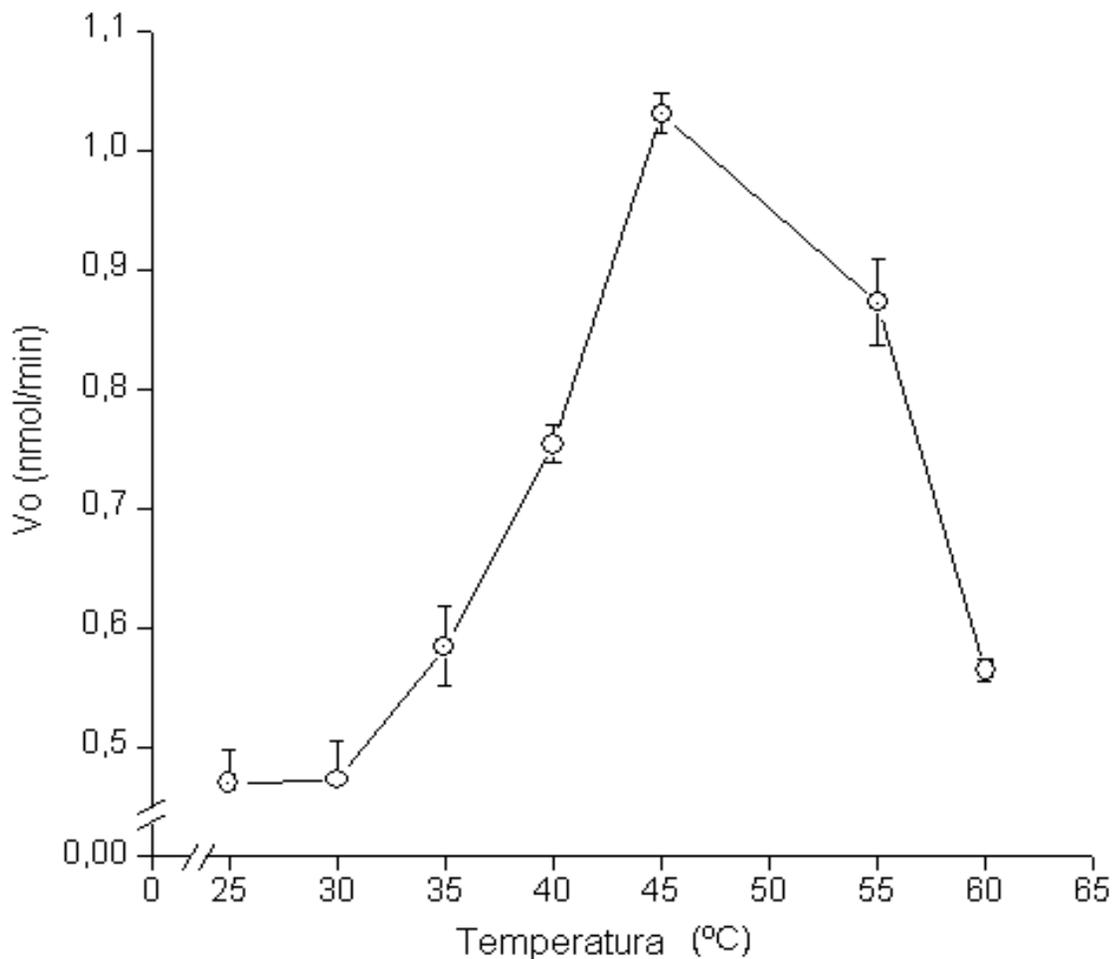


Figura 18. Efeito da variação da temperatura sobre a atividade proteolítica da TLBan. As temperaturas empregadas foram 25, 30, 35, 40, 45, 55 e 60 °C incubadas durante 40 minutos, a leitura de absorvância foi monitorada a 410 nm. Os experimentos foram realizados em triplicata e as barras representam o desvio padrão.

5.4. Avaliação do efeito inibitório sobre a atividade proteolítica da fração I-4 (TLBan)

A Figura 19 mostra o efeito inibitório do SBTI (500 μ g/mL), PMSF (5mM) e o efeito do agente quelante EDTA (5mM), na atividade proteolítica da TLBan.

Os resultados mostram que o PMSF apresenta a maior porcentagem de efeito inibitório sobre a atividade proteolítica da serinoprotease TLBan, o que evidencia o caráter serinoprotease.

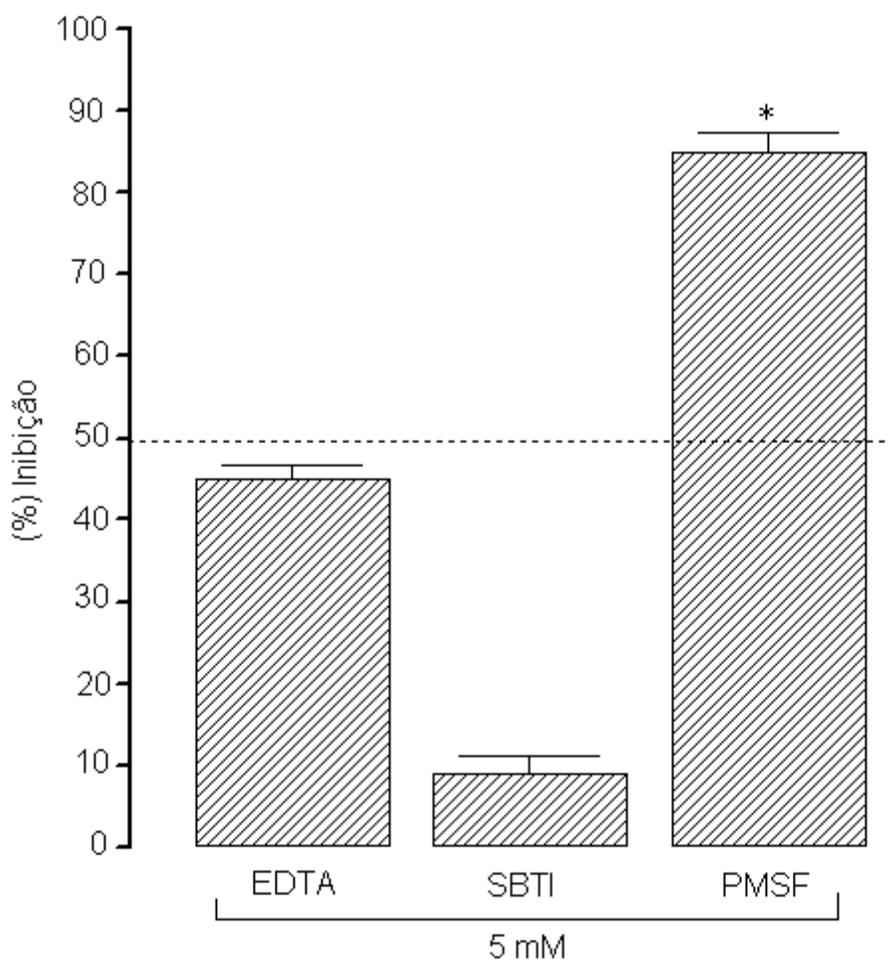


Figura 19. Efeito inibitório da atividade proteolítica da TLBan frente à EDTA, SBTI e PMSF, frente ao substrato DL-BA ρ NA. Foi incubada durante 40 min a 37°C e a leitura de absorbância foi monitorada a 410 nm. A atividade é expressa como a velocidade de reação (V_0), e é calculada baseada na *p*-nitroanilina liberada após a catálise. (*) Nível de significância das concentrações em relação ao controle. (n=3, $p < 0,05$).

5.5. Avaliação do efeito de íons na atividade proteolítica da fração I-4 (TLBan)

Os resultados mostram o claro efeito inibitório dos íons Zn^{2+} e Cd^{2+} (1mM) a comparação com os outros íons Ca^{2+} , Mg^{2+} e Mn^{2+} (1mM) sobre a atividade proteolítica da serinoprotease TLBan (Figura 20).

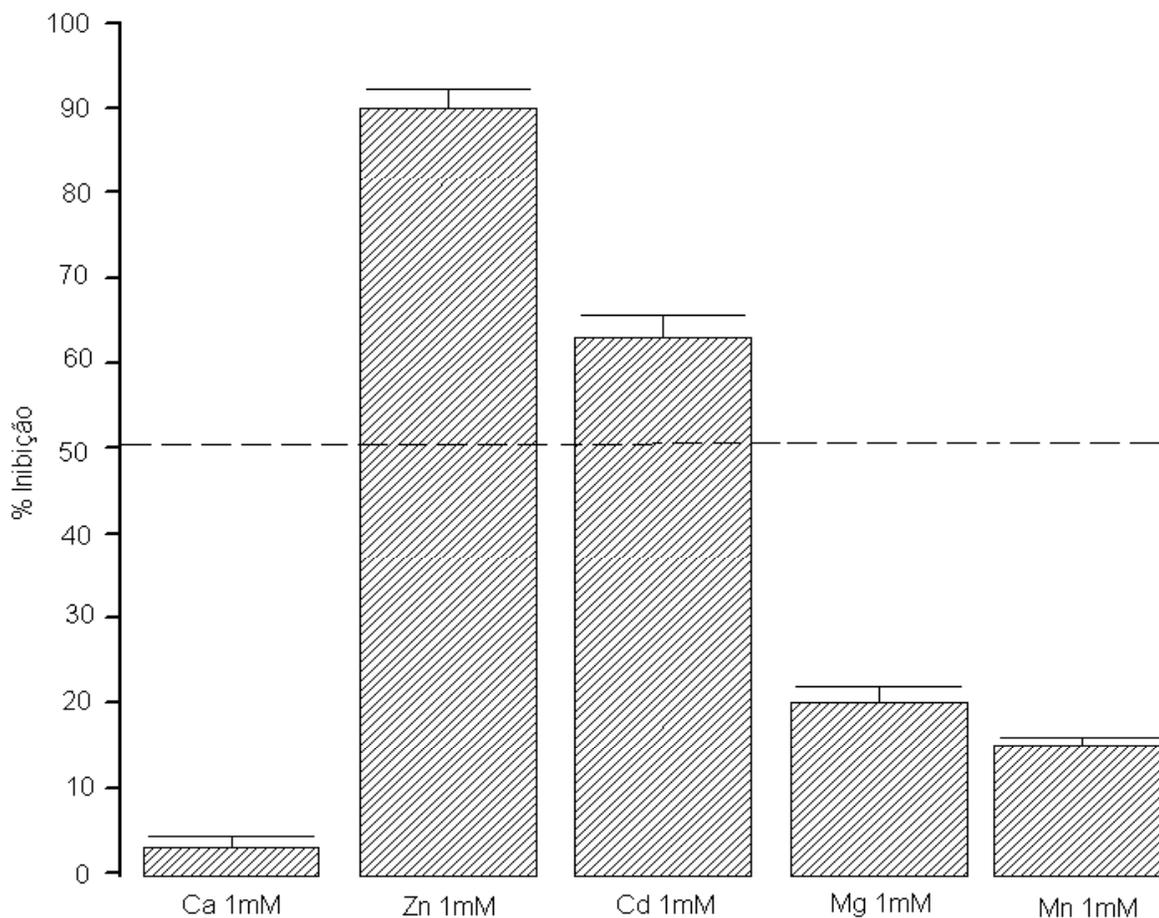


Figura 20. Efeito dos íons na atividade proteolítica da TLBan frente a Ca^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+} , Mg^{2+} e Mn^{2+} (1mM), frente ao substrato DL-BA ρ NA. Foi incubada durante 40 min a 37°C e a leitura de absorbância foi monitorada em 410 nm. A atividade é expressa como a velocidade de reação (V_o), e é calculada baseada na *p*-nitroanilina liberada após a catálise. (n=3, $p<0,05$).

6. Estudo da atividade biológica da fração I-4 (TLBan)

6.1. Avaliação da atividade coagulante

Foram avaliadas as atividades coagulantes das frações obtidas da cromatografia de exclusão molecular sephadex G-75 e HPLC de fase reversa.

Os resultados mostram na Tabela 3 que a fração I registra um tempo de coagulação sobre fibrinogênio bovino de 45 segundos com IC de $22,22 \text{ s}^{-1}$ e a fração I-4 proveniente da cromatografia de HPLC mostra um tempo de coagulação de 6,9 segundos com IC de $144,93 \text{ s}^{-1}$, todas as demais frações não coagularam ou coagularam após de 60 segundos.

Tabela 3. Atividade coagulante e Índice de Coagulação sobre o fibrinogênio bovino das frações obtidas da cromatografia de exclusão molecular sephadex G-75 e HPLC de fase reversa.

Amostra	Tempo de coagulação (s)	Amostra	Tempo de coagulação (s)
Frações do sephadex G-75		I-5	+ 60
I	45	I-6	+ 60
II	+ 60	I-7	+ 60
III	+ 60	I-8	+ 60
Frações do HPLC		I-9	+ 60
I-1	+ 60	I-10	+ 60
I-2	+ 60	Índice de Coagulação (IC) (s^{-1})	
I-3	+ 60	I	22,22
I-4 (TLBan)	6,9	I-4 (TLBan)	144,93

6.2. Avaliação da dose mínima coagulante sobre o plasma humano

A TLBan tem atividade coagulante *in vitro* sobre o plasma humano, quando foram confrontados com as diferentes doses testadas. A resposta foi proporcional ($r = 0,992$) ao logaritmo da dose da TLBan de cada diluição utilizada (Figura 21). A dose coagulante mínima obtida foi de $1,33 \pm 0,25 \mu\text{g/mL}$.

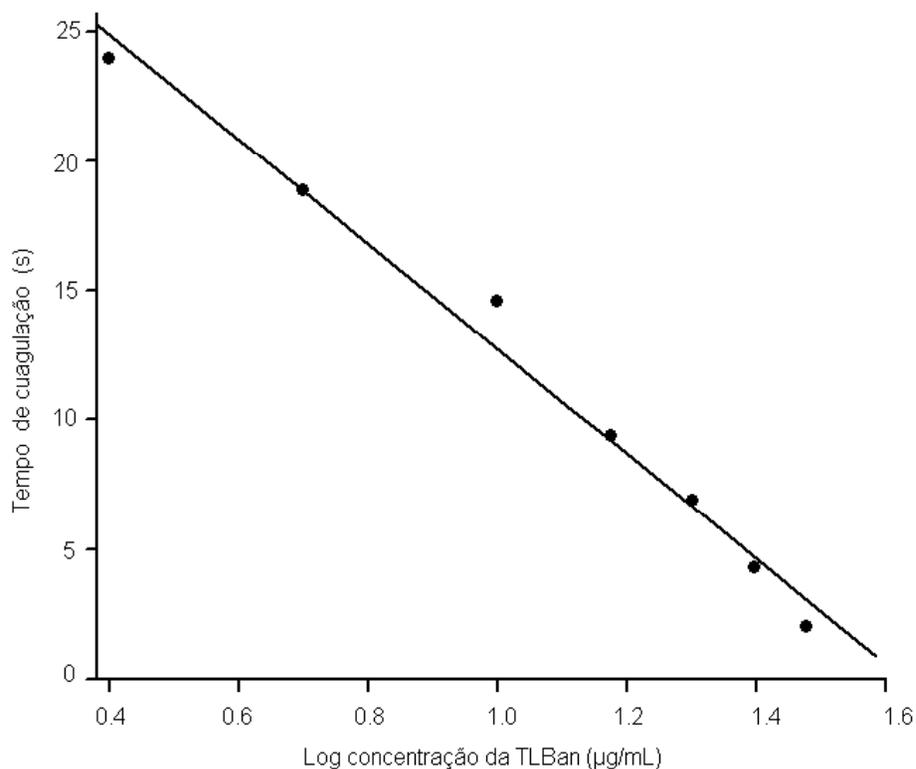


Figura 21: Dose mínima coagulante da fração I-4 (TLBan). Curva dose-resposta. Foi utilizada uma solução estoque de $500 \mu\text{g}$ da TLBan / mL foram feitas diluições: 30; 25; 20; 15; 10; 5 e $2,5 \mu\text{g}$ / mL. Os resultados são apresentados como média \pm DS ($n=3$).

6.3. Degradação do fibrinogênio pela ação da trombina “like” TLBan e sua análise por SDS-PAGE

Os resultados mostrados na Figura 22 evidenciam que a TLBan possui atividade proteolítica sobre o fibrinogênio bovino, liberando fibrinopeptídeos A, às 6 horas e o fibrinopeptídeos B, às 9 horas, pertencendo assim à família venobim AB. A concentração da enzima TLBan para cada ensaio foi de 10 µg.

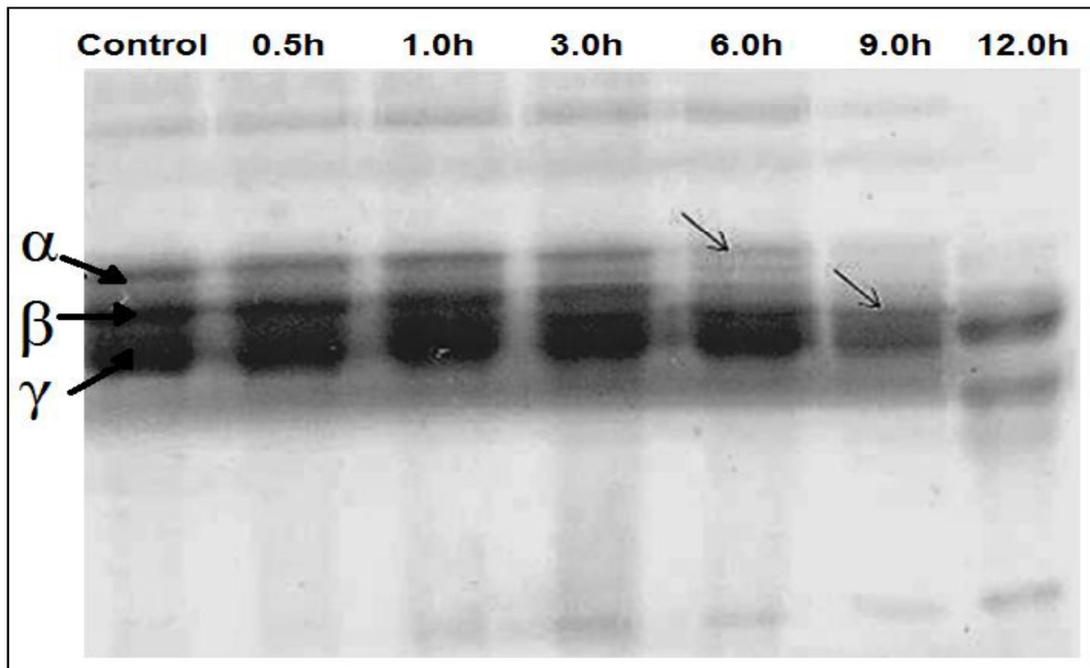


Figura 22. SDS-PAGE (10 %). Análise de degradação de fibrinogênio bovino por ação de TLBan em diferentes tempos: 0:30, 1:00, 3:00, 6:00, 9:00 e 12:00 horas, foram incubadas a 37°C. Temos fibrinogênio como controle ao 0 minuto mostrando a presença das cadeias α , β e γ . (↓) esquerda liberação do fibrinopeptídeos A, às 6 horas. (↓) direita liberação do fibrinopeptídeos B às 9 horas.

6.4. Efeito dos diferentes íons e pH na atividade fibrinogenolítica da TLBan

A Figura 23 mostra o efeito dos íons: Ca^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+} , Mg^{2+} e Mn^{2+} (1 mM) e pH (6 - 10) na atividade fibrinogenolítica da trombina “like” (TLBan).

Os resultados mostram o claro efeito inibitório da atividade fibrinolítica dos íons Zn^{2+} e Cd^{2+} em comparação com os outros íons Ca^{2+} , Mg^{2+} e Mn^{2+} , assim como uma maior atividade fibrinogenolítica da enzima TLBan a pH de 8 (Figura 23).

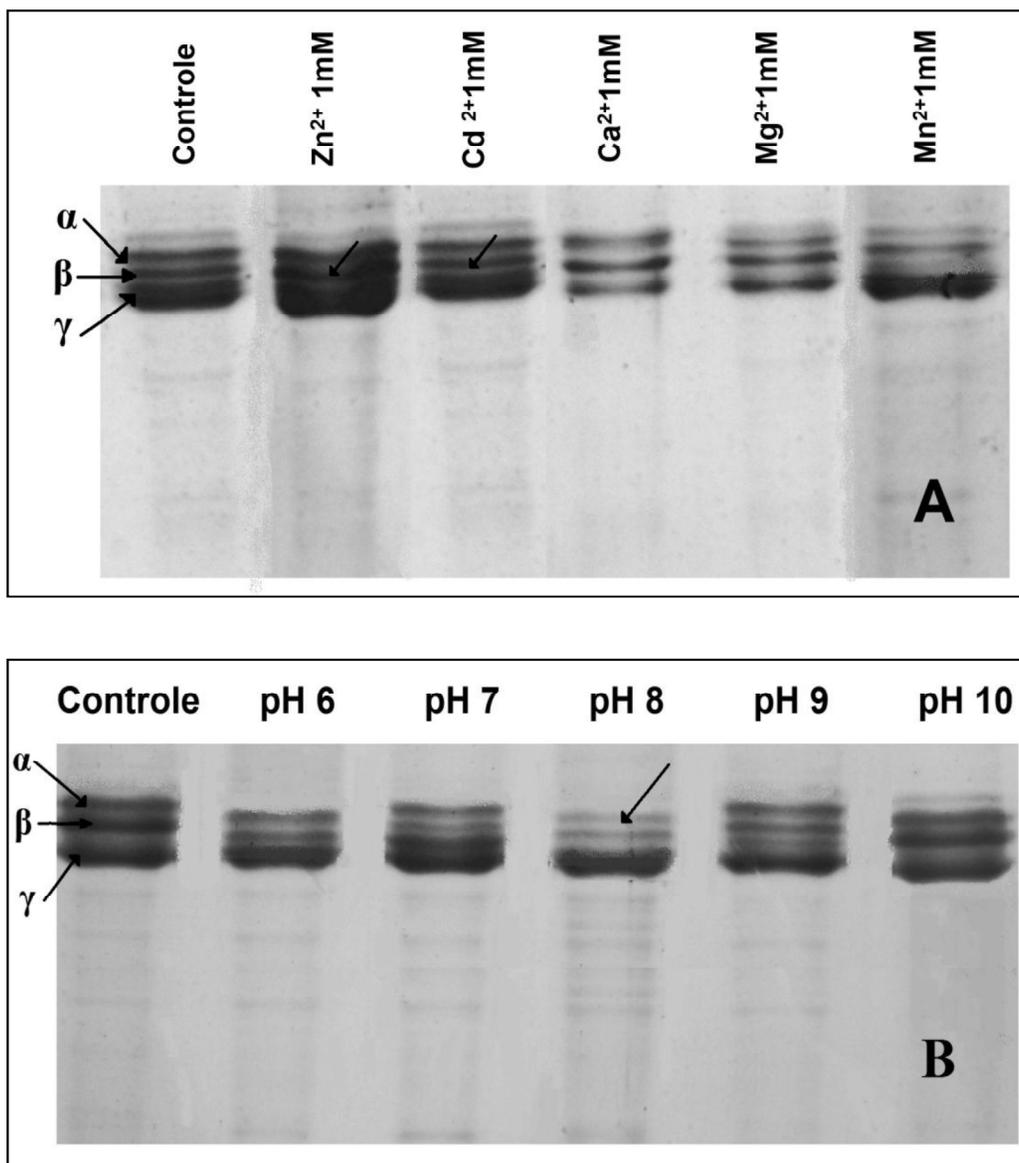


Figura 23. Eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE (10%). (A) Degradação do fibrinogênio, 10 μ g da TLBan + 0.9 mg de fibrinogênio bovino foram incubados com 450 μ L de diferentes íons (1mM) por 9 horas: Zinco; Cádmio; Cálcio; Magnésio e Manganês. (↓) efeito inibitório do Zinco e Cadmio na atividade fibrinogenolítica (B) 10 μ g da TLBan + 0.9 mg de fibrinogênio bovino foram incubados com 450 μ L de soluções a diferentes pH: 6.0; 7.0; 8.0; 9.0 e 10.0 incubadas por 9 horas.. (↓) A maior atividade fibrinogenolítica foi a pH 8.

6.5. Determinação da Agregação Plaquetária

O teste da agregação plaquetária realizado com a TLBan mostra que a enzima, agrega as plaquetas diretamente e é inibida a atividade pelo PMSF.

Inicialmente incubaram-se o PRP (plasma rico em plaquetas) com a trombina bovina (10 unidades NIH/ml) como controle positivo. O resultado foi a ativação da agregação plaquetária; em uma segunda incubação, foi adicionada PRP com a fração TLBan e, após 7 minutos de leitura, foi evidenciada a ativação da agregação plaquetária.

Depois foram incubadas as PRP com a fração TLBan previamente incubada com o PMSF e o resultado observado foi a inibição da agregação plaquetária, controle negativo de acordo com o mostrado na Figura 24.

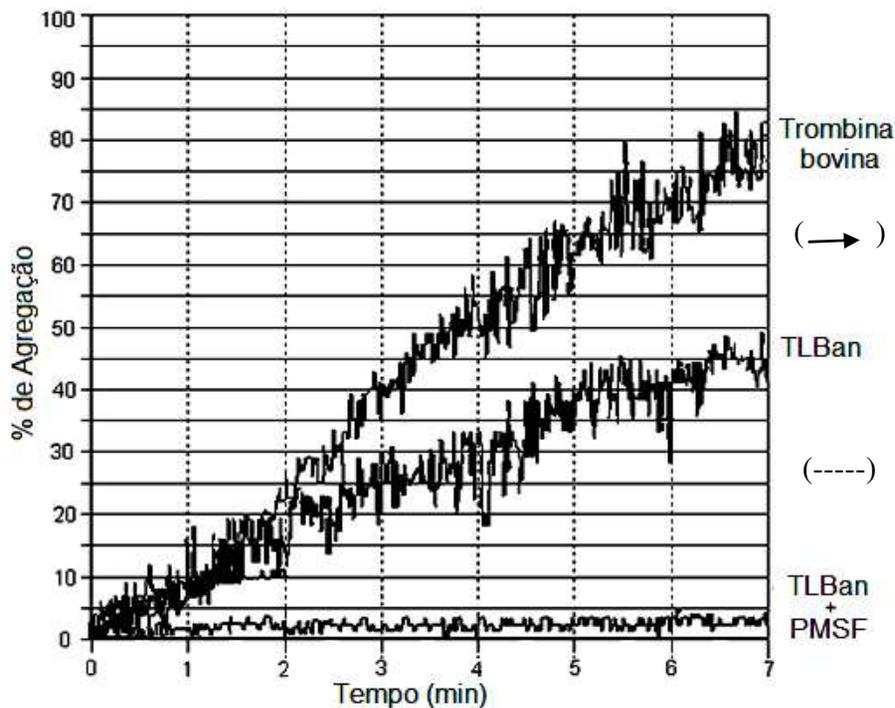


Figura 24. Representação gráfica da agregação plaquetária induzida pela serinoprotease com atividade Trombina “like” TLBan procedente do veneno de *B. andianus*. Na figura temos a curva control positivo (→) a Trombina bovina com um percentagem de 80% e como control negativo (-----) o PMSF com um percentagem de 0% e a TLBan um percentagem de 50%.

DISCUSSÃO

Os venenos de serpentes têm uma ampla variedade de ações biológicas e composição química complexa, e são bibliotecas de compostos bioativos com potencial terapêutico valioso, o que motiva mais pesquisas para converter essas substâncias tóxicas em modelos para o desenvolvimento de interesse terapêutico e biotecnológico (Jiménez *et al.*, 2010).

O interesse inicial do veneno de serpente no campo científica era compreender como combater os efeitos dos acidentes ofídicos e como estas toxinas atuavam, venenos brutos foram também usados na medicina tradicional para tratamento de doenças. No início do século 20 a idéia de utilizar as toxinas purificadas como uma fonte terapêutica surgiu (koh e kini, 2011).

Os componentes ativos a partir de venenos de serpentes que interferem com a hemostasia podem afetar muitos passos ou inespecificamente pela degradação proteolítica, ou seletivamente, ativando ou inibindo fatores específicos envolvidos na coagulação, agregação de plaquetas e fibrinólise (Markland, 1998; Arocha- Piñango *et al.*, 2000; Kini, 2005; White, 2005; Swenson e Markland, 2005; Rodríguez-Acosta *et al.*, 2010). Uma delas é a trombina “like” que age de maneira semelhante à trombina, proteína humana responsável pela coagulação do sangue, esta trombina “like” é responsável por vários efeitos farmacológicos, tais como a transformação de fibrinogênio em fibrina (Meier e Stocker, 1991; Zhang *et al.*, 1998; Castro *et al.*, 2004; Braga *et al.*, 2007; Vilca-Quispe *et al.*, 2010), ativando o fator V de coagulação (Kisiel, 1979; Tokunaga *et al.*, 1988) e proteína C no plasma (Kisiel *et al.*, 1987), liberando cininas de cininogênios (Petretski *et al.*, 2000) e clivando componentes do complemento C3 (Tambourgi *et al.*, 1994; Yamamoto *et al.*, 2002). Estas enzimas têm muitas aplicações terapêuticas, incluindo o tratamento de trombose venosa e arterial, infarto do miocárdio, isquemia aguda e distúrbios do sistema de coagulação do sangue (Kornalik, 1985; Markland, 1998; Henriques *et al.*, 2004; Marsh e Williams, 2005). Como tal, muitos SV-TLEs têm sido isolados e caracterizados, (Mackessy, 2010; Phillips *et al.*, 2010).

Dadas as divergências naturais e a biodiversidade destas proteínas entre as serpentes de diferentes espécies e origens geográficas, a caracterização de novas trombinas “like” pode prover conhecimentos relevantes para entender suas relações estrutura-função. Como é o caso do veneno de *B. andianus* serpente peruana que ainda não se tem nenhum trabalho feito na caracterização de seus componentes, tornando-se assim de grande interesse para o campo científico.

Neste trabalho apresentamos resultados de uma nova trombina “like” do veneno de *Bothrops andianus* (cabeça de lança) que foi caracterizada fisicoquimicamente e biologicamente.

As SV-TLEs têm sido exaustivamente purificadas usando uma combinação de mais de três métodos cromatográficos tales como exclusão molecular, troca iônica, HPLC de fase reversa e afinidade, gel de filtração ultrafiltrado em sistema Amicon (Braga *et al.*, 2006; Magalhães *et al.*, 2007; Sant’Ana *et al.*, 2008; Costa *et al.*, 2009; Yuan *et al.*, 2009; Tang *et al.*, 2009; Costa *et al.*, 2010; Tan *et al.*, 2011).

O objetivo é encontrar uma técnica mais refinada ou a melhor combinação de técnicas cromatográficas que permitam isolar as Trombinas “like” mantendo as propriedades destas, tais como sua atividade enzimática e suas atividades biológicas, além de fornecer material com alto grau de homogeneidade molecular e quantidades razoáveis para a realização dos experimentos propostos. Neste intento Ponce-Soto *et al.*, (2007) e Vilca-Quispe *et al.*, (2010) trabalharam com as serpentes de *Bothrops atrox* e *Bothrops marojoensis* no isolamento de trombinas “like” as quais mostraram uma combinação altamente eficiente entre cromatografia de exclusão molecular (Sephadex G-75) e cromatografia de alta eficiência fase reversa (HPLC de fase reversa) no isolamento de estas serinoproteases em comparação com as outras técnicas já mencionadas anteriormente.

Nós utilizamos os mesmos passos de purificação para o isolamento da trombina “like” de *B. andianus*, na primeira etapa de purificação utilizamos uma cromatografia convencional de exclusão molecular em Sephadex G-75 onde os resultados mostram 3 frações principais sendo a fração I a que apresentou a maior atividade proteolítica (Figura 7). Esta fração foi submetido a uma segunda etapa de purificação, utilizando uma coluna C-18 acoplada a um sistema de HPLC de fase reversa onde mostrou 10 frações principais (Figura 9), dentre as quais uma nova serinoprotease com atividade trombina “like” denominada TLBan foi identificada (fração I-4). Para confirmação do grau de pureza a fração I-4 foi re-purificada usando o mesmo sistema cromatográfico (Figura 9).

Nossos resultados mostram que a combinação da cromatografia de exclusão molecular com HPLC de fase reversa mostra ser altamente seletiva, principalmente a etapa de HPLC-FR mostra-se bastante efetiva, assim como também alta capacidade de resolução e do alto grau de homogeneidade molecular e atividade biológica.

Para confirmar o grau de pureza e homogeneidade molecular da TLBan recorreremos a diferentes técnicas de sensibilidades variadas (eletroforese, espectrometria de massa, análise

de composição aminoácidos, sequência de aminoácidos) que garantem a pureza no isolamento.

O perfil eletroforético de SDS-PAGE em gel de poliacrilamida da TLBan mostra que existe uma diferença do peso molecular em condições não redutoras com M_r de 26 kDa e redutoras com ditioneitol (DTT) com M_r de 29 kDa (Figura 11-A). Indicando a presença de mais de uma ligação dissulfeto (Cys-S-S-Cys) na molécula da TLBan.

As enzimas trombina “like” purificadas de venenos de serpentes são proteínas de uma sola cadeia polipeptídica com pesos moleculares que variam de 26 a 67 kDa, dependendo de seu conteúdo de carboidratos (Serrano e Maroun, 2005, Kini R. M, 2005). O conteúdo de carboidratos ligados varia largamente 0 a 30% do peso, temos: N-glicanos ligados, fucose, hexose, ácido siálico N-acetil-D-glicosamina (GlcNAc) manose, galactose e ácido N-acetilneuramínico (NeuAc) (Castro *et al.*, 2004).

A fim de investigar a presença de hidratos de carbono na estrutura da enzima TLBan, foi previamente tratado com glicosilases tales como a neuraminidase e PNGase F, que removem os resíduos de ácido siálico e N-açúcares ligados. Nossos resultados através da eletroforese em SDS-PAGE mostram uma diminuição da M_r de 26 kDa a 25 e 22 kDa respectivamente (Figura 11-B).

Estes níveis de glicosilação são responsáveis pela microheterogeneidade encontradas em várias trombinas “like” de veneno de serpente. Nesta análise, é possível sugerir que no veneno só pode existir uma trombina essencialmente idêntica e pode representar uma única enzima com diferentes graus de glicosilação. O papel do carboidrato sobre a relação estrutura-função da trombina do veneno da serpente ainda não é compreendido totalmente. Em muitos casos, demonstrou-se que a N-glicosilação interfere na atividade catalítica dessas enzimas. No entanto, Komori e Nikai (1998) relataram que, em alguns serinoproteinases, os carboidratos são mais importantes para a estabilização de proteínas do que a atividade catalítica. Uma hipótese para a estabilidade é que os glicanos podem direcionar a renaturação da proteína após desnaturação por calor ou pH (Santana *et al.*, 2008), no entanto, a controvérsia continua.

A espectrometria de massa é uma técnica microanalítica mais precisa, porém menos acessível onde deve constar apenas um íon molecular ou os derivados da sua clivagem. A espectrometria de massa por MALDI-TOF confirmou a pureza da TLBan mostra que possui uma massa molecular com uma alta exatidão de 25835,65 Da (Figura 12).

A estrutura primária de TLBan foi determinada pelo sequenciamento deduzido (Banco de dados SwissProt <http://br.expasy.org>) que foi alinhado com outras sequências homólogas de trombina “like” de veneno de serpente (Figura 14) mostrando uma alta homologia com Bat de *Bothrops atrox* (Petretski *et al.*, 2000); Cal de *Gloydius ussuriensis* (Hahn *et al.*, 1996); Gyr de *Lachesis muta muta* (Castro *et al.*, 2001); Cro de *Crotalus adamanteus* (Pirkle *et al.*, 1991), Fla de *Trimeresurus flavoviridis* (Deshimaru *et al.*, 1996), e Anc de *Agkistrodon rhodostoma* (Burkhart *et al.*, 1992).

As serinoproteases geralmente contêm 12 resíduos meia-cistina e aminoácidos, altamente conservados, como a histidina (His), aspartato (Asp) e serina (Ser) presentes no sítio catalítico. A TLBan mostrou a presença dos sítios altamente conservados na posição His (44), Asp (90) e Ser (185), correspondentes à tríade catalítica. Ao analisar os primeiros 15 resíduos de aminoácidos na região N-Terminal mostra uma alta homologia, assim como pela presença de resíduo de valina como o aminoácido em iniciar a sequência, uma característica comum da maioria dos SVTLEs (Andrião-Escarso *et al.*, 1997; Costa *et al.*, 2009).

Embora a região central próxima à tríade catalítica das trombinas “like” de venenos de serpentes seja bastante conservada, estas enzimas apresentam consideráveis diferenças estruturais de uma para outra, o que explica as diferentes especificidades e atividades em relação aos diversos inibidores e substratos (Krem e Di Cera, 2001).

A provável ausência de grupamentos tiols (S-H) livres, podemos sugerir que os resíduos de cisteína encontrados são responsáveis pelas pontes dissulfeto, estes pontes dissulfeto são essenciais para a atividade catalítica, estabilidade da estrutura nativa destas enzimas, uma vez que o tratamento com agentes redutores como β -mercaptoetanol ou ditioneitol (DTT), as inativa, como descrito para flavoridiobina, originada de *Trimeresurus flavoviridis* (Pirkle *et al.*, 1998; Tatematsu *et al.*, 2000). Foi observado que para a TLBan também existem 12 resíduos de cisteína, onde possivelmente possam formar os seis pares de pontes dissulfetos característicos das serinoproteases.

Os aminoácidos que circundam o sítio catalítico também são importantes na especificidade funcional dessas enzimas, uma vez que sua estrutura secundária, através de suas folhas β e α -hélice, têm papel fundamental nesta especificidade, como é citado para a trombina “like” batroxobin e para o ativador de plasminogênio (Castro *et al.*, 2004). Uma vez que determinamos a sequência inteira de TLBan, os resultados experimentais sugerem que a serinoprotease isolada do veneno de *B. andianus* é uma enzima nova com atividade trombina “like”.

A composição de aminoácidos da TLBan mostra a presença de uma grande quantidade de aminoácidos de caráter ácido quanto hidrofóbico; a presença de 12 Cys é indicativo de 6 pontes dissulfeto, as quais estabilizam a estrutura terciária da TLBan, que estão constituídas de 269 resíduos de aminoácidos (Tabela 1), concordando com a composição e estrutura primária reportada para trombinas “like” isoladas de várias subfamílias como: Crotalinae que inclui outros gêneros de serpentes (Agkistrodon, Bothrops, Crotalus, Lachesis, Trimeresurus), Viperinae e Colubrinae (Castro *et al.*, 2004).

Com respeito à caracterização bioquímica das trombinas “like”, existem várias técnicas que facilitam nossa compreensão sobre a estrutura de estas proteínas, tudo isto com a finalidade de entender melhor a funcionalidade dela. Uma das ferramentas mais utilizadas é a obtenção de parâmetros enzimáticos tales como o K_m e V_{max} para substratos cromogênicos sintéticos. A utilização de substratos sintéticos é justificada tendo em vista a alta dificuldade de se obter os substratos naturais em quantidades apreciáveis e graus de pureza aceitáveis. Os substratos cromogênicos do tipo peptidil-pNA mimetizam sequências curtas de aminoácidos dos substratos naturais e permitem o acompanhamento da hidrólise destas ligações peptídicas por leitura espectrofotométrica, facilitando enormemente a obtenção dos parâmetros cinéticos.

Desta forma, a obtenção destes parâmetros de uma determinada enzima que diferem em sua sequência de aminoácidos, pode revelar informações importantes acerca da estrutura tridimensional do centro ativo desta enzima.

Nossos resultados obtidos para as constantes cinéticas da TLBan mostrou um K_m 7.9×10^{-1} mM e V_{max} 5.4×10^{-1} nmoles p-NA/min frente ao substrato DL-BApNA (Figura 16), estas características são semelhantes a outras trombinas “like” procedentes de veneno de serpentes Au *et al.*, (1993); Cavinato *et al.*, (1998) e Petretski *et al.*, (2000).

Frente a diferentes faixas de pH a atividade proteolítica da maioria de trombinas “like” de veneno de serpente mostra sua maior atividade na faixa de 8,0 e 8,5 (Ponce-Soto *et al.*, 2007). Assim, temos que para a TLBan sua atividade ótima foi pH de 8.0 (Figura 17) que foi corroborada frente à atividade fibrinogenolítica *in vivo* (Figura 23-B) assim como para a trombina like de *B. paulensis* (Costa *et al.*, 2009). A temperatura ótima para atividade da TLBan foi em torno de 45°C, e mesmo a 50 - 55°C, esta ainda não havia sofrido uma queda brusca na sua atividade (Figura 18).

Estes resultados confirmam uma característica distintiva das trombinas “like” do veneno de serpente, como a resistência à inativação por extremos de calor e pH, mostrando provavelmente que os hidratos de carbono ligados covalentemente evitam a desnaturação

(Swenson e Markland, 2005, Ponce-Soto *et al.*, 2007; Costa et al., 2009; Vilca-Quispe *et al.*, 2010).

As serinoproteases em geral, assim como aquelas procedentes de veneno de serpentes, podem ser inibidas pela ação do PMSF, um inibidor competitivo, que atua sobre enzimas da classe das serino e cisteína proteases ao agir diretamente na tríade catalítica, sobre o resíduo de serina (Figura 25), impedindo dessa forma que aconteça a catálise (Petretski *et al.*, 2000; Castro et al., 2004; Ponce-Soto *et al.*, 2007).

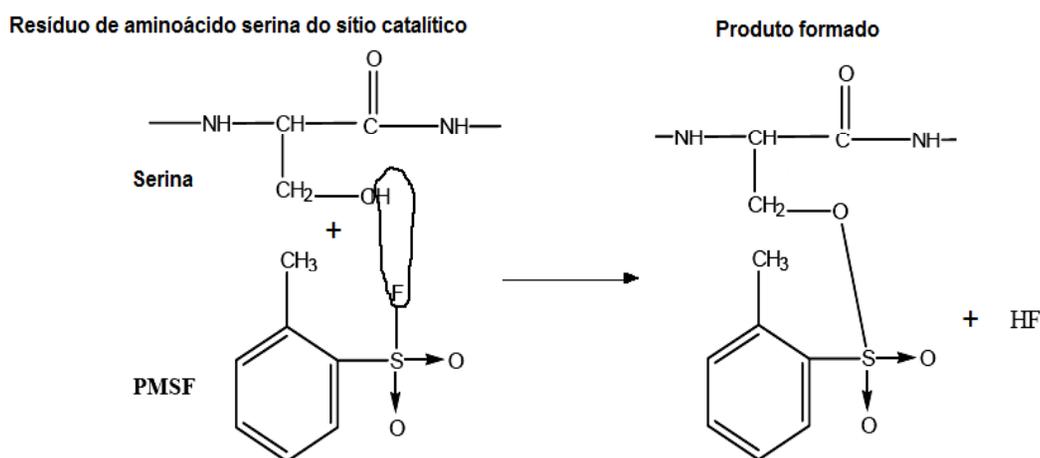


Figura 25. Ligação irreversível do PMSF com o resíduo do aminoácido serina localizado no sítio catalítico das serinoproteases. Ligação do Flúor com o Hidrogênio (Stryer *et al.*, 1995).

Nossos resultados mostram que a atividade proteolítica da TLBan foi inibida completamente pela ação do PMSF e na presença do EDTA, um quelante do metal zinco, a TLBan não apresentou nenhuma modificação em sua atividade (Figura 19) confirmando assim que a TLBan seja uma serinoprotease e não uma metaloprotease, já que essas são dependentes de íons.

O efeito dos íons divalentes sobre a atividade da TLBan apresentaram dois perfis de atuação. Os cátions divalentes, como Zn^{2+} e Cd^{2+} , inibem fortemente a atividade proteolítica e fibrinogênolítica (Figuras 20 e 23-A), enquanto os cátions divalentes, como o Ca^{2+} , Mg^{2+} e Mn^{2+} , não inibem a atividade proteolítica e fibrinolítica nas concentrações testadas.

A discussão deste tema é facilitada pelo uso da nomenclatura sugerida por Schechter e Berger (1967), que será utilizada neste trabalho. Nesta nomenclatura, os aminoácidos na porção N-terminal da ligação peptídica clivada pela protease são enumerados de acordo com sua posição na cadeia, partindo da ligação (P1, P2, P3 e assim por diante). Os aminoácidos da porção C-terminal é numerado como P1', P2', P3', etc. Já os sítios da enzima (um ou mais

aminoácidos) que interagem com os substratos são enumerados como S1,... ou S1',... de acordo com o aminoácido do substrato com o qual interage.

Os cátions presentes no meio provavelmente competem com o substrato pela carga negativa do Asp presente em S1, desfavorecendo a ligação enzima-substrato e consequentemente diminuindo a atividade enzimática. Os cátions com carga dupla exercem um efeito inibidor mais potente, já que competem mais fortemente pela carga negativa do resíduo de Asp no centro ativo da enzima o que explicaria o efeito de estes íons.

A interação entre S1 e P1 em enzimas semelhantes à trombina é de natureza eletrostática, o que dita especificidade destas enzimas por substratos contendo um aminoácido carregado positivamente em P1, Arg ou Lys se deve à presença de um resíduo de Asp em S1 contendo um grupo carboxílico carregado negativamente (Figura 26), portanto, a ligação do substrato ao sítio catalítico é favorecida por esta interação, o que direciona a especificidade da TLBan por grupos carregados positivamente em P1, Lys e Arg, com preferência por este último.

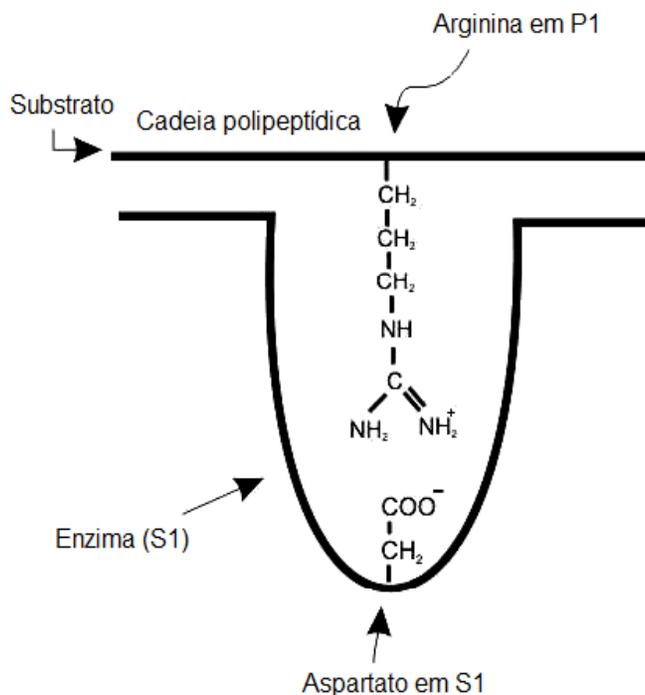


Figura 26. Gráfico de uma serinoprotease que mostra a interação entre Arg situada em **P1** (aminoácido na porção N-terminal da ligação peptídica do substrato) e Asp situado em **S1** (aminoácido da enzima). A interação entre S1 e P1 é de natureza eletrostática. A especificidade destas enzimas pelo substrato se deve a conterem um aminoácido carregado positivamente em P1, Arg ou Lys e em S1 Asp carregado negativamente pelo grupo carboxílico. A ligação do substrato ao sítio catalítico é favorecida por esta interação.

A ligação clivada na cadeia α do fibrinogênio é uma ligação peptídica Arg-Gly, com Arg em P1, daí a atividade sobre o fibrinogênio apresentada pela TLBan. No entanto, íons carregados positivamente em solução competem com o fibrinogênio pela carga negativa do Asp em S1 daí a inibição da atividade fibrinogenolítica apresentada por estes íons. Outro possível fator interferente é a força iônica. Sabe-se que, quanto maior a força iônica de uma solução, menor é a atratividade entre cargas opostas. Assim, o aumento da concentração de íons em solução aumenta a força iônica e conseqüentemente prejudica todas as interações eletrostáticas entre o fibrinogênio e a TLBan, inclusive a interação S1-P1, levando então a uma diminuição da atividade fibrinogenolítica, como foi verificado por Magalhães *et al.*, (2010).

A etapa de polimerização não sofre interferência da TLBan, já que é um processo espontâneo. Porém, esta etapa de polimerização é acelerada na presença de íons cálcio. Tal efeito foi descrito por Brass e cols (1978). Em seu trabalho, Brass mostrou que o cálcio não é necessário, mas quando presente acelera a polimerização da fibrina, reduzindo o tempo de coagulação. Em outro trabalho, Kanaide e cols (1982) mostraram que não só o cálcio, mas diversos íons divalentes que aceleram a polimerização de fibrina, reduzindo da mesma forma o tempo de coagulação. Masahisa e cols. (1983) descreveram que, além do cálcio, o magnésio também reduz o tempo de coagulação. Já em um trabalho de Marx (1988) está descrito que o magnésio, na concentração de 0,5 mM, não altera significativamente a formação do coágulo de fibrina.

Existem serinoproteases que têm atividade fibrinogenolítica e fibrinolítica, mas muitas delas especificamente clivam somente fibrinogênios, liberando preferencialmente fibrinopeptídeos A (venobim A) ou fibrinopeptídeos B (venobim B), ou ambos fibrinopeptídeos A e B (venobim AB), promovendo a coagulação. Já que as serinoproteases imitam a função das trombinas de mamíferos de clivar os fibrinopeptídeos A e os fibrinopeptídeos B, eles têm sido conhecidos como enzimas trombina “like” (Markland, 1998).

Quando as trombinas “like” clivam as cadeias α e/ou β do fibrinogênio liberando fibrinopeptídeos A e/ou B, converte-se o fibrinogênio em fibrina com conseqüente formação de monômeros de fibrina. Essas quebras não são exatamente idênticas aos liberados pelas enzimas α -trombinas de mamíferos, já que estas enzimas trombina “like” não ativam o fator XIII de coagulação e só liberam os monômeros de fibrina que não são entrecruzados, fazendo que os coágulos formados sejam coágulos de fibrina solúvel e estes sejam rapidamente

dispersados (Serrano e Maroun, 2005), dificultando a coagulação. Estas enzimas têm sido utilizadas como agentes desfibrinogénantes em várias condições clínicas de coagulopatias (Neville e Vaughan, 2005).

Nosso resultados mostram que a TLBan tem atividade procoagulante frente ao fibrinogênio bovino, revelando assim sua atividade de trombina “like” hidrolisando as cadeias polipeptídicas α e β do fibrinogênio bovino, mas não a cadeia γ ; o que sugere que a TLBan pertence ao grupo venobim AB (Figura 22).

Uma gama de toxinas de serpentes evoluiu para influenciar a agregação plaquetária e coagulação do sangue (Pirkle e Markland, 1987). Vários trombinas “like” influenciam a agregação plaquetária através de interações com receptores na superfície das plaquetas, tais como Bothrombin de *B. jararaca* (Nishida *et al.*, 1994) Calobin de *Agkistrodon caliginosus* (Kim *et al.*, 1998) Cerastocitin de *Cerastes cerastes* (Marrakchi *et al.*, 1995) PA-BJ de *B. jararaca* (Serrano *et al.*, 1995), TLBm de *B. marajoensis* (Vilca-Quispe *et al.*, 2010).

Ativação e agregação plaquetária pode ser desencadeada por vários receptores bem definidos na superfície das plaquetas. Sob condições fisiológicas típicas, GPIb-V-IX e α IIb β 3 integrina interagir com o fator de von Willebrand, quando este tornou-se anexado ao colágeno extracelular. Colágeno se interage com a imunoglobulina superfamília de receptores GPVI e a integrina α 2 β 1 (Lusis, 2000; Ruggeri, 2002). Há um interesse grande em biomédica no descobrimento de novos receptores de ativação das plaquetas e, neste aspecto a identificação dos alvos sobre as plaquetas de proteínas do veneno de serpente tem sido um objetivo importante (Aleksandra *et al.*, 2011).

Nosso resultados de agregação plaquetária mostram que a TLBan tem capacidade de agregar plaquetas num 40 % em comparação com a trombina bovina que alcança um 80 % e na presença do PMSF foi inibida esta atividade (Figura 24) já que a trombina é um agonista plaquetário que aumenta o processo de agregação plaquetária. Não sendo isto para todas as trombinas “like” já que atuam como agentes com ação antiplaquetária como a botrojaracina, um potente inibidor de pró-trombina e trombina presente no veneno da serpente *Bothrops jararaca* (Zingali *et al.*, 2005; Lima *et al.*, 2008).

Essas anuências reveladas entre as trombinas “like” deve-se a microheterogenidade molecular relacionada com as separações geográficas, mostrado no processo micro-evolutivo (Ponce-Soto *et al.*, 2009). A variação individual na composição de venenos é uma característica comum, em maior ou menor medida em todas as espécies de serpentes venenosas Gibbs *et al.* (2011). Calvete (2008) explica: "Esta teoria liga com o conceito atual

de espécie como uma metapopulação de indivíduos portadores de um mesmo genoma, mas dotado de notáveis diferenças fenotípicas”.

A velocidade de coagulação ocasionada pelo o veneno *Bothropico* varia nas diferentes espécies. A coagulopatias de consumo ocorre quando o fibrinogênio é ativado em fibrina pela rápida absorção do veneno pela circulação sanguínea. A fibrina formada prontamente ativa o sistema fibrinolítico que promove a degradação da mesma. A deposição de microtrombos formados pode ocorrer nos capilares glomerulares e contribuir para o quadro de Insuficiência Renal Aguda (IRA). Dentre os vários fatores que desencadeiam a Insuficiência Renal Aguda (IRA) estão ainda o seqüestro de líquidos para o local da picada no acidente botrópico e desequilíbrio hidreletrolítico e nefrotoxicidade direta. Este fato desencadeia os quadros clínicos de oligúria, anúria e posteriormente Insuficiência Renal Aguda (IRA), principal causa *mortis* dos pacientes (Azevedo-Marques *et al*, 1985; Amaral *et al*, 1986; Cardoso *et al*, 2003).

As serinoproteases bothrombin de *B. jararaca* e TLBm de *Bothrops marajoensis* apresentam atividade coagulante sobre o fibrinogênio (Serrano, 2005; Vilca-Quispe *et al.*, 2010). De maneira similar a fração I-4 (TLBan) induz a coagulação do fibrinogênio num tempo 6.9 segundos e a fração I do sephadex em 55 segundos (Tabela 3) e o índice de coagulação (IC) da TLBan foi de 144,93 s⁻¹ valor alto em comparação para a TLBm de *Bothrops marajoensis* (Vilca-Quispe *et al.*, 2010) com IC de 55,5 s⁻¹ e uma dose mínima coagulante (DMC) de 1,33 ± 0,25 µg/mL (Figura 21).

O estudo aprofundado dos tempos de coagulação no processo hemostático é de grande importância para o campo medico, como agentes terapêuticos no tratamento de doenças hemostáticas. Por isso, atualmente existe um enorme investimento das indústrias farmacêuticas e de centros de pesquisas para a busca e o desenvolvimento de novos fármacos.

As perspectivas futuras para a nova trombina “like” de *B. andianus* (TLBan), ela poderia ser usada clinicamente na prevenção e no tratamento de várias doenças vasculares como infarto, derrame cerebral e, principalmente, da trombose assim como no transplantes de órgãos e cirurgias vasculares. Em conjunto com outras substâncias, ela poderia ser usada como uma cola biológica, trabalhos feitos com esta cola biológica mostram que impede a formação de marcas ou cicatrizes no local da lesão, como acontece em pacientes com pontos cirúrgicos. Outra vantagem da cola é que o organismo reabsorve totalmente essa substância, sem apresentar nenhum efeito colateral.

Stolf (1998) a utilizou em 21 pacientes caucasianos, portadores de tumores cutâneos na região nasal. Para a síntese cutânea da área doadora, isto é, o sulco nasogeniano, o autor

usou adesivo de fibrina no lado direito e sutura do lado esquerdo. Na avaliação tardia, o aspecto da cicatriz foi excelente no lado da cola e bom no da sutura. Ele teve capacidade adesiva total de 66,7% e parcial de 33,3%, constituindo-se em método alternativo na cirurgia cutânea.

Pensar hoje em um medicamento que ajude no tratamento dessas patologias nada mais é que pensar em um futuro próximo. Porém, há um longo caminho entre o estudo da enzima TLBan e a elaboração de uma nova droga que possa estar disponível no mercado. Pode levar anos para um medicamento ser comercializado, mas o primeiro passo para que isso aconteça já foi dado no presente trabalho de investigação.

CONCLUSÕES

- Foi purificada uma nova serinoprotease com atividade trombina “like” por meio de uma combinação de cromatografia líquida convencional (Sephadex G-75) e de uma cromatografia de alta eficiência (HPLC de fase reversa), procedentes de veneno de *Bothrops andianus*.
- A eletroforese em SDS-PAGE determinou uma massa molecular relativa de 29 kDa em condições reduzidas e 26 kDa em condições não reduzidas que foi confirmada pela espectrometria de massa, com uma massa molecular de 25 835,65 Da, após quando foi sometida a desglicosilação com a PNGase F e a neuraminidase, a massa relativa de TLBan diminuiu a 22 kDa e 25 kDa, respectivamente, mostrando assim que a TLBan é uma glicoproteína que contém N-ligados de hidratos de carbono e ácido siálico em sua estrutura.
- Os estudos da caracterização estrutural da TLBan mostraram que tem um caráter ácido pela composição de aminoácidos e uma alta homologia sequencial de sua estrutura primaria com outras serinoproteases com atividade trombina “like”.
- Os parâmetros cinéticos da TLBan mostraram um K_m de 7.9×10^{-1} mM e uma V_{max} 5.4×10^{-1} nmoles pNA/min, estabilidade a pH 8,0 e temperatura de 45 °C e uma alta atividade frente aos íons Ca^{2+} , Mg^{2+} e Mn^{2+} assim como inibição pelo PMSF, o que confirma o caráter trombina “like” da TLBan.
- A TLBan mostra atividade fibrinogenolítica, liberando os fibrinopeptídeos A e B, por estas características pertence ao grupo venobim AB, tem maior atividade fibrigênolítica na presença dos íons Ca^{2+} , Mg^{2+} e Mn^{2+} e a pH 8, mesmo assim, apresenta um IC de 144,93 s^{-1} uma dose mínima coagulante (DMC) de $1,33 \pm 0,25$ $\mu g/mL$ e induz á agregação Plaquetária.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aleksandra, A., Watson, Christopher, A., 2011. Molecular Analysis of the Interaction of the Snake Venom Rhodocytin with the Platelet Receptor CLEC-2. *Toxins (Basel)*. 3: 991–1003.
- Allford, S. L., Machin, S. J., 2004. Hemostasis. *Surgery, Saint Loius* 22(8), 200a-200d.
- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schaffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D.J., 1990. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic. Acids. Res.* 25, 3389–3402.
- Amiconi, G., Amoresano, A., Boumis, G., Brancaccio, A., de Cristofaro, R., de Pascalis, A., Girolamo, S., Maras, B., Scaloni, A., 2000. A Novel Venombin B from *Agkistrodon contortrix contortrix*: Evidence for recognition properties in the surface around the primary specificity pocket different from Thrombin. *Biochemistry*. 39, 10294-10308.
- Arni, R.K, Ward R.J, 1996. Phospholipase A₂ A structural review. *Toxicon* 34, 827-841.
- Arocha- Piñango, C.L., Marval, E., Guerrero. B., 2000. Lonomia genus caterpillar toxins: biochemical aspects. *Biochimie* 82, 937-942.
- Au, L.C., Lin, S.B., Chou, J.S., The, G.W., Chang, K.J., Shih, C.M., 1993. Molecular cloning and sequence analysis of cDNA for ancrod, a thrombinlike enzyme from the venom of *Calloselasma rhodostoma*. *Biochemistry* 294, 387–390.
- Baker, B.J., Tu A.T., 1996. Atroxase: a fibrinolytic enzyme isolated from the venom of western diamondbackrattlesnake: isolation, characterization and cloning. *Toxicon*. 34, 291.
- Baldwin, C.J., Cowell, R.L., Kostolich, M., Tyler, R. D., Sempere, D.C., 1998. Hemostasia: fisiologia e tratamento dos distúrbios hemorrágicos em paciente cirúrgicos. In: Slatter, D. *Manual de cirurgia de pequenos animais*. 2. ed, São Paulo: Manole 3, 36-65.
- Barrett, A.J.; Rawlings, N.D., 1995. Families and clans of serine peptidases. *Arch. Biochem. Biophys.* 318, 247-250.
- Bjarnason, J.B., Barish, A., Drenzo, G.S., Campbell, R., Fox, J.W., 1983. Kallikrein-like enzymes from *Crotalus atrox* venom. *J. Biol. Chem.* v. 258, p.12566-12573.
- Blevins, R. A. & Tulinsky, A., 1985. Refinement and the structure of the dimer of alpha-chymotrypsin at 1.67-Å resolution. *J Biol. Chem.* 260, 4264-75.
- Born, G.V.R., Cross, M.J., 1963. The aggregation of blood platelets. *J Physiol (Lond)*. 168,178-195.
- Braga, M.D., Martins, A.M., Amora, D.N., de Menezes, D.B., Toyama, M.H., Toyama, D.O., Marangoni, S., Barbosa, P.S., de Sousa Alves, R., Fonteles, M.C., Monteiro, H.S., 2006. Purification and biological effects of C-type lectin isolated from *Bothrops insularis* venom. *Toxicon*. 47, 859-67.
- Brass, Forman, E.P., Edwards, W.B., Lindan, R.V., 1978. Fibrin formation: effect of calcium ions. *Blood*, 52, 654-658.
- Braud, S., Bon, C., Wisner, A., 2000. Snake venom proteins acting on hemostasis. *Biochimie* 82, 851-859.
- Burkhart, W., Smith, G.F., Su J.L., Parikh I., LeVine, H., 1992. Amino acid sequence determination of ancrod, the thrombin-like alpha-fibrinogenase from the venom of *Akistrodon rhodostoma*. *FEBS Lett.* 10, 297-301.
- Calvete, J.J., 2010. Antivenomics and venom phenotyping: A marriage of convenience to address the performance and range of clinical use of antivenoms. *Toxicon*. 56, 1284-91

- Campbell, J. A. & Lamar, W. 2004. The venomous reptiles of the western hemisphere. Parte I. Cornell University, 475.
- Campbell, J. A. & Lamar, W. W., 1989. The Venomous Reptiles of Latin America. Ithaca. London, 425.
- Carlson, K.S., Desancho, M.T., Hematological issues in critical patients with cancer III. Critical Care Clinics, Philadelphia. 26, 107-132.
- Castro, H.C., Silva, D.M., Craik, C., Zingali, R.B., 2001. Structural features of a snake thrombin-like enzyme: thrombin and trypsin on a single catalytic platform. Biochim. Biophys. Acta. 1547, 183-195.
- Castro, H.C., Zingali, R.B., Albuquerque, M.G., 2004. Snake venom thrombin-like enzymes: from reptilase to now. Cell Mol Life Sci. 61(7-8), 843-856.
- Castro, H.C., Zingali, R.B., Albuquerque, M.G., Pujol-Luz, M., Rodrigues, C.R., 2004. Snake venom thrombin-like enzymes: from reptilase to now. Cell. Mol. Life. Sci. 61, 843-856.
- Cavinato, R.A.; Remold, H.; Kipnis, T.L. (1998) Purification and characterization of thrombin-like activity from the venom of *Bothrops atrox* of different geographic region. Toxicon, 36, 257-268
- Chevillat, N.F., 2009. Hemostasia e trombose. In: CHEVILLE, N. F. Introdução à patologia Veterinária. 3 ed, Barueri, São Paulo: Manole 6, 146-151.
- Chippaux, J.P. (1998) Snake bites: appraisal of the global situation. Bull. World Health. Organ 76, 515-524.
- Declerck, Y.A., Imren, S., 1994. Protease inhibitors: role and potential therapeutic use in human cancer. Eur. J. Cancer 30, 2170-2180.
- Deshimaru, M.; Ogawa, T.; Nakajima, K.; Nobuhisa, I.; Chijiwa, T.; Shimohigashi, Y.; Fukumaki, Y.; Niwa, M.; Yamashina, I.; Hattori, S.; Ohno, M. ,1996. Accelerated evolution of crotalinae snake venom gland serine proteases. FEBS Lett. 397: 83-88
- Dufton, M. J., 1990. Could domain movements be involved in the mechanism of trypsin-like serine proteases?; FEBS Letters, 271; 1-2, 9-13.
- Erlanger, B.P.; Kokowsky, N.; Cohen, W. (1961) The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. Arch Biochem Biophys, 95, 271-278.
- França, F.O.S.; Málaque, C.M.S., 2003. Acidente Botrópico. In: Animais Peçonhentos no Brasil: Biologia, Clínica e Terapêutica dos acidentes. 72-86.
- Gutiérrez, J.M., Lomonte, B., 1997. Phospholipase A2 myotoxins from Bothrops snake venoms. In: Kini R.M, (Ed.), Venom Phospholipase A2 Enzymes: Structure, Function and Mechanism, Wiley, Chichester, England, pp. 321-352.
- Gutiérrez, J.M., Lomonte, B., 2003. Efeitos Locais no Envenenamento Ofídico na America Latina - Animais peçonhentos no brasil: Biologia, Clínica e Terapêutica dos Acidentes Ed. Sarvier, São Paulo Cap 32 pp 310-323.
- Hahn, B.S.; Yang, K.Y.; Park, E.M.; Chang, I.M.; Kim, Y.S., 1996. Purification and molecular cloning of calobin, a thrombin-like enzyme from *Agkistrodon caliginosus* (Korean viper). J. Biochem. 119, 835-843.
- Harris, J.B., 2003. Myotoxic phospholipases A2 and regeneration of skeletal muscles. Toxicon. 42, 933-945.
- Henschen-Edman, A.H., Theodor, I., Edwards, B.F., Pirkle, H., 1999. Crotalase, a fibrinogen-clotting snake venom enzyme: primary structure and evidence for a fibrinogen recognition exosite different from thrombin. Thromb. Haemost. 81(1), 81-86.
- Humphrey, H., Dalke, A., Schulten, K., 1996. VMD - Visual Molecular Dynamics. J. Molec. Graphics 14, 33-38.

- Iskander, G.P., Cheng, E.Y., 1999. Fundamentals of normal hemostasis. *Anesthesiology Clinics of North America*, Philadelphia 17(4), 715-731.
- Itoh, N., Tanaka, N., Mihashi, S., Yamashina, I., 1987. Molecular cloning and sequence analysis of cDNA for batroxobin, a thrombin-like snake venom enzyme. *J. Biol. Chem.* 262, 3132-3135.
- Kamiguti, A.S., Hay, C.R.M., Theakston, R.D.G., Zuzel, M., 1996. Insights into mechanism of haemorrhage caused by snake venom metalloproteinases. *Toxicon* 34, 627-642.
- Kanaide, H., Uranishi, T., Nakamura, M., 1982. Effect of divalent cations on the conversion of fibrinogen to fibrin and fibrin polymerization. *American Journal of Haematology* 13, 229-237.
- Kini R.M. (2005a) Serine proteases affecting blood coagulation and fibrinolysis from snake venoms. *Pathophysiol Haemost Thromb.* 34, 200-4.
- Kini, R.M., 1997. Phospholipase A₂: a complex multifunctional protein puzzle in: R. M. Kini (Ed), *Venom Phospholipase A₂ enzymes: Structure, Function and Mechanism*, Wiley, Chichester. 1-28.
- Kini, R.M., 2005. Serine Proteases Affecting Blood Coagulation and Fibrinolysis from Snake Venoms. *Pathophysiol Haemost. Thromb.* 34, 200–204.
- Kisiel, W., 1979. Molecular properties of the Factor V-activating enzyme from Russell's viper venom. *J. Biol. Chem.* 254 (23), 12230–12234.
- Kisiel, W.; Kondo, S.; Smith, K.J.; McMullen, B.A.; Smith, L.F., 1987. Characterization of a protein C-activator from *Agkistrodon contortrix contortrix* venom. *J. Biol. Chem.* 262 (26), 12607-12613.
- Kornalik, F., 1990. Toxins affecting blood coagulation and fibrinolysis. In: *Handbook of Toxicology* 683 (Shier, W.T. and Mebs, D., Eds) New York: Marcel Dekker.
- Krem, M.M., Rose, T., Di Cera, E., 2001. Sequence determinants of function and evolution in serine proteases. *Trends Cardiovasc Med.* 10, 171-176.
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–685.
- Lusis, A.J., 2000. Atherosclerosis. *Nature.* 407:233–241.
- Magalhães P.B.H, Teixeira-de-Sena, M.P., Nelson, L.E., 2010. Kinetic Characterization of Leucurobin, a Coagulant Thrombin-Like Enzyme from the Venom of *Bothrops leucurus*. *The Open Toxicology Journal*, 4, 32-38
- Magalhães, A., Campos-Brasil Da Fonseca, B., Ribeiro Diniz, C., Gilroy, J., Richardson, M., 1993. The complete amino acid sequence of a thrombin-like enzyme gyroxin analogue from venom of the bushmaster snake (*Lachesis muta muta*). *FEBS Lett.* 329, 116-120.
- Markland, F.S., 1976. Crotalase. *Methods Enzymol.* 45, 223–236
- Markland, F.S., 1998. Snake venoms and the hemostatic system. *Toxicon.* 36, 1.749-1800
- Maruñak, S.L., Acosta, O.C., Leiva, L.C., Ruiz, R.M., Aguirre, M.V., Teibler, P., 2004. Mice plasma fibrinogen consumption by thrombin-like enzyme present in rattlesnake venom from the north-east region of Argentina. *Medicina (Buenos Aires).* 64, 509-17.
- Marx, G., 1988. Zinc binding to fibrinogen and fibrin. *Arch of Biochem and Bioph.* v.266-1, 285-288.
- Masahisa, O., Blomback, B., 1983. Calcium and fibrin gel structure. *Thrombosis Research,* 29, 269-280.
- Matsui, T., Sakurai, Y., Fujimura, Y., Hayashi, Oh-Ishi, S., Suzuki, M., Hamako, J., Yamamoto, Y., Yamazaki, J., Kinoshita, M., Titani, K., 1998. Purification and amino acid sequence of lialystase from snake venom of *Agkistrodon halys biomhoffii*, a

- serine protease that cleaves specifically fibrinogen and kininogen. *Eur. J. Biochem.* 252, 569-575.
- Mazzi, M.V., Marcussi, S., Carlos, G.B., Stábeli, R.G., Franco, J.J., Tieli, F.K., Cintra, A.C.O., França, S.C., Soares, A.M., Sampaio, S.V., 2004. A new hemorrhagic metalloprotease from *Bothrops jararacussu* snake venoms: isolation and biochemical characterization. *Toxicon* 44, 215-223.
- Mcmullen, B.A., Fujikawa, K., Kisiel, W., 1989. Primary structure of a protein C activator from *Agkistrodon contortrix contortrix* venom. *Biochemistry* 28, 674-679.
- Meier, J., Stocker, K., 1991. Effects of snake venoms on hemostasis. *Crit. Rev. Toxicol* 21 171-182.
- Moran, T. A.,Viele, C. S., 2005. Normal clotting. *Seminars in Oncology Nursing*, Orlando 21, 1-11.
- Mosier, D. A., 2007. Vascular disorders and thrombosis. In: MACGRAVIN, Z. Pathologic basis of veterinary disease. 4. ed, St. Louis: Mosby Elsevier 2, 74-82.
- Nahas, L.; Kamiguti, A.S.; Barros, M.A.R. (1979) Thrombin-like and factor-X activator components of *Bothrops* snake venoms. *Thromb. Haemst.* 41: 314-328.
- Neurath, H., 1984. Evolution of Proteolytic Enzymes. *Science* 224, 350-357.
- Neville, M.; Vaughan, W. (2005) Practical applications of snake venom toxins in haemostasis. *Toxicon* 45, pp. 1171-1181.
- Nikai, T. Ohara, A., Komori, Y., Fox, J.W., 1995. Sugihara H. Primary structure of a coagulant enzyme, bilineobin, from *Agkistrodon bilineatus* venom. *Arch. Biochem. Biophys.* 318, 89-96.
- Ouyang, C., Teng, C.M., 1976. Fibrinogenolytic enzymes of *Trimeresurus mucrosquamatus* venom. *Biochim. Biophys.*
- Ownby, C.L.; Colberg, T.R.; Odell, G.V., 1984. A new method for quantitating hemorrhage induced by rattlesnake venoms: Ability of polyvalent antivenom to neutralize hemorrhagic activity. *Toxicon* 22, 227-233.
- Parry, M.A., Jacob, U., Huber, R., Wisner, A., Bon, C., Bode, W., 1998. The crystal structure of the novel snake venom plasminogen activator TSV-PA: a prototype structure for snake venom serine proteinases. *Structure* 6, 1195-1206.
- Perona, J.J., Craik, C.S., 1997. Evolutionary divergence of substrate specificity within the chymotrypsin-like serine protease fold. *J. Biol. Chem.* 272, 29987-29990.
- Petretski J.H., Kanashiro, M., Silva, C.P., Alves E.W., Kipnis T.L., 2000. Two related thrombin-like enzymes present in *Bothrops atrox* venom. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 33, 1293-1300.
- Pinho, F.M.O., Pereira, I.D., 2001. Ofidismo. *Rev Assoc. Med. Bras.* 47, 24-29.
- Pirkle, H. & Markland, F.S., 1998. Hemostasis and animal venoms. New York, USA, Marcel Dekker Inc. 149-172.
- Pirkle, H., 1998. Thrombin-like enzymes from snake venoms: an updated inventory. Scientific and Standardization Committee's Registry of Exogenous Hemostatic Factors. *Thromb. Haemost* 79, 675-683.
- Pirkle, H., Markland, F.S., 1987. Hemostasis and Animal Venoms. Dekker; New York, NY, USA
- Pirkle, H.; Stocker, K. (1991) Thrombin-like enzymes from snake venoms: an inventory. For the Subcommittee on Nomenclature of Exogenous Hemostatic Factors of the Scientific and Standardization Committee of the International Society on Thrombosis and Hemostasis. *Thrombosis and Haemostasis.* 65, 444-450.
- Plaisier, B.R., 2001. Surgical perspectives to control bleeding in trauma. *Seminars in Anesthesia, Perioperative Medicine and Pain*, Orlando 20(1), 11-17.

- Ponce-Soto, L.A., Bonfim, V.L., Novello, J.C., Navarro Oviedo, R., Yarlequé Chocas, A., Marangoni, S., 2007. Isolation and Characterization of a Serine Protease, Ba III-4, from Peruvian *Bothrops atrox* venom. The Protein Journal ISSN/ISBN: 1572887.
- Ponce-Soto, L.A., Bonfim, V.L., Rodrigues-Simioni, L., Novello, J.C., and Marangoni S., 2006. Determination of primary structure of two isoforms 6-1 and 6-2 PLA2 D49 from *Bothrops jararacussu* snake venom and neurotoxic characterization using in vitro neuromuscular preparations, Protein J, 25:147-55.
- Ponce-Soto, L.A.; Barros, J.C.; Marangoni, S.; Hernandez, S.; Dal Belo, C.A.; Corrado, A.P.; Hyslop, S.; Rodrigues-Simioni, L., 2009. Neuromuscular activity of BaTX, a presynaptic basic PLA2 isolated from *Bothrops alternatus* snake venom. Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol. 150, 291-297.
- Rodríguez-Acosta, A., Sánchez, E.E., Márquez, A., Carvajal, Z., Salazar, A.M., Girón, M.E., Estrella, A., Gil, A., Guerrero, B., 2010. Hemostatic properties of Venezuelan *Bothrops* snake venoms with special reference to *Bothrops isabellae* venom. Toxicon. 56, 926-35.
- Rucavado, A., Lomonte, V., Obadia, M., Gutierrez, J.M., 1995. Local tissue damage induced by BaP1, a metalloproteinase isolated *Bothrops asper* (Terciopelo) snake venom. Exp Mol Pathol. 63, 186 - 99.
- Ruggeri, Z.M., 2002. Platelets in atherothrombosis. Nat. Med. 8:1227–1234.
- Sant'Ana, C.D.; Ticli, F.K.; Oliveira, L.L.; Giglio, J.R.; Rechia, C.G.; Fuly, A.L.; Selistre de Araújo, H.S.; Franco, J.J.; Stabeli, R.G.; Soares, A.M.; Sampaio, S.V., 2008. BjuSSP-I: A new thrombin-like enzyme isolated from *Bothrops jararacussu* snake venom. Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: 151, 443–454.
- Schechter, I., and Berger, A., 1967. Biochem. Biophys. Res. Commun. 27,157
- Serrano, M.T.S.; Maroun, C.R. (2005) Snake venom serine proteases: sequence homology vs. Substrate specificity, a paradox to be solved. Toxicon 45: pp. 1115-1132.
- Serrano, S.M., Hagiwara, Y., Murayama, N., Higuchi, S., Mentele, R., Sampaio, C.A., Camargo, A.C., Fink, E., 1998. Purification and characterization of a kinin-releasing and fibrinogen-clotting serine proteinase (KN-Bj) from the venom of *Bothrops jararaca* and molecular cloning and sequence analysis of its cDNA. Eur.J.Biochem. 251, 845-853.
- Serrano, S.M.T.; Reinhardt M.; Sampaio, C.A.M.; Fink, E. (1995) Purification, characterization and amino acid sequence of a serine proteinase, PA-BJ, with platelet aggregating activity from the venom of *Bothrops jararaca*. Biochemistry, 34: 7186-7193.
- Siigur, E., Aaspollu, A., Siigur, J, 1999. Molecular cloning and sequence analysis of a cDNA for factor V activating enzyme. Biochem. Biophys. Res. Commun.w. 262, 328-332.
- SINAN-Sistema Nacional de Agravos de Notificação. Estatística 2006. Ministério da Saúde. Disponível em <http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb>.
- Soliman, D.E., Broadman, L.M., 2006. Coagulation defects. Anestesiología Clin. 24, 549-78.
- Stocker, K.F., Meier, K., 1988. Thrombin-like snake venom enzymes. In: Pirkle, H., Markland Jr. Jr., F.S. (Eds.), Hemostasis and animal venoms. Marcel Dekker 67–84.
- Swenson S, Markland FS, Jr. (2005) Snake venom fibrin(ogen)olytic enzymes. Toxicon 45, 1021-39
- Tambourgi, D.V., Magnoli, F.C., Eickstedt, V.R.D., Benedetti, Z.C., Petricevich V.L., Dias da Silva, W., 1995. Incorporation of a 35-kilodalton purified protein from *Loxosceles intermedia* spider venom transforms human erythrocytes into activators of autologous complement alternative pathway. J. Immunol. 155, 4459–4466

- Tatematsu, R., Komori, Y., Nikai, T., 2000. A new thrombin-like enzyme, flavoviridiobin from the venom of *Trimeresurus flavoviridis* (habu) venom. *J Nat Toxins* 9, 327-339.
- Teixeira, C.F.P., Landucci, E.C.T., Antunes, E., Chacur, M., Cury, Y., 2003. Inflammatory effects of snake venom myotoxic phospholipases A₂. *Toxicon*, 42, 947-962.
- Tokunaga, F., Nagasawa, K., Tamura, S., Miyata, T., Iwanaga, S., Kisiel, W., 1988. The factor V-activating enzyme (RVV-V) from Russell's viper venom. Identification of isoproteins RVV-V alpha, beta, and gamma and their complete amino acid sequences. *J. Biol. Chem.* 263, 17471-17481.
- Valentín e Lambeau, 2000;
- Vilca-Quispe, A., Ponce-Soto L.A., Winck F.V., Marangoni S., 2010. Isolation and characterization of a new serine protease with thrombin-like activity (TLBm) from the venom of the snake *Bothrops marajoensis*. *Toxicon* 55, 745–753
- Vizotto, L.D., 2003. Serpentes: Lendas, Mitos, Superstições e Crendices. São Paulo – SP: Plêiade.
- Wang, Y.M., Wang, S.R., Tsai, L.H., 2001. Serine protease isoforms of *Deinagkistrodon acutus* venom: cloning, sequencing and phylogenetic analysis. *Biochem.J.* 354, 161-168.
- Wenzel, H.R.; Tschesche, H., 1995. Reversible inhibitors of serine proteases. In: *Peptides: Synthesis, Structures and Applications*. Academic Press, Inc.
- White, J., 2005. Snake venoms and coagulopathy. *Toxicon* 45, 951-967.
- Yamamoto, C., Tsuru, D., Oda-Ueda, N., Hattori, S., Kim, S.T., 2002. Flavoxobin, a serine protease from *Trimeresurus flavoviridis* (habu snake) venom, independently cleaves Arg 726-Ser-727 of human C3 and acts as a novel, heterologous C3 convertase, *Immunology* 107, 111-117.
- Zaganelli, G.L., Zaganelli, M.G.M., Magalhaes, A., Diniz, C.R., De Lima, E.M., 1996. Purification and characterization of a fibrinogen-clotting enzyme from the venom of Jaracuçu (*Bothrops jararacussu*). *Toxicon* 34, 807-819.
- Zhang, Y., Gao, R., Lee, W.H., Zhu, S.W., Xiong, Y.L., Wang, W.Y., 1998. Characterization of a fibrinogen-clotting enzyme from *Trimeresurus stejnegeri* venom, and comparative study with other venom proteases, *Toxicon* 36, 131–142.

ANEXO



UNICAMP



CEUA/Unicamp

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

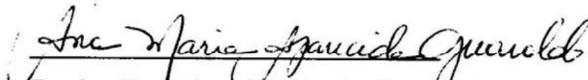
CERTIFICADO

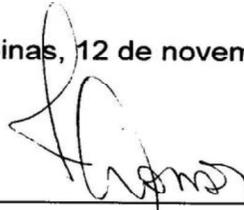
Certificamos que o Protocolo nº 2288-1, sobre "Achado no veneno da serpente *Bothrops andianus*: Isolamento e caracterização thrombin-like de uma nova serinoprotease", sob a responsabilidade de Prof. Dr. Sérgio Marangoni / José Antônio Valeriano Zapana, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/Unicamp em 12 de novembro de 2010

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº 2288-1, entitled "Found in the venom of *Bothrops andianus*: Isolation and characterization of a thrombin-like serine protease new", 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 November 12, 2010.

Campinas, 12 de novembro de 2010.


Prof. Dra. Ana Maria A. Guaraldo
Presidente


Fátima Alonso
Secretária Executiva

CEUA/UNICAMP
Caixa Postal 6109
13083-970 Campinas, SP – Brasil

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

DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins que o conteúdo de minha dissertação detese de Mestrado intitulada: Purificação e caracterização biológica de uma nova serinoprotease com atividade trombina “like” do veneno total de *Bothrops andianus* (TLBan)

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

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

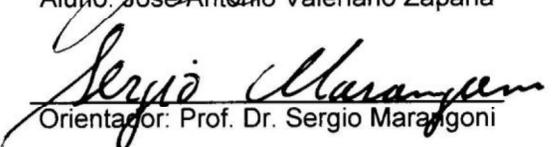
() CIBio – Comissão Interna de Biossegurança , projeto No. _____, Instituição: _____

(X) CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais , projeto No.2288-1, Instituição: Instituto de Biologia, Unicamp.

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

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


Aluno: José Antonio Valeriano Zapana


Orientador: Prof. Dr. Sergio Marangoni

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

(X) Deferido () Indeferido

Carimbo e assinatura


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

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

() Deferido () Indeferido

Carimbo e assinatura