



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

MAGALY ALEJANDRA BROUSETT MINAYA

Avaliação das atividades farmacológicas de uma serinoprotease, isolada a partir do veneno total de *Bothrops barnetti*

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo(a) candidato (a) Magaly Alejandra Brousett Minaya e aprovada pela Comissão Julgadora.

Sergio Marangoni

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

Orientador: Prof. Dr. Sergio Marangoni
Co-orientador: Prof. Dr. Luis Alberto Ponce Soto

Campinas – SP

2012

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

M661a	<p>Minaya, Magaly Alejandra Brousett, 1977- Avaliação das atividades farmacológicas de uma serinoprotease, isolada a partir do veneno total de <i>Bothrops barnetti</i> / Magaly Alejandra Brousett Mainaya. – Campinas, SP: [s.n.], 2012.</p> <p>Orientador: Sergio Marangoni. Coorientador: Luis Alberto Ponce Soto. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.</p> <p>1. <i>Bothrops barnetti</i>. 2. Serinoprotease. 3. Hemostase. 4. Coagulação. 5. Veneno - Purificação. I. Marangoni, Sergio, 1951-. II. Ponce-Soto, Luis Alberto. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título.</p>
-------	--

Informações para Biblioteca Digital

Título em Inglês: Evaluation of pharmacological activities of a serine protease, isolated from total venom of *Bothrops barnetti*

Palavras-chave em Inglês:

Bothrops barnetti

Serineprotease

Hemostasis

Coagulation

Venom - Purification

Área de concentração: Bioquímica

Titulação: Mestre em Biologia Funcional e Molecular

Banca examinadora:

Sergio Marangoni [Orientador]

Claudio Chrysostomo Wemeck

Vera Lúcia Bonfim Tiburcio

Data da defesa: 08-03-2012

Programa de Pós Graduação: Biologia Funcional e Molecular

Campinas, 08 de março de 2012

BANCA EXAMINADORA

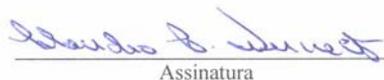
Prof. Dr. Sergio Marangoni


Assinatura

Profa. Dra. Vera Lúcia Bonfim Tiburcio


Assinatura

Prof. Dr. Claudio Chrysostomo Werneck


Assinatura

Profa. Dra. Daniela Carla da Silva Damico

Assinatura

Profa. Dra. Gláucia Coelho de Mello

Assinatura

Dedico este trabalho a meus pais, Sara e Alejandro e a meu filho Kevin, por todo o amor e carinho.

Obrigada pelo apoio

AGRADECIMENTOS

A Deus Todopoderoso, pelo dom da vida, e por permitir meu progresso na área acadêmica.

A Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP)

Ao Prof. Dr. Sergio Marangoni, pela oportunidade de realizar minha pesquisa em seu laboratório.

A minha família no Peru: Mãe, Pãe, irmãos, sobrinhas e avó Laura, que me fortaleceram nos momentos difíceis.

Ao Salomón, por todo o apoio, sugestões e paciência. Obrigada pelo carinho e companhia.

Aos meus amigos do departamento de Bioquímica: Verônica, Miriam, Juliana, Daniela, Caio, Victor, Fábio, Eduardo, Guillermo, Frank, Frey, e todos os que fizeram possível o desenvolvimento de meu trabalho, obrigado pelas sugestões e amizade.

As minhas amigas Vilma e Doris, eu senti seu apoio no momento difícil, muito obrigada.

Aos professores Claudio Werneck e Cristina Vicente pelos ensinamentos e amizade, vocês foram muito importantes na minha formação acadêmica.

Ao Paulinho Baldasso pela amizade e todo o apoio técnico.

A todos os funcionários do Departamento de Bioquímica.

A CAPES pelo apoio financeiro

ÍNDICE

Resumo.....	ix
Abstract.....	xi
1 Introdução.....	1
1.1 Introdução e acidentes ofídicos	1
1.2 Venenos e seus efeitos	2
1.3 Venenos Botrópicos	3
1.4 <i>Bothrops barnetti</i>	5
1.5 Serinoproteases.....	7
1.5.1 Mecanismo catalítico.....	8
1.5.2 Aplicações das SVSPs na clínica médica.....	9
1.5.3 Tipos de serinoprotease.....	11
1.5.3.1 Serinoprotease Trombina-like	11
1.5.4 Inibidores de serinoprotease	13
1.6 Cascata de coagulação sanguínea.....	14
1.7 Hemostase, coagulação sanguínea e fibrinólise.....	16
2 Objetivos.....	20
3 Materiais e métodos.....	21
3.1 Veneno.....	21
3.2 Animais.....	21
3.3 Reagentes.....	21
3.4 Isolamento e purificação de serinoproteases <i>Bothrops barnetti</i>	21
3.4.1 Preparação de amostras e isolamento	21
3.4.2 Purificação em cromatografia HPLC -FR.....	22
3.4.3 Avaliação do grau de pureza.....	22
3.5 Avaliação físico-química	22
3.5.1 Eletroforese em SDS-PAGE.....	22
3.5.2 Análise de composição de amoniácidos	23

3.5.3 Sequenciamento e homologia sequencial	23
3.5.4 Atividade proteolitica sobre o BApNA	24
3.5.5 Estudo Cinético	25
3.5.5.1 Efeito da concentração do substrato	25
3.5.5.2 Efeito da temperatura	25
3.5.5.3 Efeito de pH	26
3.5.5.4 Efeito de inibidores	26
3.5.5.5 Efeito de íons	26
3.6 Avaliação Farmacológica	27
3.6.1 Atividades Fibrinogenolíticas	27
3.6.1.1 Avaliação da concentração de enzima sobre fibrinogênio	27
3.6.1.2 Efeito de íons	27
3.6.1.3 Efeito de inibidores	27
3.6.1.4 Efeito do tempo	28
3.6.1.5 Efeito de temperatura	28
3.6.2 Atividade coagulante (Dose coagulante mínima)	28
3.6.3 Atividade fibrinolítica	28
3.6.4 Agregação plaquetária	29
3.6.5 Atividade edematogênica	29
3.6.6 Atividade hemorrágica	30
3.6.7 Atividade miotóxica	30
4 Resultados	32
4.1 Purificação de serinoprotease	32
4.1.1 Cromatografia de exclusão molecular	32
4.1.2 Purificação da fração Bbt-Ia em HPLC	33
4.1.3 Eletroforese SDS-PAGE	33
4.1.4 Determinação da massa molecular relativa	34
4.1.5 Confirmação de grau de pureza	35
4.2 Avaliação da atividade coagulante	35
4.3 Características físico-químicas	36
4.3.1 Análise de aminoácidos	36

4.3.2	Análise estrutural da Trombina-like TLBbar	37
4.3.3	Atividade proteolítica de TLBbar	38
4.4	Cinética enzimática	39
4.4.1	Efeito da concentração do substrato	39
4.4.2	Determinação de V_{max} e K_m	39
4.4.3	Efeito da temperatura na atividade proteolítica	39
4.4.4	Efeito do pH	40
4.4.5	Efeito dos inibidores	41
4.4.6	Efeito de íons	41
4.5	Avaliações farmacológicas	42
4.5.1	Atividade edematogênica	42
4.5.2	Atividade miotóxica	43
4.5.3	Atividade hemorrágica	44
4.5.4	Agregação plaquetária	44
4.5.5	Atividade coagulante sobre o plasma humano	45
4.5.6	Atividade coagulante sobre fibrinogênio bovino	46
4.5.7	Atividade fibrinogenolítica	46
5	Discussão	49
5.1	Isolamento e purificação de serinoprotease	50
5.2	Avaliações físico-químicas	51
5.3	Avaliações farmacológicas	56
	Conclusões	62
	Referências bibliográficas	63

RESUMO

Os venenos de serpentes contêm uma variedade de proteínas que são estudadas no mundo pela importância biológica e farmacológica. Dentro de sua complexa composição, o veneno apresenta enzimas proteases, como as metaloproteases e serinoproteases que estão envolvidas em distúrbios hemostáticos e coagulantes, interferindo na agregação plaquetária. O presente trabalho teve como objetivo purificar, caracterizar bioquimicamente e avaliar as atividades farmacológicas de uma serinoprotease com atividade coagulante, do veneno de *Bothrops barnetti* nomeada TLBbar. A purificação envolveu dois passos cromatográficos, exclusão molecular em Sephadex G-75 e HPLC de fase reversa em coluna analítica Supelco C8, obtendo-se um alto grau de pureza e homogeneidade, revelado com SDS-PAGE e com $M_r \sim 28,5$ kDa.

TLBbar mostrou homologia sequencial com outras serinoproteases de veneno de serpentes, evidenciado através de espectrometria de massas MS/MS, como a trombina-like denominada Calobin, isolada e caracterizada a partir de *Agkistrodon caliginosus* (Korean Viper), Crotalase (*Crotalus adamanteus*), flavoxobin (*Trimeresurus flavoviridis*) entre outras. Observa-se na homologia que as serinoproteases, com as quais foi comparada a TLBbar, apresentam os aminoácidos conservados do sítio catalítico (His57, Asp102, Ser195), já na sequência da TLBbar demonstra-se a presença do aminoácido histidina na posição 57 da tríada catalítica. Este resultado em conjunto com as atividades enzimáticas e biológicas, confirmam que TLBbar pertence ao grupo de enzimas serinoproteases com atividade trombina-like.

A enzima apresenta sua maior atividade proteolítica a 37°C e em pH 8, sendo essa alterada na presença de íons divalentes por interações eletrostáticas entre enzima e substrato. TLBbar apresenta um comportamento michaeliano segundo os estudos cinéticos realizados com o substrato BApNA, revelando um V_{max} e K_m de 0,42nmol/min e 0,433mM, respectivamente. Em presença de heparina mantém 80% de sua atividade, e apresenta relativa estabilidade frente a SBT-I e agentes quelantes como EDTA e EGTA.

TLBbar tem atividade coagulante sobre fibrinogênio bovino (atividade fibrinogênica), formando um coágulo semi-rígido, pois não ativa o fator XIII da cascata de

coagulação como faz a trombina que resulta na formação de um coágulo consistente. Sua atividade fibrigenolítica foi evidenciada pela liberação dos fibrinopeptídeos A, pela degradação da cadeia A α do fibrinogênio, a qual foi inibida por PMSF e Leupeptina, confirmando sua classificação no grupo das serinoproteases. A eficiência desta atividade fibrigenolítica foi observada entre 30 °C e 40°C durante 2 horas de incubação e alterada em presença de íons divalentes como cálcio, magnésio e bário, ressaltando a maior atividade fibrigenolítica com o cálcio.

A enzima purificada TLBbar foi capaz de agregar plaquetas e em concentração de 2,5 μ g evidenciou comportamento semelhante à trombina. Interessante que TLBbar estimula a agregação plaquetária assim como também retarda dita atividade no tempo quando comparado com o controle (trombina). Este fato é devido a sua mudança de conformação estrutural que corresponde à ativação plaquetária a qual ocorre com mais lentidão (nos primeiros minutos), em comparação a transformação causada pela trombina, tendo como consequência a liberação mais lenta de agentes como ADP e tromboxanos A₂, necessários para alcançar a adesão plaquetária.

A serinoprotease TLBbar não apresenta toxicidade, pois não possui atividades edematogênica, hemorrágica e miotóxica *in vivo*. Por outro lado, TLBbar evidencia capacidade de dissolver o coágulo de fibrina gerado pela trombina após 36 horas de incubação a 37°C, esta atividade foi inibida com PMSF nas mesmas condições, estes dados sugerem a presença de atividade fibrinolítica.

ABSTRACT

The snake venoms contain variety of proteins and are studied in the world for biological and pharmacological importance, within their complex composition of the venom protease enzymes present, as metalloproteases and serineproteases that cause hemostatic disorders, coagulantes and platelet aggregation. The present dissertation aimed to purify, biochemically characterize and evaluate the pharmacological activities of a serine protease with coagulant activity named TLBbar from *Bothrops barnetti*. Its purification involved two chromatographic steps, molecular exclusion in Sephadex G-75 and reversed-phase HPLC with a Supelco C8 analytical column, obtaining high purity and homogeneity revealed by SDS-PAGE with Mr ~ 28.5 kDa.

The enzyme has its highest proteolytic activity at 37 °C and at pH 8, which is altered in the presence of divalent ions by electrostatic interactions between enzyme and substrate. TLBbar presents a Michaelis-Menten behavior according the kinetic studies revealing a K_m and V_{max} of 0.433 mM and 0.42 nmol/min, respectively. TLBbar in the presence of heparin maintains its activity around 80%, although has relative stability compared with SBT-I and chelating agents such as EDTA and EGTA.

TLBbar has coagulant activity on bovine fibrinogen, forming a clot semi-rigid, different the action of thrombin that results in the formation of a clot consistent. Its fibrinolytic activity was evidenced by the release of fibrinopeptides A, by degradation of fibrinogen A α chain, which was inhibited by PMSF and Leupeptin, confirming its classification in the group of serineproteases. The efficiency of this activity was observed between 30 and 40 °C during 2 hours of incubation and changed in the presence of divalents ions such as calcium, magnesium and barium, brings out the greatest fibrinolytic activity with calcium.

The purified enzyme TLBbar was capable of aggregating platelets; 2.5 μ g of concentration evidence similar behavior to thrombin, TLBbar interesting stimulates platelet aggregation as well as delay time in such activity when compared with control (thrombin). We suggest that structural process of platelet activation occurs over a longer period of time

with TLBbar as a result of release of ADP and thromboxane A_2 agents that happen that occur with less speed to achieve platelet adhesion compared with thrombin.

This enzyme not showed edematogenic-activity when compared with the activity caused by *B. Barnetti* snake venom, did not induce hemorrhagic nor myotoxic effect *in vivo*. On the other hand, TLBbar had proteolytic activity similar to thrombin, proven in the fibrigenolytic activity on bovine fibrinogen as measured in the release of fibrinopeptides in times of release similar to the control, the proteolytic activity was also evidenced by the ability to dissolve fibrin clot generated by Thrombin after 36 hours of incubation at 37 °C, the activity was inhibited with PMSF under the same conditions, these data suggest the presence of fibrinolytic activity.

1. INTRODUÇÃO.

1.1 Serpentes e acidentes ofídicos.

Atualmente existem registradas cerca de 200 espécies de serpentes venenosas na terra. Estas são classificadas em quatro grandes famílias: Hydrophidae, Elapidae, Viperidae e Crotalidae (Matsui *et al.*, 2000). Registram-se mundialmente mais de cinco milhões de acidentes por ano com animais peçonhentos, dos quais entre 50 a 75% requerem tratamento para impedir a morte, amputações ou sequelas permanentes. Em particular em países tropicais a magnitude dos acidentes não é bem conhecida, porque ocorrem predominantemente em áreas rurais, muitas vezes afastados do centro de saúde dificultando o registro de acidentes ofídicos (Bustamante *et al.*, 2007).

Os envenenamentos ofídicos constituem um importante problema de saúde pública na América Latina, a grande maioria é causada por serpentes da família Viperidae e uma pequena porcentagem por cobras corais (gênero *Micrurus*, família Elapidae). Por outro lado, também ocorrem acidentes por serpentes da família Colubridae que geralmente não causam envenenamento, embora algumas espécies possam provocar alguns efeitos locais (Warrell, 2004). Na América Latina estima-se 150.000 envenenamentos ofídicos anuais e 5000 mortes por esta causa (Castrillón-Estrada, 2007).

Os acidentes ofídicos no Brasil em sua grande maioria são causados por serpentes de gênero *Bothrops* (média de 85%), seguida dos gêneros *Crotalus* (média de 9%), *Lachesis* (média de 3%), *Micrurus* (média de 0,5%) e não peçonhentos (média de 1,5%). (Barraviera, 1994). Outro país da América Latina que é altamente afetado por envenenamentos ofídicos é o Peru (Zavaleta e Salas, 1996). Este possui rica e diversa herpetofauna que inclui espécies da família Elapidae (gênero *Micrurus*) e Viperidae (gêneros *Bothrops*, *Crotalus*, *Lachesis*). A maior parte dos acidentes ofídicos ocorrem nas zonas silvestres da selva alta e baixa, com maior número de casos na região de Loreto, embora a maior taxa de letalidade para a população ocorre na Amazônia. As zonas rurais da costa norte deste país, também têm frequentes envenenamentos. (Campbell e Lamar, 2004).

Diferentes trabalhos apontam as espécies do gênero *Bothrops* como as principais agressoras (entre 61% a 88.5%), considerando-se que a espécie *B. atrox* ("jergón") é a mais comum em seu gênero para as zonas da selva, *B. barnetti* ("macanche") para a costa norte e *B. pictus* ("víbora da costa") para as costas centro e sul. Acidentes envolvendo o gênero *Lachesis* resultam muito ocasionais (1% a 2.32%), já acidentes

envolvendo o gênero *Crótalus* registrados no departamento de Puno e Madre de Deus, a porcentagem é menor do que 1%, existindo dificuldade na identificação da espécie. Não há registro sobre acidentes com espécies da família Elapidae e Hydrophiidae ("serpentes marinhas") (Bustamante *et al.*, 2007).

Devido à alta taxa de acidentes ofídicos pelo gênero botrópico no Perú, o Centro Nacional de Produção Biológica do Instituto Nacional de Saúde, em Lima, fabrica um soro "antibotrópico" polivalente, usado para tratar envenenamentos por *Bothrops* sp. (Zavaleta e Salas, 1996), esse soro é uma preparação total de imunoglobulinas (IgG) produzida a partir do plasma de cavalos imunizados com os venenos de *B.atrox*, *B.pictus*, *B.barnetti*, *B.brazili* e *Bothrocophias hyoprora* que neutraliza os venenos das espécies mais importantes em *Bothrops* no Perú (Rojas *et al.*, 2005).

1.2 Veneno e seus efeitos

O veneno de serpentes esta constituído de uma mistura complexa de proteínas, nucleotídeos e íons inorgânicos. De acordo com Kini (2003), entre os compostos inorgânicos encontra-se o cálcio, cobre, ferro, potássio, magnésio, manganês, sódio, fósforo, cobalto e zinco. Outros componentes presentes no veneno incluem carboidratos (glicoproteínas), lipídios (fosfolipídios), amins biogênicas, aminoácidos e nucleotídeos.

Entretanto, a maior parte do veneno de serpentes é formada por proteínas, correspondendo a cerca de 90 a 95% do seu peso seco (Tu, 1996). Dessas proteínas, algumas apresentam funções enzimáticas, tais como hidrolases (PLA₂), fosfodiesterases, colinesterases, aminotransferases, L-amino oxidases, catalases, ATPases, hialuronidases, NAD nucleosidases e L-glicosaminidases e proteases (Matsui *et al.*, 2000). Os principais exemplos de proteases presentes nos venenos são as metaloproteases e as serinoproteases. Esta combinação de peptídios e proteínas faz com que o veneno apresente diferentes propriedades tóxicas que podem causar manifestações locais e sistêmicas, como efeitos miotóxicos, hemorrágicos, nefrotóxicos necrotizantes e hemostáticos. As complicações hemostáticas do envenenamento ofídico, emcapsulam a ativação do fator X e pro-trombina da cascata de coagulação, levando à produção de trombina e desencadeando um quadro clínico de coagulação intravascular disseminada, que se associa a trombocitopenia e ao aumento dos produtos da degradação do fibrinogênio (Otero, 2001).

O conteúdo e a potência do veneno podem variar devido a diferentes fatores como idade, clima, ou a última ingestão (Agudelo, 2005). Há relatos de que os venenos

de serpentes recém-nascidas são mais hemorrágicas, edematizantes e letais que os venenos de serpentes adultas, enquanto estes são mais hemolíticos e mionecróticos (Gutiérrez, 2002; Stocker, 1990).

As alterações locais induzidas por venenos de viperídeos constituem um problema importante por várias razões:

- As alterações são desencadeadas rapidamente após a inoculação do veneno, o que dificulta a neutralização, se o antiveneno for administrado várias horas depois do acidente.
- Afetam drasticamente o tecido muscular, os vasos sanguíneos e a pele, induzindo lesões que, frequentemente, deixam sequelas.
- Frequentemente se complicam com infecções, o que dificulta ainda mais o tratamento deste quadro.
- Nos casos graves pode se desencadear síndrome compartimental, exigindo a cirurgia de retirada do tecido já necrosado (fasciotomia) o que complica o tratamento e prolonga a permanência hospitalar.

A experiência clínica mostra que estes efeitos locais são difíceis de serem neutralizados pelos soros antiofídicos conhecidos e por outros recursos terapêuticos complementares. (Gutiérrez e Lomonte, 2003).

Todas estas alterações são ocasionadas pelo veneno, devido à mistura complexa de toxinas que a serpente produz e armazena em suas glândulas, nas quais são expressas entre 50 – 60 componentes de proteínas (Matsui *et al.*, 2000) com diferentes funções, estes componentes ao serem inoculados ocasionam efeitos proteolíticos, edematizantes, neurotóxicos hemorrágicos ou fibrinogenolíticos; estas atividades farmacológicas serão diferentes segundo a porcentagem de componentes e atividades enzimáticas que o veneno possua.

1.3 Veneno Botrópico.

O veneno da espécie Botrópica apresenta três atividades principais:

a) *Proteolítica ou Necrosante*: A necrose muscular somada a outras alterações locais do tipo vascular são causas de sequelas como a perda de tecido e disfunção. A mionecrose induzida por envenenamentos têm dois mecanismos: O primeiro é de ação direta de toxinas, denominadas miotoxinas, sobre as células musculares, originando

lessão celular irreversível. O segundo mecanismo é a isquemia que se desencadeia no tecido muscular como consequência do sangramento, compressão tissular e outras alterações inflamatórias, que também contribuem para a necrose (Lomonte *et al.*, 2003)

A atividade proteolítica e necrosante determinam o edema inflamatório na região da picada. Uma das consequências do edema é a compressão tissular que pode agravar as condições isquêmicas do tecido exposto ao veneno (Garfin, 1985). A perda do fluido intravascular causada pelo edema, quando este é de magnitude considerável, pode acentuar o efeito hipovolêmico e hipotensivo dos venenos que, por sua vez, pode desencadear choque cardiovascular. A atividade edematogênica é muito potente, evidenciada nos casos clínicos e nos modelos experimentais. Nesses últimos, as doses de veneno requeridas para induzir um efeito significativo variam de microgramas a décimos de microgramas (Teixeira *et al.*, 2003). O edema induzido pelos venenos se caracteriza por ser de aparecimento imediato, podendo atingir seu pico em intervalo de 15 a 30 minutos. Nos estudos experimentais 0,9 µg de veneno de *Bothrops asper* no modelo de coxim plantar (camundongos) é capaz de induzir edema imediato e transitório na extremidade injetada. (Lomonte *et al.*, 1993).

Os componentes potencialmente responsáveis pelo edema nos venenos são de natureza bioquímica muito variada; desde aminas biogênicas pre-formadas do tipo histamina, até pequenos peptídeos, ou proteínas como as fosfolipases A₂, esterases, proteases, enzimas liberadoras de cinina e lectinas (Landucci, 2000).

Uma característica do envenenamento botrópico é a intensa dor local. O efeito hiperalgésico tem sido estudado experimentalmente em ratos com veneno de *Bothrops jararaca* (Teixeira *et al.*, 2003), Estes estudos demonstram que este efeito é mediado, principalmente, por prostaglandinas, leucotrienos e fator ativador de plaquetas (PAF).

b) *Coagulante*. Os venenos que possuem a capacidade de ativar fatores da coagulação sangüínea e de formar um coágulo visível *in vitro* são caracterizados como coagulantes. Genericamente, os componentes que ativam os fatores da cascata de coagulação podem ser classificados como ativadores de tipo pró-coagulantes ou como ativadores do tipo trombina-like (semelhante à trombina) (Castro *et al.*, 2001).

Entendem-se como ativadores do tipo pró-coagulantes os componentes do veneno que clivam o fator X ou fator II (protrombina) da cascata de coagulação, gerando trombina, que por sua vez hidrolisa o fibrinogênio em fibrina. No entanto, os ativadores do tipo trombina-like são aqueles que clivam diretamente o fibrinogênio em fibrina, sem a necessidade de geração de trombina (Braud *et al.*, 2000).

A cascata da coagulação pode ser ativada pelos venenos das seguintes formas: (1) promovendo a conversão do fator X em fator Xa; (2) conversão de prótrombina em trombina, na ausência de fator V (ativação direta); (3) conversão de prótrombina em trombina, na presença de fator V (ativação indireta) e (4) conversão de fibrinogênio em fibrina (atividade trombina like) (Amaral *et al.*, 1980; Ouyang *et al.*, 1987).

A coagulopatia de consumo ocorre quando o fibrinogênio é clivado em fibrina pela gradativa 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 IRA estão ainda o sequestro de líquidos para o local da picada no acidente botrópico e laquétrico, substâncias vasoativas, vômitos, desequilíbrio hidroeletrólítico e nefrotoxicidade direta (Cardoso *et al.*, 2003). As atividades fibrinogenolítica, fibrinolítica e agregação plaquetária participam da fisiopatologia dos envenenamentos.

c) *Hemorrágica*. Esse efeito é causado por um grupo de toxinas, denominadas hemorraginas, que são enzimas proteolíticas as quais degradam as proteínas da membrana basal de vênulas e capilares, existindo assim a separação da célula endotelial da lamina basal que a rodeia. A diminuição da espessura das células endoteliais traz como consequência rupturas ou gaps através dos quais ocorre a hemorragia (Moreira, 1994).

1.4 *Bothrops barnetti*.

Bothrops barnetti (Parke) encontra-se no deserto costero do Peru, entre 0 e 1000 metros sobre o nível do mar. Esta é uma espécie endêmica do Peru que se encontra nas regiões de La Libertad, Lambayeque e Piura (Campbell e Lamar, 2004).. *Bothrops barnetti* apresenta triângulos pretos e brancos, na superfície corporal, geralmente cresce até 120 cm (Figura 1), as fêmeas são muito menores e mais finas (Carrillo de Espinoza *et al.*, 1995).

Os estudos da caracterização de toxinas da espécie *Bothrops barnetti* são limitados. Os dados encontrados são de estudos comparativos a respeito de atividades tóxicas de vários venenos botrópicos do Peru os quais se mostram na Tabela 1.

Tabela 1. Atividades toxicológicas de venenos botrópicos do Peru (Rojas *et al.*, 2005)

Veneno	Letalidade ^a	Hemorrágica ^b	Edema ^c	Miotoxicidade ^d	Coagulante ^e	Desfibrinante ^f
<i>B. atrox</i>	6.04 ^g	6.45±0.43 ^g	2.95±1.11 ^g	56.3±9.93 ^g	3.65±0.02 ^g	2.5 ^g
<i>B. brazili</i>	5.51	3.71±0.41	1.18±0.14	13.5±0.54	7.39±0.06	ND
<i>B. pictus</i>	2.78	1.06±0.15	0.52±0.13	15.4±1.49	46.6±0.40	10
<i>B. barnetti</i>	2.66	0.75±0.26	1.13±0.05	40.4±1.55	21.5±0.45	2.5

^aLetalidade expressa como dose letal media (LD50), definida como a dose de veneno que mata o 50% de camundongos injetados por via intraperitoneal (μg de veneno / peso corporal)

^bAtividade hemorrágica expressa em termos de dose hemorrágica mínima (MHD), definida como a quantidade de veneno (μg) que induz um halo hemorrágico de 10mm de diâmetro 2 horas após injeção.

^cAtividade edematogênica expressa em termos de dose edematogênica mínima (MED), definida como a quantidade de veneno (μg) que induz 30% de aumento do volume da pata injetada com veneno.

^dAtividade miotóxica expressa em termos de dose miotóxica mínima (MMD), definida como a quantidade de veneno (μg) que induz incremento da atividade de creatina quinase (CK) plasmático 3 horas após injeção intramuscular correspondente a 4 vezes a atividade CK de camundongos que receberam PBS.

^eAtividade coagulante expressa em termos de dose coagulante mínima (MCD), definida como a quantidade de veneno (μg) que induz coagulação do plasma em 60 s.

^fAtividade desfibrinante expressa em termos de dose desfibrinante mínima (MDD), definida como a quantidade de veneno (μg) que induz incoagulabilidade sanguínea 1 h após injeção em camundongos. ND: não foi observada desfibrinação.

^gResultados são apresentados como a média \pm S.D. ($n = 4$).

Os resultados mostraram que o veneno de *Bothrops barnetti* apresenta uma dose hemorrágica mínima (DHM) de $0.75 \pm 0,26$; *B. brazili* $3,71 \pm 0,41$ e *B. Atrox* de $6.45 \pm 0,43$. Estudos das atividades miotóxica e edematogênica evidenciaram valores menores para *Bothrops barnetti* comparados a *B. brazili*, e *B. atrox*. No entanto, para a atividade dose coagulante mínima (DCM), o veneno de *B barnetti* apresenta valores de $21,5 \pm 0,45$; *B brazili* com $7,39 \pm 0,06$ e *B atrox* $3,65 \pm 0,02$, evidenciando que o veneno de *B. barnetti* afeta o sistema hemostático com maior intensidade do que os outros venenos estudados. A maior letalidade para este grupo de venenos botrópicos expressada como dose letal media (LD₅₀) pertence a *B. barnetti* ($2,66\mu\text{g}$) o veneno de *B. brazili* ($5,51\mu\text{g}$) e *B. Atrox* com $6,04\mu\text{g}$ (Rojas *et al.*, 2005)

A alta atividade coagulante do veneno de *B. barnetti* sugere a presença de serinoproteases com atividade trombina-like. Até o presente momento não se tem nenhum estudo com serinoproteases deste veneno, o que motiva o desenvolvimento deste projeto.



Figura 1. *Bothrops barnetti*. Adaptado de reptile database

1.5 Serinoproteases.

As serinoproteases são enzimas proteolíticas, que catalisam a hidrólise das ligações peptídicas, são denominadas assim por possuírem um mecanismo catalítico comum que envolve um resíduo de serina particularmente reativo em seu sítio catalítico.

São enzimas muito frequentes e formam a maior superfamília das peptidases, sendo encontradas desde vírus e bactérias até em eucariotos (Rawlings e Barret, 1993). As serinoproteases possuem uma ampla gama de atividades incluindo exopeptidases, endopeptidases, oligopeptidases e ômega-peptidases. Mais de 20 famílias (denominadas de S1 a S66) de serinoproteases foram identificadas até o momento e são agrupadas segundo sua similaridade estrutural e evidências funcionais, serinoproteases de veneno de serpentes são classificadas no clan A na família S1 (Rawlings e Barrett 1995).

As serinoproteases são muito abundantes nos venenos de serpentes, principalmente na família Viperidae onde constituem aproximadamente 20% do total das proteínas contidas no veneno (Kini, 2003). Estas enzimas isoladas não são letais, mas contribuem para o efeito tóxico quando associadas com outras proteínas do veneno. Serinoprotease de veneno de serpentes (SVSPs) geralmente apresentam 12 resíduos de cisteínas e formam 6 pontes dissulfeto, apresentando uma massa molecular entre 25 – 35 kDa (Kini, 2005), na sua estrutura possuem resíduos de aminoácidos em posições específicas como propriedade estrutural, correspondendo à tríada catalítica Ser195 (serina na posição 195), His57 (histidina na posição 57) e Asp102 (ácido aspártico na posição 102) que é altamente conservada. A figura (2) mostra a estrutura de uma serinoprotease nomeada Saxthrombin.

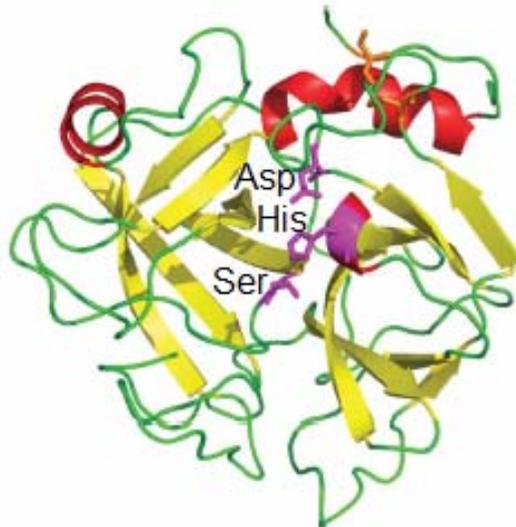


Figura 2. Representação ribbon da estrutura da saxthrombin, uma serino protease trombina-like isolada de *Gloydius saxatilis*, destacando a posição dos resíduos de aminoácidos que fazem parte da tríada catalítica (His, Asp e Ser). Adaptado de Huang *et al.*, 2011.

Os diferentes estudos sobre as SVSPs evidenciam que este arranjo especial de aminoácidos é responsável por afetar várias funções fisiológicas como: ativar ou inativar fatores de coagulação sanguínea, interferir na agregação plaquetária e afetar o sistema fibrinolítico (fibrinólise) (Braud, 2005).

1.5.1 Mecanismo catalítico

Geralmente as SVSPs se enovelam de forma semelhante à quimiotripsina, enzima digestiva que apresenta dois domínios assimétricos a folhas beta, separadas pela tríada catalítica. O mecanismo catalítico destas proteases mostrado na figura (3) inclui um ataque nucleofílico da Ser 195 ao grupo carbonila da ligação peptídica do substrato, juntamente com a reatividade da histidina 57 formando um intermediário tetraédrico, complexo acil enzima. O ataque nucleofílico envolve a transferência de um próton do anel imidazólico da His 57, formando um íon imidazol. Esse processo é auxiliado pelo efeito da polarização do íon carboxilato não-solvatado da Asp 102, que forma uma ponte de hidrogênio com a His 57. O complexo acil enzima posteriormente se decompõe pela força impulsora da doação do próton do nitrogênio (posição três) da His 57 (catalise ácida) eliminando um grupo (NH₂) amino (nova porção N-terminal da cadeia polipeptídica clivada) o qual é substituído estruturalmente por uma molécula de água que participa da reação seguinte da desacilação, liberando o produto carboxilado resultante (a nova porção C-terminal da cadeia polipeptídica clivada) (Voet *et al.*, 2002)

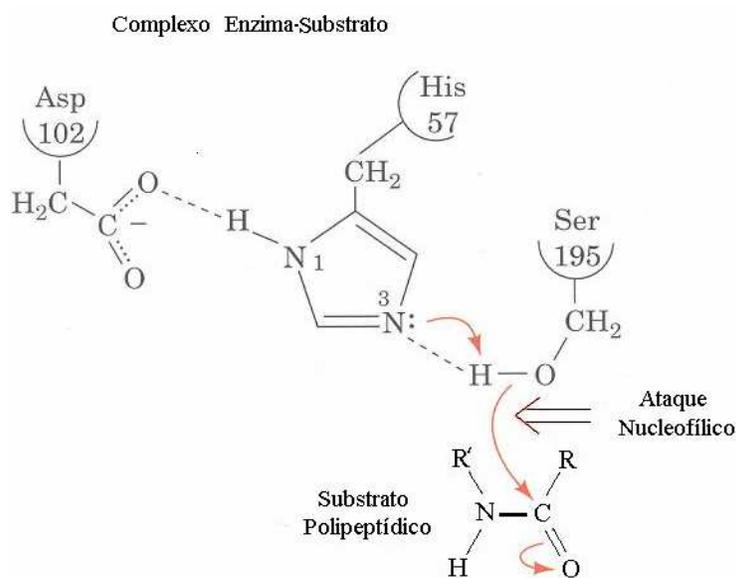


Figura 3. Mecanismo catalítico da serinoprotease. Adaptado de Voet *et al.*, 2002

1.5.2 Aplicações da serinoproteases de veneno de serpentes na clínica medica.

O homem, com o desenvolvimento da ciência, e com estudos químicos, bioquímicos, farmacológicos, fisiológicos e toxicológicos dos compostos como proteínas, enzimas e peptídeos realiza estudos cada vez mais específicos, na busca de toxinas animais, as quais possam agir de forma benéfica ao homem.

Para exemplificar podem-se mencionar medicamentos já comercializados que surgiram de substâncias isoladas de toxinas animais, como é o caso do veneno de *Bothrops jararaca*, por Rocha e Silva no ano 1949, que permitiu o descobrimento do peptídeo, que serviu de modelo biológico para a molécula sintética, que hoje é o captopril, utilizado no tratamento da hipertensão arterial, insuficiência cardíaca congestiva e da doença arterial coronária (Ferreira, 2000).

Na atualidade, é grande a incidência de doenças arteriais, entre elas a hipertensão e hiperlipidemia, que resultam na deposição lipídica que leva a hiperplasia da musculatura lisa e levando à formação, por exemplo, do arteroma coronário. Com o passar do tempo, as placas se tornam instáveis e se rompem, formando êmbolos que ativam a via extrínseca da cascata de coagulação, iniciando uma série de processos que levarão a oclusão trombótica das artérias coronárias (Ariëns *et al.*, 2002).

Agentes trombolíticos são usados no tratamento terapêutico de trombose, destacando os ativadores de plasminogênio como ativador do plasminogênio tecidual (tPA), uroquinas e estreptoquinase. Apesar do seu uso difundido, todos estes agentes

tem efeitos secundários indesejáveis e possuem custos relativamente elevados. A busca de outros agentes trombolíticos torna-se importante sob os aspectos terapêuticos e econômicos. Desta forma as moléculas antitrombóticas encontradas em veneno de serpentes estão sendo purificadas e caracterizadas devido à alta eficácia que apresentam no processo de dissolução de trombos (Xiuxia *et al.*, 2001; Bortoleto *et al.*, 2002). O interesse comercial na atualidade é de estudar modelos perfeiçoados pela natureza para desenvolver novos medicamentos para uso clínico, para o tratamento de infarto do miocárdio, trombozes em veias profundas, hematomas ou embolia pulmonar (Markland,1988).

Neste contexto o isolamento das serinoproteases provenientes de veneno de serpentes trombina-like é de grande interesse para a comunidade científica, devido ao desenvolvimento de reagentes para diagnósticos, tratamento de alterações hemostáticas e como agente desfibrinogenante (Marsh; Williams, 2005). Grande parte das enzimas trombina-like já estudadas, são dos venenos de serpentes do gênero *Agkistrodon*, *Trimeresurus*, *Crotalus* e *Bothrops*.

As enzimas trombina-like denominadas de venombina A comercialmente disponíveis são: ancrod (Arvin da *Agkistrodon rhodostoma*) eficaz em limitar o volume do infarto; batroxobin (Defibrase da *Bothrops moojeni*), utilizada para remover o fibrinogênio do plasma, crotalase (de *Crotalus atrox*). Outras serinoproteases provenientes de veneno de serpentes que atuam sobre o fibrinogênio são análogas da giroxina (*Lachesis muta muta*), acutobin (*Agkistrodon acutus*), bothrombin (*Bothrops jararaca*).

Nos últimos anos foram desenvolvidas pesquisas sobre o desenvolvimento de uma “cola biológica” a partir de serinoproteases que fornecem ótimos resultados (Thomazi-Santos 2001), se refere à utilização de uma fração trombina-like isolada do veneno de *Crotalus durissus terrificus* em conjunto com uma fração de fibrinogênio animal, com o intuito de produzir a "cola de fibrina" que seria utilizada como alternativa à sutura tradicional, sendo essa capaz de reduzir a morbidade no pós-operatório e melhorar a difícil cicatrização em feridas como em câncer de pele, cirurgias cardíacas, fistulas estomacais e intestinais, entre outros e que apresenta melhores efeitos cosméticos evitando a formação de quelóides (Miyagui, 2007).

Estudos com serinoproteases provenientes de veneno de serpentes demonstraram que além de ser uma trombina-like, apresentam diversas outras atividades específicas, tais como ativadores de plasminogênio: LV-PA (*Lachesis muta muta*), TSV-PA

(*Trimeresurus stejnegeri*), PA-BJ (*Bothrops jararaca*); ativadores de proteína C: como a toxina ativadora de proteína C de *Agkistrodon contortrix contortrix* (ACC-C), uma enzima trombina-like comercialmente vendida (Protac da *Agkistrodon contortrix*), anticoagulantes utilizados para inibir a oclusão das artérias em pacientes que possuem válvulas artificiais ou que sofreram cirurgias cardíacas (Koh *et al.*, 2006).

1.5.3 Tipos de Serinoproteases.

As serinoproteases podem se agrupar de acordo com suas funções: As que têm atividades fibrinolíticas e fibrigênicas, independentemente se exercem ou não as duas funções, são nomeadas de proteases trombina-like. As serinoproteases que liberam bradicinina a partir de cininogênios, como a calicreína de mamíferos (ou kininogenase) são chamadas de proteases “calicreína-like” (Bajarnason, 1983). Além desses dois tipos tem sido descritas serinoproteases com atividade única, como ativação do fator V, proteína C, plasminogênio ou plaquetas (Matsui *et al.*, 2000).

1.5.3.1 Serinoproteases trombina-like.

Alfa trombina de mamíferos, uma forma ativada de prótrombina, é uma serinoprotease multifuncional. Os estudos recentes sobre estrutura e função por pesquisadores revelam que a trombina têm papéis importantes na hemostasia e em tromboes em mamíferos (Matsui *et al.*, 2000) devendo-se à conversão de fibrinogênio para coágulo de fibrina envolvido no cross linked por ativação do fator XIII liberando fibrinopeptídeos A e B das cadeias alfa e beta do fibrinogênio respectivamente, este processo também é conhecido como fibrinogenase.

Segundo Kornalik (1990) as enzimas trombina-like de veneno de serpentes podem ser agrupadas em três categorias (1) enzimas trombina-like AB composto de enzimas que hidrolisam o fibrinogênio liberando fibrinopeptídeos A e B. (2) Enzimas trombina-like A, caracterizada por clivar só a cadeia alfa (α) do fibrinogênio, (3) enzimas trombina-like B, que libera as cadeias beta (β) de fibrinogênio após a hidrólise.

A liberação de fibrinopeptídeos A ou B do fibrinogênio formam um coágulo semi-rígido composto por “polímeros curtos” que são rapidamente dispersos por não possuir longo entrecruzamento ativado por o fator XIII, resultando na interrupção do sistema de coagulação sanguínea de vítimas. Apesar dos diferentes mecanismos de interação sobre o fibrinogênio, nenhuma trombina-like de veneno de serpente mostra

todas as múltiplas funções da trombina, embora alguns deles também ativem o fator VIII e/ou XIII, o agregam as plaquetas como faz a trombina. (Matsui *et al.*, 2000).

A figura (4) mostra esquematicamente a atuação tanto da trombina como a trombina-like na liberação dos fibrinopeptídeos envolvendo o fator XIII.

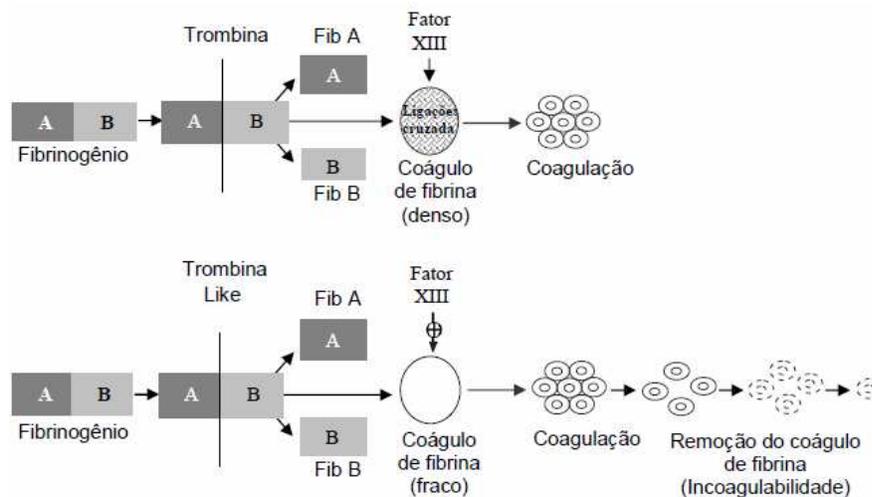


Figura 4. Mecanismo de ação da trombina e trombina-like liberando fibrinopeptídeos. Fib A: Fibrinopeptídeos A. Fib B: Fibrinopeptídeos B. (Adaptado Costa Oliveira J. 2010).

A tabela abaixo apresenta as principais serinoproteases, trombina-like isoladas de veneno de serpentes que foram caracterizadas quimicamente.

Nome comum (serpentes fonte)	Substrato (s)	Ref.
Trombina-like		
Ancrod (<i>Calloselasma rhodostoma</i>)	Fibrinogênio (A,[B]) ^a , fator XIII	Burkhart <i>et al.</i> , 1992
Batroxobin (<i>Bothrops atrox moojeni</i>)	Fibrinogênio (A,[B]), fator XIII?	Itoh <i>et al.</i> , 1987
Bilineobin (<i>A. binlineatus</i>)	Fibrinogênio (B,[A])	Nikai <i>et al.</i> , 1995
Bothrombin (<i>B. jararaca</i>)	Fibrinogênio (A), fator VIII?	Nishida <i>et al.</i> , 1994
Calobin (<i>Crotalus atrox</i>)	Fibrinogênio (A,[B])	Halton, 1973
Crotalase (<i>C. adamanteus</i>)	Fibrinogênio (A,[B])	Henschen-Edman <i>et al.</i> , 1989
Flavoxobin (<i>Trimeresurus flavoviridis</i>)	Fibrinogênio (A)	Shieh <i>et al.</i> , 1988
Giroxin analogue (<i>Lachesis muta muta</i>)	Fibrinogênio (A,[B])	Magalhaes <i>et al.</i> , 1993
TM-VIG (<i>T. mucrosquamatus</i>)	Fibrinogênio (B)	Hung <i>et al.</i> , 1994

Tabela 2. Serinoproteases trombina-like de veneno de serpentes caracterizadas quimicamente.
^aFibrinopeptídeos liberados estão entre parênteses. Os que estão em colchete são liberados mais lentamente que os outros (Adaptado de Matsui *et al.*, 2000).

1.5.4. Inibição das serinoproteases

As serinoproteases listadas na tabela (2) apresentam os resíduos de His, Asp e Ser nas posições correspondentes à sua tríada catalítica, as atividades enzimáticas destas moléculas podem ser inibidas por substâncias comuns como o fenilmetilsulfonilfluoride (PMSF) e diisopropil fluorofosfato (DFP) afetando o sitio catalítico, esta inibição confirma a presença da serinoprotease. O PMSF contém um átomo de flúor o qual reage com o grupo hidroxila do resíduo da serina, deslocando o hidrogênio para posteriormente formar ácido fluorídrico em uma reação irreversível, como se mostra na Figura (5A), deste modo o sitio catalítico é alterado da enzima ocorrendo a inativação. A leupeptina é um inibidor que compete com o substrato pelo sítio ativo da enzima, sendo deslocado quando o substrato está em excesso revertendo, portanto, sua atividade inibitória (Sant'Ana, 2008). Em sua estrutura apresenta um grupamento aldeído e vários pares de elétrons livres provenientes dos seis átomos de nitrogênio que formam parte de sua estrutura (Figura 5B).

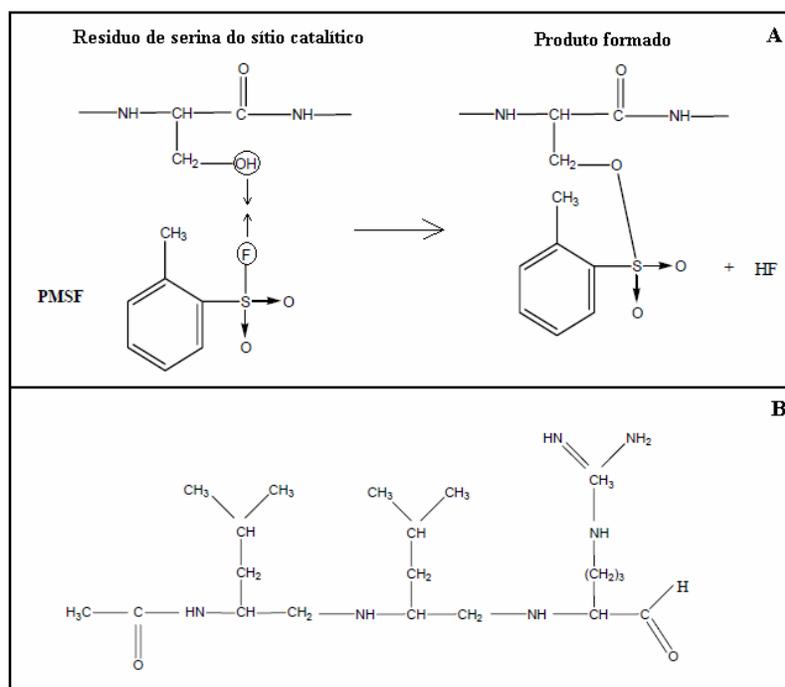


Figura 5. (A) Reação entre Serina e PMSF. **(B)** Molécula estrutural de Leupeptina, inibidor de serinoprotease. Adaptado de (Sant'Ana, 2008)

Exposto anteriormente, as serinoproteases participam em diferentes processos fisiológicos, estas enzimas interferem na cascata de coagulação, muitas vezes não especificamente através da degradação proteolítica, mas seletivamente através da ativação ou inativação de fatores da coagulação envolvidos na agregação plaquetária, coagulação e fibrinólise; para o melhor entendimento da atuação da trombina-like é de interesse a compreensão do funcionamento da cascata de coagulação e dos sistemas hemostáticos e fibrinolíticos.

1.6. Cascata de Coagulação sanguínea.

A cascata de coagulação é considerada uma ativação sequencial de zimogênios, ou seja, cada fator é um substrato para a enzima anterior e ativador da pro-enzima subsequente. A maioria das etapas de ativação da coagulação está ligada à proteólise limitada e em sua grande maioria, os fatores da coagulação são serinoproteases, com exceção dos fatores VIIa e XIIIa (Boon, 1993). Esta etapa é dividida em duas vias distintas, a intrínseca e a extrínseca, que são inter-relacionadas e culmina em uma via comum, a formação de fibrina. (figura 6).

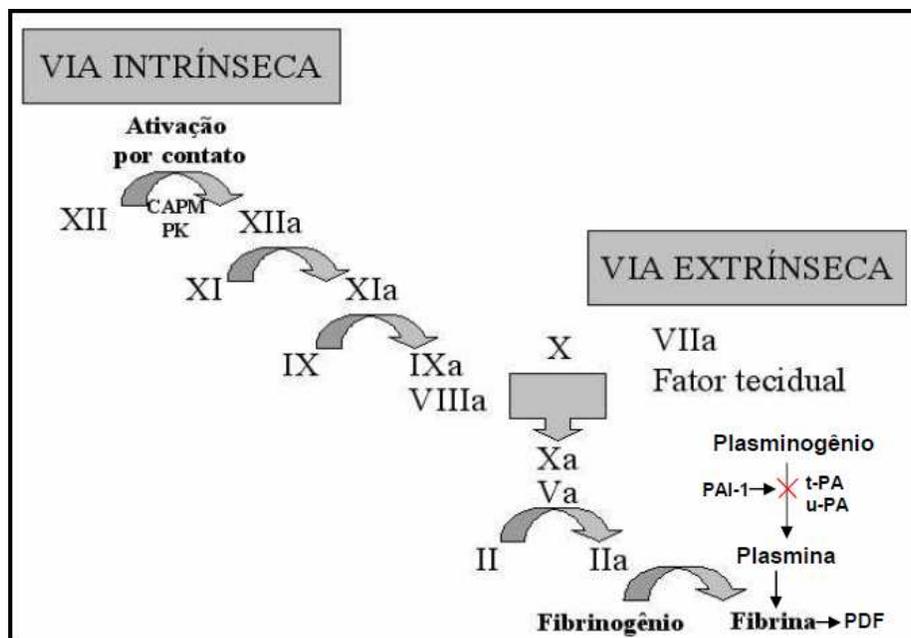


Figura 6. Inter-relações entre as vias intrínsecas e extrínsecas da cascata de coagulação sanguínea e o sistema fibrinolítico. CAMP: cininogênio de alto peso molecular. PK: pré-caliceína. PDF: produtos da degradação de fibrina. Adaptado de (Franco, 2001)

A cascata da coagulação pode ser ativada pelos venenos de serpentes das seguintes formas:

(1) promovendo a conversão do fator X em fator Xa; (2) conversão de prótrombina em trombina, na ausência de fator V (ativação direta); (3) conversão de prótrombina em trombina, na presença de fator V (ativação indireta) e (4) conversão de fibrinogênio em fibrina (atividade trombina-like) (Amaral *et al.*, 1980; Ouyang *et al.*, 1987). A coagulopatia de consumo ocorre quando o fibrinogênio é clivado em fibrina pela gradativa absorção do veneno pela circulação sanguínea. A fibrina formada prontamente ativa o sistema fibrinolítico que promove a degradação da mesma.

A formação do coágulo de fibrina envolve complexas interações entre proteases plasmáticas e seus cofatores. O início da coagulação se faz mediante ligações do fator VIIa ao fator tecidual (FT) ocorrendo ativação dos fatores IX e X. O complexo fator IXa/VIIIa ativa o fator X com eficiência ainda maior, e o fator Xa forma complexo com o fator Va, convertendo o fator II (protrombina) em fator IIa (trombina), que por proteólise converte o fibrinogênio solúvel em fibrina insolúvel (Franco, 2011). O Fator tecidual (FT) é uma glicoproteína de membrana de 45000 Da, que funciona como receptor para o fator VII da coagulação. O FT não é normalmente expresso em células em contato direto com o sangue tais como células endoteliais e leucócitos (Drake *et al.*, 1989).

Quando completada a hemostasia, o vaso deve ser restabelecido para que o fluxo sanguíneo volte a seu estado normal. A *etapa terciária* da hemostasia é o que se entende por *sistema fibrinolítico* ou *fibrinólise* (Figura 7), uma resposta fisiológica à deposição de fibrina. O sistema fibrinolítico participa não somente da remoção do coágulo vascular, mas também de muitos outros fenômenos biológicos, como a reparação dos tecidos, função macrofágica, ovulação e implantação do embrião (Verstraete e Vermylen, 1989). Esse sistema compreende três componentes principais: O plasminogênio, ativadores de plasminogênio tecidual (t-PA), uroquinase e estreptoquinase que ativam ao plasminogênio transformando-o em plasmina, e os inibidores do sistema fibrinolítico, os quais rapidamente neutralizam a plasmina ou interferem na ativação do plasminogênio. A fibrinólise permite que qualquer coágulo que se forme na circulação seja desfeito, evitando as complicações tromboembolíticas.

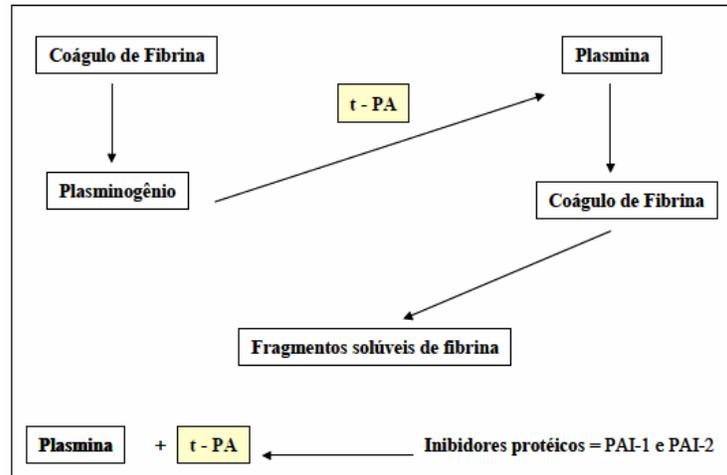


Figura 7. Representação esquemática do sistema fibrinolítico e seus inibidores. t-PA: Ativador de plasminogênio tecidual. PAI-1: Inibidor do ativador de plasminogênio tipo 1. PAI-2: Inibidor do ativador de plasminogênio tipo 2. Adaptado de (Narayanan; Hamasaki, 1998).

A trombina está também envolvida na estimulação de coagulação sanguínea por ativação dos fatores V, VII e XIII. Este complexo com Trombomodulin em células endoteliais ativa a proteína C (proteína anticoagulante circulante no sangue como zimogênio) para inibir a coagulação, a proteína C ativada degrada o fator V/Va e VIII/VIIIa liberando o ativador plasminogênio, conseqüentemente estimula a fibrinólise através de sua interação como inibidor do sistema fibrinolítico. Além disso, este processo encapsula a ativação da agregação plaquetária. (Fenton, 1988; Matsui, 2000).

1.7 Hemostasia, coagulação sanguínea, e fibrinólise.

Hemostasia é um processo pelo qual o organismo procura controlar a perda sanguínea através de um vaso lesado, evitando que ela se prolongue por um tempo maior. São vários os fatores que permitem a circulação do sangue em seu estado fluido e impedem a formação de coágulos ou trombos, sendo a integridade do endotélio vascular o elemento essencial que permite a fluidez do sangue. Existem também, substâncias que são secretadas pelas células que participam do processo hemostático, como mediadores químicos.

Em condições normais, os fatores da coagulação circulam sob a forma não-ativada (zimogênios) juntamente com as plaquetas, as quais só exercem função hemostática ou coagulante quando as condições são alteradas.

Três principais componentes são envolvidos na hemostasia: Parede do vaso, trombócitos ou plaquetas e o sistema de coagulação plasmático (Kornalik, 1985). Esta ação é coordenada por uma série de sinais químicos que são mutuamente dependentes. O sistema hemostático pode ser dividido em três fases. A primeira, denominada *hemostasia primária*, sucede após a lesão do vaso sanguíneo, onde ocorre uma vaso constrição com a finalidade de diminuir o fluxo local e de permitir maior contato entre as plaquetas circulantes e o ponto onde o endotélio foi danificado. Esse simples contato é suficiente para a ativação das plaquetas que ficam aderidas ao local lesado em um processo chamado adesão plaquetária, o primeiro mecanismo de defesa do organismo contra a perda sanguínea. (Verstraete; Vermeylen, 1989).

A parede do vaso sanguíneo tem uma dupla função na hemóstase; a contração neurogênica após uma lesão que permite a formação de um tampão plaquetário primitivo, e a ativação do sistema de coagulação plasmático. As injúrias ou as células endoteliais irritadas liberam sinais químicos que ativam reversivelmente os trombócitos e o sistema de coagulação. O primeiro impulso para a adesão é uma mudança de carga na superfície do endotélio de negativo para positivo, os trombócitos reagem em frações de segundos com adesão reversível, a mudança de carga aumenta o área superficial e facilita a aderência para a superfície ativada. Após a adesão celular ocorre ativação de enzimas de membrana e conseqüentemente a liberação de substâncias farmacologicamente ativas como mensageiros dentro do plasma.

Os trombócitos são células pequenas anucleadas derivadas dos megacariócitos, os quais são produzidos pela estimulação da medula óssea pelo hormônio trombopoetina, os trombócitos na forma inativa tem uma estrutura de disco achatado com um diâmetro de 2 - 4 μ m e uma espessura de 1-2 μ m nessa forma o trombócito é incapaz de aderir à parede do vaso, uma vez ativadas mudam de conformação criando um arranjo de canais retorcidos na superfície da membrana que penetram no citoplasma permitindo um contato com o exterior (surface connected canalicular system). Os microtúbulos são os responsáveis pela mudança estrutural da plaqueta e a respectiva formação de pseudópodos durante a ativação do processo, mediado também pela secreção de cálcio, ADP e outras substâncias (Figura 8).

A transmissão de sinais da superfície para o interior da plaqueta são mediados pelas prostaglandinas, as quais são sintetizadas pela degradação de fosfolipídios de

membrana via formação de ácido araquidônico (Kornalik, 1985). O mediador resultante do ativador de plaquetas é o tromboxano A_2 que possui um forte efeito pro agregante baseado na ativação do cálcio.

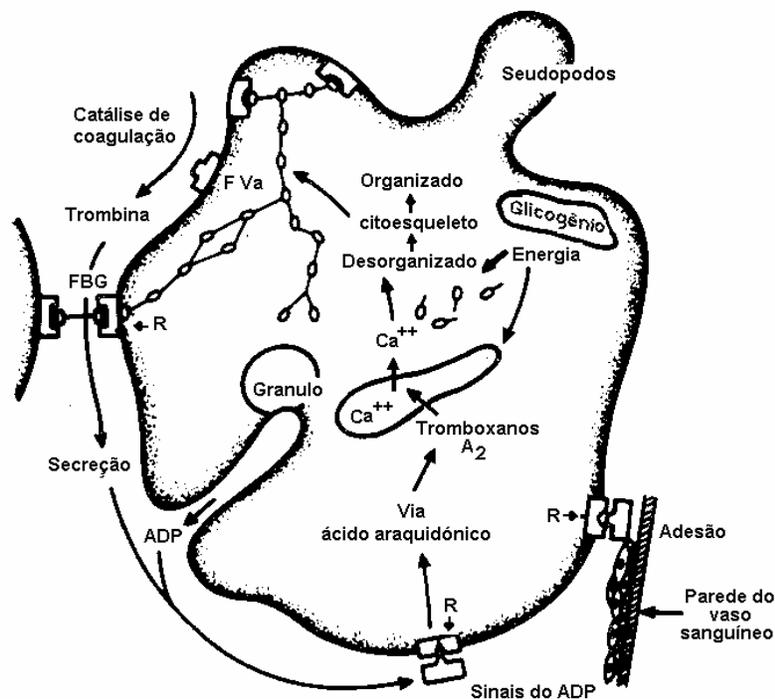


Figura 8. Esquema do processo da ativação das plaquetas após uma lesão na parede vascular. ADP (Adenosin difosfato), FVa (fator V ativado), R(receptor). Adaptado de (Kornalik, 1985)

As plaquetas aderentes sofrem um processo de ativação (mudança conformacional) durante o qual ocorre liberação do conteúdo de seus grânulos. A reação de liberação é iniciada pela ligação do agonista a receptores de superfície celular, o que ativa as cascatas de fosforilação de proteínas intracelulares, causando, em última análise, a liberação do conteúdo dos grânulos. Especificamente, a estimulação pelo ADP, pela epinefrina e pelo colágeno leva à ativação da fosfolipase A_2 da membrana plaquetária, estas moléculas clivam os fosfolípidios da membrana e libera ácido araquidônico, e pela via ciclooxigenase gera tromboxano A_2 , os quais através de um receptor acoplado à proteína G, provoca vasoconstrição no local de lesão vascular ao induzir uma redução dos níveis de cAMP nas células musculares lisas vasculares. Durante a reação de liberação, os grânulos das plaquetas secretam ativamente grandes quantidades de ADP, Ca^{2+} , ATP, serotonina, FvW e fator plaquetário IV.

O receptor de trombina, um receptor acoplado à proteína G e ativado por protease, é expresso na membrana plasmática das plaquetas, células endoteliais vasculares, células musculares lisas e fibroblastos. A ativação do receptor de trombina envolve a clivagem proteolítica de um domínio extracelular de receptor pela trombina. O novo ligante fixado ao NH₂-terminal liga-se intramolecularmente a um sítio distinto dentro do receptor e desencadeia a sinalização intracelular. A ativação do receptor de trombina resulta em ativação da fosfolipase mediada pela proteína G.

As plaquetas ativadas e aderidas ao endotélio liberam uma série de substâncias que tem outras funções, como:

1. Substâncias que promovem agregação das plaquetas aderidas;
2. Substâncias que ativam o mecanismo da coagulação;
3. Substâncias que diminuem a permeabilidade vascular.

A *fase secundária* da hemostasia compreende os fenômenos que se destinam à formação de um coágulo consistente, baseado em uma série de reações em cascata cujo resultado final é a formação de fibrina sobre o tampão plaquetário a partir do fibrinogênio, resultando em um coágulo estável e resistente capaz de obstruir o vaso sanguíneo lesionado com a deposição de uma rede de fibrina entre as plaquetas agregadas. Esse mecanismo da coagulação é regulado por uma série de fatores que impedem o crescimento descontrolado do trombo ou coágulo no interior do vaso (Figura 9) (Verstraete; Vermeylen, 1989).

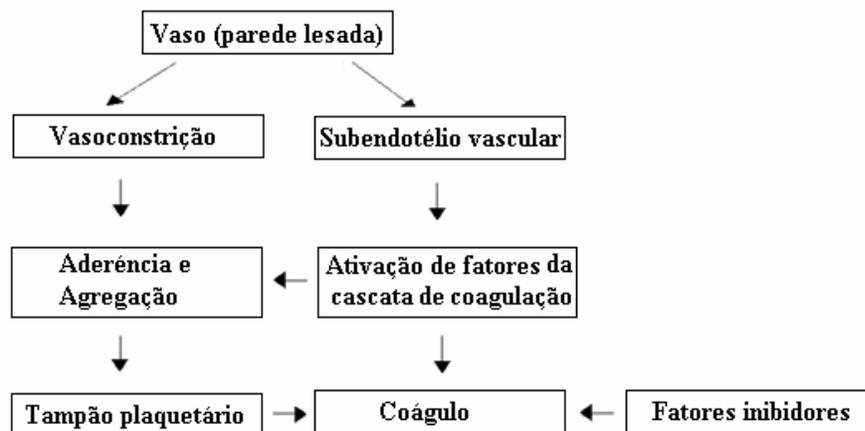


Figura 9. Esquema do Sistema Hemostático. Adaptado de (Narayanan; Hamasaki, 1998).

2. OBJETIVOS.

Este trabalho tem como finalidade a purificação, caracterização bioquímica e avaliação farmacológica da uma serinoprotease de veneno *Bothrops barnetti*, constituindo os seguintes objetivos específicos.

- 2.1. Purificar uma serinoprotease trombina-like isolada do veneno da serpente *Bothrops barnetti*.
- 2.2. Determinar propriedades bioquímicas através de eletroforese SDS-PAGE, massa molecular relativa, estudos cinéticos, composição de aminoácidos e estudos estruturais.
- 2.3. Avaliar as atividades farmacológicas através de atividade edematogênica, atividade miotóxica, atividade hemorrágica e agregação plaquetária.
- 2.4. Avaliar as atividades fibrinolíticas frente aos efeitos de concentração da enzima, tempo, temperatura, íons e inibidores.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Veneno: O veneno de *Bothrops barnetti* foi cedido pela Profa. Dra. Corina Vera Gonzáles da Escola de Química da Universidade Nacional San Agustín de Arequipa-Perú.

3.2 Animais: Foram utilizados camundongos de linhagem Swiss, fornecidos pelo Biotério Central da Unicamp. Os animais foram mantidos em gaiolas abastecidas de água e ração, em ambiente com temperatura e iluminação controlada. Os experimentos com animais foram feitos como indicam as normas estabelecidas pela Comissão de Ética no Uso de Animais CEUA/UNICAMP pertencente ao protocolo N° 2313-1.

3.3 Reagentes: Os reagentes usados nos experimento foram de grau PA fornecidos por Sigma-Aldrich Brasil, Merk e Bio Rad.

3.4 Isolamento e purificação da serinoprotease de *Bothrops barnetti*

3.4.1 Preparação da amostra e isolamento em cromatografia sephadex G -75.

Amostras de 50mg do veneno bruto cristalizado de *Bothrops barnetti* foram suspensas em 1ml de tampão bicarbonato de amônio – $(\text{NH}_4\text{HCO}_3)$ 1M pH 8,0 e centrifugadas a 9000 rpm durante três minutos, o sobrenadante foi aplicado em coluna cromatográfica de exclusão molecular contendo Sephadex G-75 (110 x 4,0 cm) previamente equilibrada, e eluída com tampão bicarbonato de amônio 0,5 M pH 8,0. Frações de 2,5 ml foram coletadas em coletor de frações automático (marca Pharmacia Biotech) num fluxo de 0,16 ml/min e monitoradas em espectrofotômetro (Femto 700 plus) a 280nm. Todas as frações foram submetidas à avaliação de atividade proteolítica para o reconhecimento da atividade de serinoprotease com o substrato BApNA (N-benzoil-D,L-arginil paranitroanilida). Este substrato sintético que cliva na ligação de arginina liberando o cromóforo p-nitroanilina como produto da reação de hidrólise, a qual produz uma coloração amarela lida num comprimento de onda de 410nm.

3.4.2 Purificação em Cromatografia líquida de alta eficiência-fase reversa (HPLC)

A fração com atividade serinoprotease foi purificada em uma coluna analítica para HPLC de fase reversa. O sistema cromatográfico utilizado foi HPLC com detector Waters 2487, equipado com duas bombas Waters 515, um injetor automático de amostras com um loop de 200µl modelo Rheodyne 7725i, e uma coluna analítica Supelco C8 previamente equilibrada com ácido trifluoroacético (TFA) 0,1% pH 3,5 (Tampão A).

Os picos foram monitorados através da determinação da absorvância a 280nm. 5,0mg de amostra dissolvidas em TFA e bicarbonato de amônia foram previamente centrifugadas e depois aplicada em cada corrida num volume final de 200µl. As frações coletadas foram liofilizadas e estocadas a -20°C.

3.4.3 Avaliação do grau de pureza.

As amostras obtidas da etapa de purificação HPLC-F R foram analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS-PAGE segundo a metodologia descrita por Laemmli (1970). A confirmação do grau de pureza da serinoprotease isolada do veneno de *B. barnetti* (TLBbar) foi obtida através de HPLC (High performance liquid chromatography) em coluna de fase reversa C-8 nas mesmas condições da purificação.

3.5 Avaliação físico-química.

3.5.1 Eletroforese em SDS-PAGE.

A eletroforese em gel de poliacrilamida foi realizada segundo metodologia descrita por Laemmli (1970), em um sistema Mighty Small II SE 260 (Hoefer Scientific Instruments). As placas de poliacrilamida foram feitas de modo descontínuo, apresentando um gel de concentração de 5% (stacking gel) e um gel de corrida de 15% (Running gel). O gel de corrida foi preparado utilizando o tampão Tris-HCl 1,0M pH 8,8 SDS 20%, N-N-N-N Tetrametiletilendiamina (TEMED) 0,1% e persulfato de amônio (PSA) 10% para a polimerização. O gel de corrida foi preparado com tampão Tris-HCl 1M pH 6,8 SDS 20% 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 posteriormente fervidas a 95°C durante 5 minutos. 15µl de amostras e marcadores

moleculares foram aplicados ao gel. A corrida eletroforética foi realizada em amperagem constante de 30mA e voltagem livre durante 90min. Foram usados os seguintes marcadores de massa molecular: Fosforilase b (97,4kDa), albumina sérica bovina (66,2kDa), Ovoalbumina (45kDa), anidrase carbônica (31kDa), inibidor de tripsina de soja (21,5kDa). lizosima (14,4kDa). 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%.

3.5.2 Análise de composição de aminoácidos.

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. As reações de hidrólises foram realizadas através de diluições das amostras em solução de acetonitrila 66%, 10µl dessa solução o equivalente a 2nmoles de amostra foram secadas em vácuo, seguida de uma reação ácida de HCl/Fenol 6N por 24horas. 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 C18 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 uma corrida padrão de aminoácidos PITC (Henrikson e Meredith 1984).

3.5.3. Estudo da homologia seqüencial da TLBbar.

3.5.3.1 Redução e alquilação.

A proteína liofilizada purificada em HPLC de fase reversa foi re-suspendida em ureia 8M contendo DTT 10mM a pH 8 e incubada a 37°C por duas horas para redução das pontes dissulfeto. Iodoacetamida foi utilizada para alquilar o grupo tiol livre a partir dos resíduos de cisteína reduzidos. Apoiados em experimentos prévios foi escolhido um excesso molar em 30% de iodoacetamida em relação ao número total de tióis. A mistura

foi incubada por 1,5 horas a 37°C em escuridão. A reação foi parada injetando a mistura em uma coluna de HPLC de fase reversa seguida de liofilização dos picos coletados.

3.5.3.2 Hidrólise enzimática.

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

3.5.3.3 Espectrometria de massas.

Espectrometria de massa ESI-CID-MS/MS foi realizada usando um espectrômetro de massas híbrido quadrupole-time of flight (Q-TOF, Micromass Manchester, UK), equipado com uma fonte de nano spray operando em modo de ionização positivo. As condições de ionização foram: voltagem capilar de 2,3kV, um cone voltagem e lentes RF1 de 30 e 100V, respectivamente, e uma energia de colisão de 10eV. A temperatura da fonte foi 70°C e o cone do gás foi N₂ a um fluxo de 80 l/h; não foi utilizado gás nebulizador para obter o spray. Gás argônio foi utilizado para fragmentação de íons. Foi realizada calibração externa com iodeto sódico em uma faixa de massas a partir de 50 até 3000 m/z. Todos os espectros foram adquiridos com o analisador TOF em modo “Vmode” (TOF kV=9,1) e voltagem MCP a 2150V (Damico *et al.*, 2005).

Peptídeos trípticos alquilados a partir da TLBbar foram separados em HPLC de fase reversa, liofilizados e re-suspendidos em 20% de acetonitrila e 0,1% de TFA. Cada peptídeo foi introduzido por separado na fonte do espectrômetro de massa com uma seringa a um fluxo de 500 nl/min⁻¹. Ante de realizar os espectros de massa em tandem foi adquirido um espectro ESI/MS (modo TOF MS) para cada pico obtido do HPLC de fase reversa na faixa de 400–2000 m/z para selecionar os íons de interesse. Posteriormente esses íons foram fragmentados em uma célula de colisão (modo TOF MS/MS). Diferentes energias de colisão foram utilizadas dependendo do estado de carga e massa dos íons. Os espectros resultantes foram adquiridos no analisador TOF e resolvidos usando o software MassLynx-MaxEnt 3 algorithm.

3.5.4 Atividade proteolítica sobre o BAPNA

O substrato cromogênico N-benzoil-D,L-arginil paranitroanilida (BAPNA) é utilizado para avaliar atividade proteolítica. (Erlanger *et al.*, 1961). Esta atividade foi

determinada pela incubação de 200µl de substrato cromogênico sintético 1mM e 50µl de tampão (Tris HCl 10mM, CaCl₂ 10mM, NaCl 100mM) pH 7,8 por 10 minutos a 37°C. O produto de hidrólise se obteve pela adição de 5µl de amostra (serinoprotease) e foi analisado por absorvância em 410nm em um VERSA Max microplate reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA.) utilizando-se como coeficiente de extinção molar do produto *p*-nitroanilida o valor de 8800M⁻¹.cm⁻¹. As absorvâncias das amostras foram aferidas sendo calculadas em unidades de nanomoles/minuto. Os controles foram feitos com os reagentes, seguindo os mesmos procedimentos e substituindo o volume da toxina ou proteína por água destilada. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima presente na amostra capaz de liberar 1 µmol de *p*-nitroanilida por minuto, nas condições descritas.

3.5.5 Estudo Cinético.

3.5.5.1 Efeito da concentração do substrato.

O ensaio foi realizado seguindo a mesma metodologia descrita na atividade proteolítica sobre o BApNA. As concentrações da toxina TLBbar foram avaliadas em diluições seriadas de 0,0815; 0,163; 0,325; 0,625; 1,25; 2,5; 5,0 e 10 mM respectivamente. 5µl de cada amostra foi analisado por triplicata e lido em absorvância de 410nm, utilizando-se como coeficiente de extinção molar do produto *p*-nitroanilida o valor de 8800M⁻¹.cm⁻¹. As absorvâncias das amostras foram aferidas sendo calculadas em unidades de nanomoles/minuto. Os controles foram feitos apenas com os reagentes, seguindo os mesmos procedimentos e substituindo o volume da toxina ou proteína por água destilada. O ensaio foi feito em espectrofotômetro VERSA Max microplate reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA)

3.5.5.2 Efeito da temperatura sobre a atividade enzimática

O ensaio para a avaliação do efeito da temperatura sobre a atividade da serinoprotease TLBbar foi realizado segundo o método descrito anteriormente. As temperaturas trabalhadas foram de 25, 30, 35, 40 e 45°C respectivamente as quais foram mantidas por 15 minutos e lidas em seguida a 410nm, utilizando-se como coeficiente de extinção molar do produto *p*-nitroanilida o valor de 8800M⁻¹.cm⁻¹. As absorvâncias das amostras foram aferidas sendo calculadas em unidades de nanomoles/minuto. Os controles foram feitos apenas com os reagentes, seguindo os

mesmos procedimentos e substituindo o volume da toxina ou proteína por água destilada. O ensaio foi feito em espectrofotômetro VERSA Max microplate reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA).

3.5.5.3 Efeito do pH sobre a atividade enzimática

O ensaio do efeito do pH sobre a atividade da serinoprotease TLBbar foi realizado segundo o método descrito em 3.5.5, com variações de tampões para a obtenção de pH diferentes de 2 até 10. Os tampões preparados para este experimento foram: Citrato de sódio/ácido cítrico 15mM, NaCl 100mM, CaCl₂.2H₂O 10mM pH 2,3 e 4; Citrato de sódio 15mM, CaCl₂. 2H₂O 10mM, NaCl 100mM pH 5 e 6; Tris-HCl 10mM NaCl 100mM, CaCl₂.2H₂O 10mM pH 7 e 8; Glicina 15mM CaCl₂. 2H₂O 10mM NaCl 100mM pH 9 e 10. As amostras foram lidas a 410nm, utilizando-se como coeficiente de extinção molar do produto *p*-nitroanilida o valor de 8800M⁻¹.cm⁻¹. As absorbâncias das amostras foram aferidas sendo calculadas em unidades de nanomoles/minuto. Os controles foram feitos apenas com os reagentes, seguindo os mesmos procedimentos e substituindo o volume da toxina ou proteína por água destilada. O ensaio foi feito em espectrofotômetro VERSA Max microplate reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA.)

3.5.5.4 Efeito de inibição sobre a atividade enzimática.

Os ensaios da inibição foram feitos com o substrato cromogênico BApNA, segundo a metodologia descrita na seção 3.5.5. A serinoprotease TLBbar e os agentes químicos ácido etilendiamintetracético EDTA (0,5M), ácido glicol-bis (2 aminoetileter) –N,N,N,N-tetracético EGTA (0,5M), polimetilsulfonilfluoride PMSF (0,5mM), inibidor tripsina de soja SBT-1 (5ug/μl), Leupeptina (10mM), e heparina sódica (5000UI/ml) foram incubados (relação 1:1 v/v) por 15 minutos a 37°C antes de acrescentar à mistura. A atividade proteolítica residual foi calculada como atividade porcentual em relação à preparação controle (toxina sem agente inibidor), a qual foi considerada o 100 % da atividade.

3.5.5.5 Efeito de íons sobre a atividade enzimática.

O ensaio utilizou o substrato BApNA com os seguintes íons divalentes: Cálcio, Magnésio, Bário, Zinco e Cádmiio em concentrações de 0,05 M os quais foram

dissolvidos com tampão Tris-HCL 10mM pH 7,5 o tampão contendo diferentes íons foram incubadas por 10 minutos antes de acrescentar TLBbar.

O produto de hidrólise do cromóforo obtida pela adição de 5µl de amostra (serinoprotease) foi analisado por absorvância em 410nm em um VERSA Max microplate reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA).

A atividade proteolítica residual foi calculada como atividade porcentual em relação à preparação controle (toxina sem íons), considerada 100 % de atividade.

3.6 Avaliação Farmacológica

3.6.1 Atividades Fibrinogenolíticas.

3.6.1.1 Avaliação da concentração de enzima sobre o fibrinogênio.

A atividade fibrinogenolítica foi determinada segundo metodologia descrita por (Edgar e Prentice, 1973) com algumas modificações de acordo com Rodrigues *et al.*, (2000). O experimento foi realizado com solução de fibrinogênio bovino 1,5mg/ml ressuspendido em tampão Tris-HCl 10mM pH 7,4 contendo 10% de CaCl₂ 0,01M. A enzima TLBbar foi incubada em dita solução em concentrações diferentes: 0,625; 1,25; 2,5; 5,0; 10 e 20ug.a 37°C por duas horas. A reação foi interrompida pela adição de 50µl de solução desnaturante contendo Ureia 8,5 M, SDS 0,55%, EDTA 0,002M, Tris-HCl 0,02M, Beta Mercaptoetanol 10% e azul de bromofenol 0,05% seguida por fervura a 100°C durante 5 minutos. As amostras foram analisadas por SDS-PAGE 15%.

3.6.1.2 Efeito de íons sobre atividade fibigênolítica

O ensaio foi realizado preparando soluções 0,05 M de diferentes íons provenientes das sais CaCl₂. 2H₂O, MgCl₂. 6H₂O, BaCl₂. 2H₂O, ZnCl₂, CuCl₂ e CdCl₂ contendo fibrinogênio 1,5mg/ml. 10ug da enzima TLBbar foi incubada para cada íon testado durante duas horas a 37°C. A reação foi interrompida com adição de 50ul de solução desnaturante, seguida por fervura a 100°C durante 5 minutos. As amostras foram analisadas por SDS-PAGE 15%.

3.6.1.3 Efeito de agentes químicos para inibição.

O experimento foi realizado incubando a enzima TLBbar com diferentes agentes químicos: ácido etilendiamintetracético EDTA (0,5M) agente quelante, ácido glicol-bis (2 aminoetileter) -N,N,N,N-tetracético EGTA (0,5M) agente quelante, polimetilsulfonilfluoride PMSF (0,5mM) inibidor de serinoproteases, inibidor tripsina

de soja SBT-1 (5 μ g/ μ l), Leupeptina (10mM) inibidor competitivo de serinoproteases, e heparina sódica (2mM) relação 1:1 (v/v) por 30 minutos a 37°C. 20 μ l da mistura acrescentaram-se a 200 μ l de fibrinogênio (1,5mg/ml) contendo 10% de CaCl₂ 0,01M. A solução final foi incubada a 37°C por duas horas. A reação foi interrompida com adição de 50 μ l de solução desnaturante, seguida por fervura a 100°C durante 5min. As amostras foram analisadas por SDS-PAGE 15%.

3.6.1.4 Efeito do tempo sobre a atividade fibrinogênolítica.

O experimento foi realizado incubando 15 μ g da enzima TLBbar em fibrinogênio 1,5mg/ml em diferentes tempos (0,25 0,5, 1, 2, 4, 6 e 24 horas) após a reação é detida pela adição de 50 μ l de solução desnaturante, seguida por fervura a 100°C durante 5min. As amostras foram analisadas por SDS-PAGE 15%.

3.6.1.5 Efeito da temperatura sobre a atividade fibrinogênolítica.

O ensaio foi realizado incubando 15 μ g da enzima TLBbar com fibrinogênio 1,5mg/ml a diferentes temperaturas: 20, 30, 40, 50, 60, 70 e 80°C durante duas horas cada amostra. Após o tempo a reação é detida pela adição de 50 μ l de solução desnaturante, seguida por fervura a 100°C durante 5min. As amostras foram analisadas por SDS-PAGE 15%.

3.6.2 Atividade coagulante (Dose Coagulante Mínima)

A atividade foi caracterizada pelo imediato aparecimento da rede de fibrina em presença de cloreto de cálcio 0,1M. A dose coagulante mínima (DCM) é definida como a quantidade de enzima capaz de coagular o plasma (200 μ L) em 60 segundos (Rojas, 2005). A atividade foi realizada com 200 μ L de plasma humano obtido da centrifugação do sangue a 200g as amostras foram testadas pré-encubadas a 37°C, com diferentes concentrações (1,0; 2,5; 5,0; 10; 15; 20 μ g) de TLBbar

3.6.3 Atividade fibrinolítica.

A atividade fibrinolítica foi avaliada com plasma humano, o qual foi obtido a partir de centrifugação do sangue total a 200g por 15 minutos, 500 μ l de plasma foi misturado com 100 μ l de trombina a 37°C em banho Maria e após esse período adiciona-se 100 μ l de CaCl₂ 0,02M até aparecimento do coágulo. Este foi transferido a um tubo

limpo, e deixado em incubação com 100µg de TLBbar overnight. O controle foi deixado em incubação sem a enzima.

3.6.4 Agregação Plaquetária.

A atividade de agregação plaquetária foi feita como descrita por Leet *et al.*, 2003. O ensaio foi realizado com plaquetas lavadas e o sangue total foi coletado em proporção de 1:9v/v anticoagulante e sangue, o anticoagulante usado foi ACD-C (ácido cítrico dextrosa) que inibe a agregação durante o processo de lavagem das plaquetas sendo eficiente para quelar cálcio, o tubo de coleta foi homogeneizado por inversão lenta, e mantido a temperatura ambiente. O sangue foi centrifugado a 400g por 15min a 20°C, posteriormente o plasma rico em plaquetas (PRP) foi retirado colocado em tubo com tampão de lavagem pH 6,0 (NaCl 140mM, KCl 5mM, citrato de sódio 12mM, glicose 10mM e sacarose 10mM) 5:7 v/v e centrifugado a 800g por 12min a 20°C, sendo o sobrenadante desprezado. O resíduo plaquetário foi cuidadosamente ressuspensão em solução de Krebs desprovida de cálcio. (Radomski e Moncada, 1983).

A medida de agregação foi realizada usando-se um agregômetro de dois canais (Payton Scientific Instruments, Inc, Buffalo, NY). Os ensaios foram realizados a 37°C com 500µL de plaquetas lavadas e a agregação foi analisada depois de 2 minutos da incubação com diferentes concentrações da enzima TLBbar 0,03125; 0,0625; 1,25 e 2,5µg dissolvidas com NaCl 0,15 M. O controle dos experimentos foi realizado utilizando trombina, como agregante plaquetário.

3.6.5 Atividade edematogênica.

A curva dose-resposta para este ensaio foi realizada utilizando proteína isolada purificada TLBbar e veneno bruto de *B. barnetti*. Seis grupos de três camundongos da linhagem swiss foram injetados via subcutâneas na região sub plantar da pata direita posterior com 50µL de soluções contendo 2, 5 e 10 µg do veneno total e com concentrações de 5, 25 e 50µg da proteína purificada TLBbar. Na pata esquerda foram inoculados 50µl de PBS (0,12 M NaCl, 0,04 M fosfato de sódio, pH 7,2) para o controle. A atividade edematogênica foi avaliada em intervalos de tempos (0,5, 1, 3, 6, 9 e 24 horas respectivamente) após a injeção, a formação de edema foi avaliada pelo aumento do volume da pata medida com paquímetro (INZISE Co LTDA, SP-USA 1101-150) e expresso em porcentagem de indução de edema.

A formação de edema foi expressa como a porcentagem a mais da medida da pata direita em relação à pata esquerda (controle). A dose mínima para a formação de edema (MED) foi definida como a quantidade de toxina que produz 30% de formação de edema após uma hora de injetado a toxina (Ponse-Soto *et al.*, 2007).

3.6.6 Atividade hemorrágica.

A atividade hemorrágica foi realizada segundo a metodologia de Salistre de Araujo (2007). Os camundongos foram distribuídos aleatoriamente em seis grupos (três animais por cada grupo), permanecendo em repouso para adaptação por 24 horas. Preparou-se uma solução stock de 1mg/ml do veneno total *B. barnetti* do qual foram preparadas doses de 40, 50 e 60µg dissolvidas em solução de PBS, da mesma maneira para TLBbar em doses de 10, 20 e 50µg respectivamente. A hemorragia foi induzida através da injeção intradérmica na região dorsal dos camundongos, sendo os animais sacrificados e as peles retiradas duas horas após a injeção. O halo hemorrágico formado foi medido em milímetros (mm). A Dose Hemorrágica Mínima é aquela dose de amostra capaz de induzir um halo hemorrágico de 10mm na pele.(Selistre de Araujo, 2007).

3.6.7 Atividade miotóxica.

Sete grupos de camundongos (três animais por cada grupo) foram submetidos a injeções via intramuscular (I.M) no gastrocnêmio direito, aplicando doses variadas de toxina. Foram preparadas diferentes doses do veneno total de *B. barnetti* em concentrações de 5, 10 e 20µg e de TLBbar em doses de 10, 20 e 50µg. Os controles receberam somente PBS. Os níveis de CK plasmáticos foram dosados depois de 1, 3, 6, 9 e 24 horas respectivamente. O kit utilizado foi CK – NAC método cinético UV (Laborlab).

O sangue dos camundongos foi coletado através de corte na extremidade da cauda e coletados em capilares heparinizados sendo imediatamente centrifugados a 12.000g por 3 minutos. Em 250µl de reativo preparado de acordo ao kit foram acrescentados 5µl de plasma obtido pela centrifugação do sangue, os quais foram incubados por 3 minutos em placa de ELISA e lidas a 430nm no espectrofotômetro VERSA Max microplate reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA).

A quantidade de creatina quinase foi expressa em U/L (unidades/litro), sendo que uma unidade resulta da fosforilação de um nanomol de creatina por minuto (Gutierrez *et al.*, 2008).

3.7. Análise estatística.

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

4. RESULTADOS.

4.1 Purificação da serinoprotease.

4.1.1 Cromatografia de exclusão molecular

O perfil cromatográfico do veneno de *Bothrops barnetti* em Sephadex G-75 mostrou seis frações denominadas Bbt-I, Bbt-Ia, Bbt-II, Bbt-IIa, Bbt-III, Bbt-IV (Figura.10). As frações foram submetidas a ensaios de atividade proteolítica sobre o BApNA para detecção da fração de interesse com maior atividade enzimática, assim mesmo foram testados ensaios de tempo de coagulação sobre fibrinogênio bovino com o propósito da identificação da serinoprotease.

Os resultados mostram que a fração Bbt-Ia apresentou maior atividade enzimática e um tempo de coagulação maior em comparação com as outras frações. A fração Bbt-Ia foi coletada e quantificada para sua purificação.

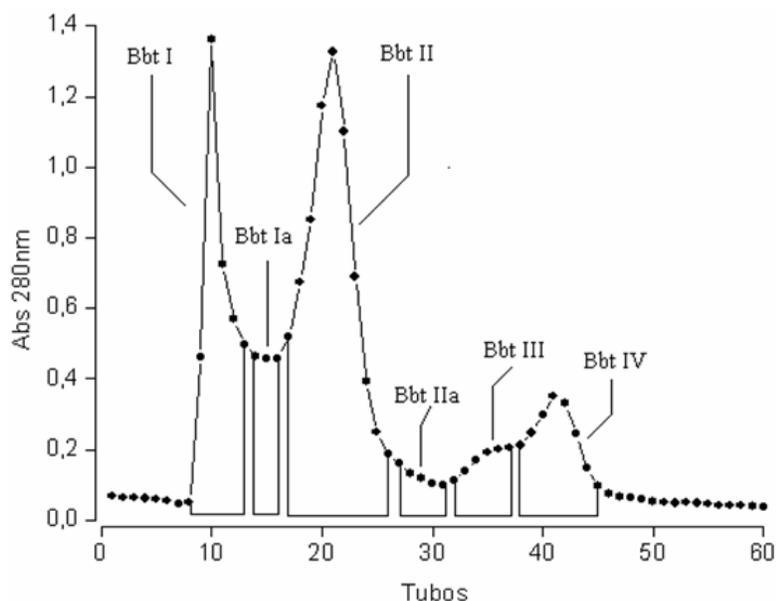


Figura 10. Cromatografia de exclusão molecular em Sephadex G-75 (110 x 4,0cm) do veneno bruto de *Bothrops barnetti*. A coluna foi equilibrada e eluída com tampão bicarbonato de amônio (AMBIC) 0,5M pH 8,0. Amostra: 50mg do veneno dissolvido em 1mL de AMBIC 1,0 M centrifugado a 12.000 xg durante 5 minutos. Fluxo de 10mL/hora, sendo coletados 2,5mL/tubo a temperatura ambiente (25°C). As frações foram agrupadas de acordo com as demarcações.

4.1.2 Purificação da fração Bbt-Ia em cromatografia HPLC fase reversa.

A fração em estudo foi submetida a cromatografia em HPLC de fase reversa em coluna de hidrofobicidade analítica Supelco C-8 mostrando. O perfil cromatográfico apresentou um total de 13 picos (Figura 11), sendo avaliadas atividades biológicas, proteolítica e coagulante em todas as frações eluídas. Só a fração 11 apresentou atividades enzimáticas com propriedades serinoprotease de tipo trombina-like e foi nomeada de TLBbar. A proteína de interesse foi eluída em tempo de retenção de 41 minutos e 60% de tampão B (60% de acetonitrila, 0,1% de TFA).

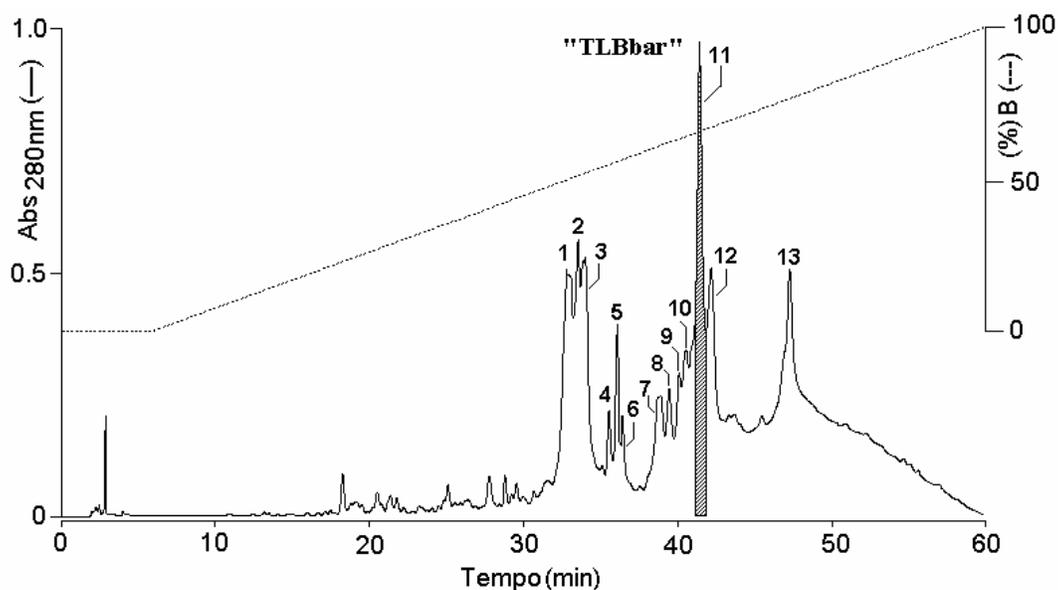


Figura 11. Cromatografia líquida de alta eficiência em coluna de fase reversa C8 da fração Bbt-Ia (fração de exclusão molecular). A eluição foi feita com gradiente de concentração de 0 - 100% de acetonitrila 60%, TFA 0,1% com um fluxo de 1,0mL/min durante 72 minutos. Os picos foram monitorados na absorvância de 280nm. A fração com atividades biológicas, proteolíticas e coagulantes foi demarcada.

4.1.3 Eletroforese SDS-PAGE.

A figura 12 mostra a eletroforese em gel de poliacrilamida do veneno total de *B. barnetti* e das frações correspondentes aos passos cromatográficos, como são exclusão molecular G-75 e HPLC fase reversa. Os marcadores moleculares utilizados foram de: Isozyme 14kDa, Soybean trypsin inhibitor 20kDa, Carbonic anhydrase 30kDa, Ovoalbumin 43kDa, Albumin 66kDa, Phospholipase B 97kDa. O veneno total (1) apresenta várias bandas proteicas evidenciando a complexa mistura protéica que possui. A fração Bbt-Ia (2) obtida da cromatografia de exclusão molecular apresenta bandas

protéicas em torno de 19 a 30 kDa aproximadamente, TLBbar (3) condições não reduzidas, e TLBbar (4) condições reduzidas, TLBbar em condições não reduzidas apresenta uma única banda protéica (massa molecular aparente de 28 kDa) de mobilidade eletroforética restrita que denota homogeneidade molecular.

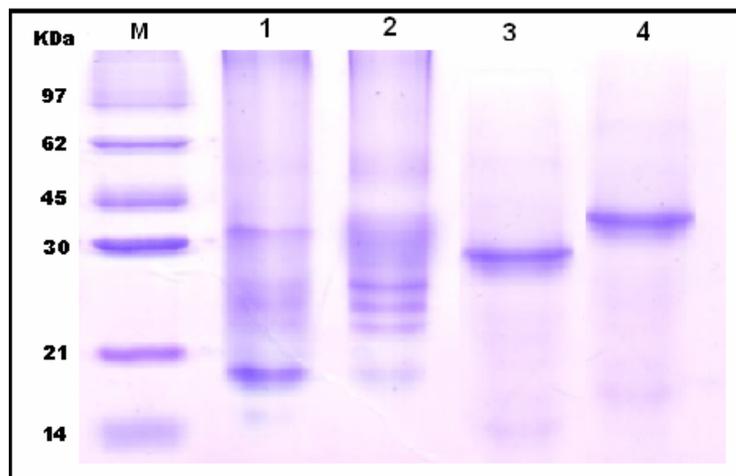


Figura 12. Eletroforese em gel de poliacrilamida em condições nativas e na presença de agentes desnaturantes (B-mercaptoetanol). Marcadores moleculares(M). (1)Veneno Total *Bothrops barnetti*, (2) Fração Bbt-Ia exclusão molecular, (3) TLBbar obtida HPLC em condições nativas, (4) TLBbar obtida HPLC em condições reduzidas com DTT.

4.1.4 Determinação da massa molecular relativa (Mr) SDS-PAGE

TLBbar do veneno bruto de *Bothrops barnetti* que foi obtido por purificação em cromatografia HPLC apresenta um alto grau de pureza e massa molecular relativa próxima de 28,50 KDa (figura 13).

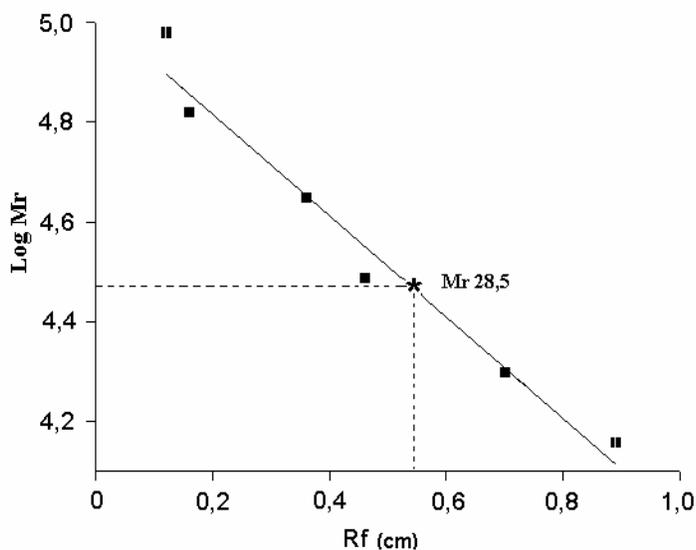


Figura. 13. Massa molecular relativa de TLBbar.

4.1.5 Confirmação do grau de pureza de TLBbar

A confirmação do grau de pureza da serinoprotease isolada do veneno de *Bothrops barnetti* foi obtida através de HPLC em coluna de fase reversa C8 nas mesmas condições da purificação. A Figura 14 apresenta um perfil com um único pico agudo que foi eluído com tempo de retenção de 41 minutos. A eluição foi feita com gradiente de concentração de 0 - 100% do acetonitrila 60%, TFA 0,1%, com um fluxo de 1,0mL/min durante 72 minutos e monitorada a 280nm.

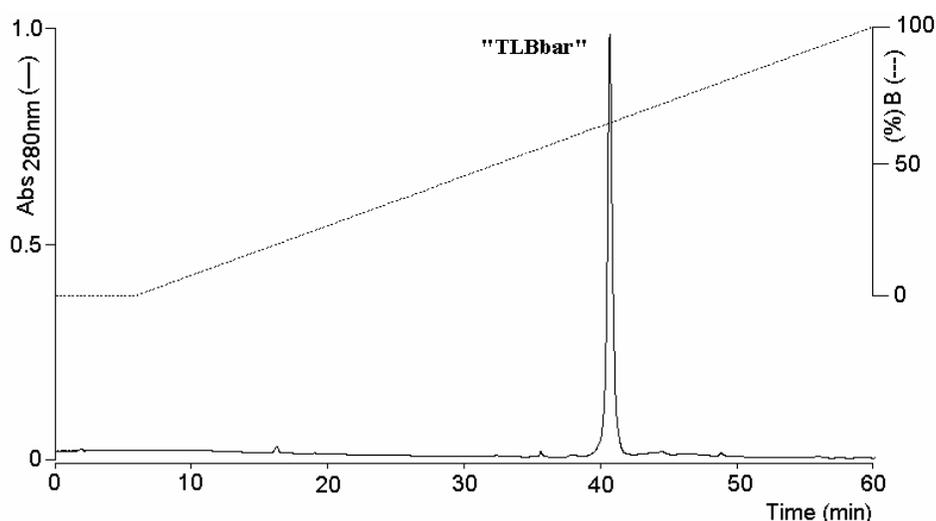


Figura 14. Recromatografia líquida de alta eficiência em coluna de fase reversa C8. (Supelco). A eluição foi feita com gradiente de concentração de 0 - 100% do acetonitrila 60%, TFA 0,1% (Tampão B), com um fluxo de 1,0 mL/min durante 72 minutos.

4.2 Avaliação da atividade coagulante.

Foram analisadas as atividades coagulantes das 13 frações obtidas da cromatografia HPLC fase reversa e avaliada a concentração de proteína de cada uma delas pelo método de Bradfor. A fração que apresenta maior atividade coagulante é TLBbar (fração 11). Ela registra um tempo de coagulação sobre fibrinogênio bovino de 8 segundos, as demais frações (excepto a 12) coagularam após de 60 segundos (Tabela 3). As concentrações de proteína de cada fração foram calculadas a partir de cada 100ug de fração liofilizada após a coleta. TLBbar obteve o maior tempo de coagulação independentemente da quantidade protéica.

Amostras	Tempo de coagulação (seg)	Concentração de proteína mg/ml
Fração 1	+ 60	0,78356
Fração 2	+ 60	0,814467
Fração 3	+ 60	0,879433
Fração 4	+ 60	0,649424
Fração 5	+ 60	1,013316
Fração 6	+ 60	0,772789
Fração 7	+ 60	0,951067
Fração 8	+ 60	0,851679
Fração 9	+ 60	1,015743
Fração 10	+ 60	1,061035
Fração 11(TLBbar)	8	0,900376
Fração 12	12	0,888994
Fração 13	+ 60	0,979111

Tabela 3. Atividade coagulante sobre o fibrinogênio bovino das frações obtidas da cromatografia de HPLC e concentração de proteína obtida da purificação (Atividade coagulante foi expressa em segundos).

4.3 Características Físico-químicas.

4.3.1 Análise de composição de aminoácidos.

A análise global da composição de aminoácidos da TLBbar, evidenciou alta presença de Asx, Glx, Ser, Gly, Pro, e Leu em comparação a outros resíduos (tabela 4). A evidência de 8 resíduos de cisteína sugere a formação de quatro pontes dissulfeto. A massa molecular calculada é de 28407,75 Da.

Aminoácidos	Mol AA	PM
Asx	31	3568,41
Glx	20	2582,6
Ser	18	1567,65
Gly	26	1483,83
His	6	822,96
Arg	12	1874,52
Thr	14	1555,68
Ala	13	924,17
Pro	23	2233,99
Tyr	7	799,05
Val	15	2447,25
Met	5	656,05
Cys	8	825,12
Ile	16	1650,72
Leu	19	2150,23
Phe	9	1324,71
Lys	15	1922,85
Trp	ND	ND
Total	258	28407,75

Tabela 4. Composição de aminoácidos de TLBbar isoladas de veneno de *Bothrops barnetti*. Os valores são expressos em mol de aminoácidos por mol de proteína. (ND = não determinado).

4.3.2 Análise estrutural da trombina like TLBbar.

Após a digestão trípica da proteína TLBbar foi possível a identificação e sequenciamento de três peptídeos via espectrometria de massa MS/MS. O estudo da homologia sequencial realizada nos três peptídeos (Figura 15), em alinhamento com outras serinoproteases de veneno de serpentes, de sequências já determinadas e registradas no banco de dados, demonstrou possuir um alto grau de homologia com a trombina-like Cal isolada de *Gloydius ussuriensis*, seguidamente de Crotalase (*Crotalus adamanteus*) e flavoxobin (*Trimeresurus flavoviridis*). As regiões encerradas representam a sequência consenso entre as diferentes serinoproteases trombina-like, indicando tanto regiões altamente conservadas quanto variáveis. O aminoácido Histidina conservado na posição 57 evidencia a presença inalterável do sítio catalítico das serinoproteases.

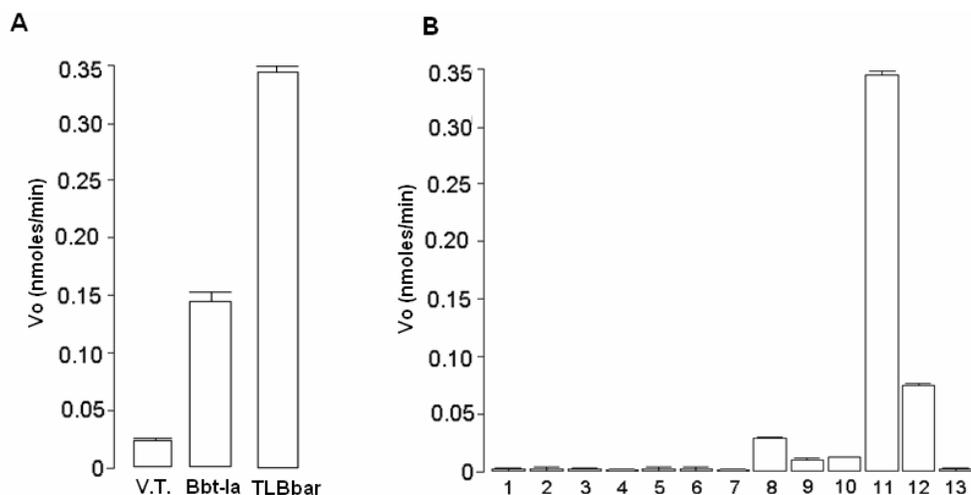


Figura 16. Atividades proteolíticas. **A:** Atividade proteolítica do veneno *B. barnetti* (VT). Fração de exclusão molecular G-75 (Bbt-Ia). Fração do HPLC fase reversa TLBbar. **B:** Atividade proteolítica sobre o BApNA das frações 1-13 obtidas da Cromatografia HPLC de fase reversa.

4.4 Cinética Enzimática.

4.4.1 Efeito da concentração do substrato.

Avaliou-se a atividade enzimática de TLBbar sobre o substrato cromogênico BApNA com diferentes concentrações de substrato: 0,0815; 0,163; 0,3125; 0,625; 1,25; 2,5; 5,0; 10mM. Os resultados na figura 17A se mostra uma curva Michaeliana

4.4.2 Determinação de K_m e V_{max} a partir do gráfico duplo recíproco de Lineweaver-Burk

O cálculo da V_{max} e K_m foi feito pelo método de Lineweaver-Burk (duplo-recíproco) calculando as inversas dos valores de velocidade e concentrações do substrato (Figura 17B). Assim os valores obtidos de V_{max} é de 0,42 nanomoles/min e K_m de 0,433 mM para TLBbar.

4.4.3 Efeito da temperatura na atividade proteolítica

O efeito da temperatura na atividade proteolítica foi avaliado em diferentes temperaturas: 25-45°C. Na Figura 17C demonstra-se que TLBbar apresenta atividade enzimática entre 35 e 40°C sendo a temperatura ótima de 37°C

4.4.4 Efeito do pH na atividade proteolítica

A Figura 17 D mostra as atividades enzimáticas avaliadas em diferentes pH (2 - 10), os resultados evidenciam que o pH ótimo da atividade proteolítica de TLBbar é 8. Em pH ácidos inferiores a 5 não apresenta nenhuma atividade enzimática.

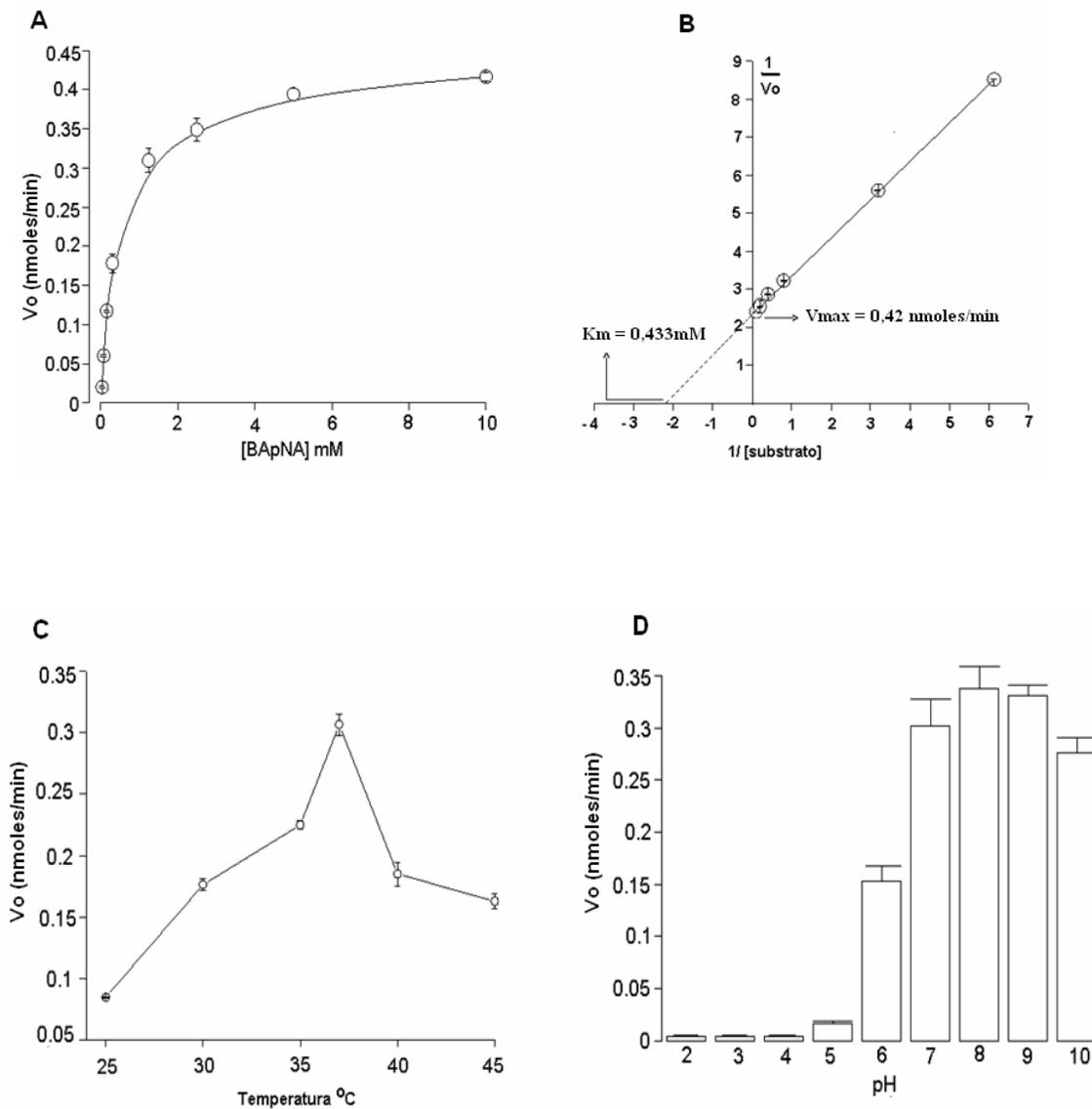


Figura 17. Cinética enzimática da TLBbar sobre o substrato BApNA (n=3). Diferença significativa ($p < 0,05$) **A:** Concentração de substrato **B:** Gráfico de transformação de Lineweaver-Burk para calcular os valores da velocidade máxima da Serinoprotease e seu respectivo K_m . **C:** Efeito da temperatura na atividade proteolítica. **D:** Efeito do pH na atividade proteolítica.

4.4.5 Efeito inibitório sobre a atividade proteolítica

A Figura 18 apresenta a TLBbar sendo avaliado com diferentes inibidores: EDTA (0,5M), EGTA (0,5M), PMSF (0,5mM), inibidor tripsina de soja SBT-1 (5ug/ul), Leupeptina (10mM), e heparina sódica (5000UI/ml). Os resultados observados mostram que os agentes inibidores como PMSF e Leupeptina reduzem a atividade proteolítica da serinoprotease, apresentando atividades residuais de 8,82% e 4,01% respectivamente. Agentes quelantes como EDTA e EGTA apresentam inibição em torno de 50% semelhante a SBT-I. A heparina não apresenta inibição significativa já que sua atividade residual é de 78,87%.

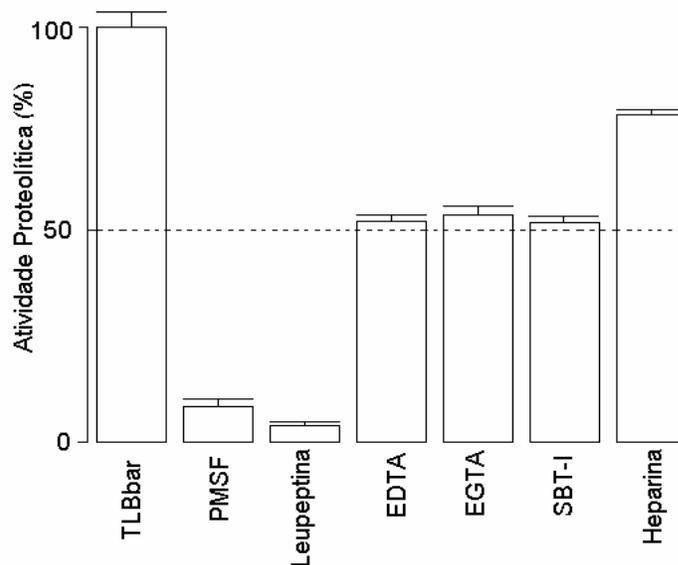


Figura 18. Efeito de inibidores na atividade enzimática da serinoprotease TLBbar utilizando o substrato BApNA. Os resultados são calculados em porcentagem de atividade, tendo como 100% a atividade de TLBbar sem os inibidores.

4.4.6 Efeito de íons sobre a atividade proteolítica

A atividade da serinoprotease TLBbar foi avaliada com soluções de íons divalentes como Ca^{+2} , Mg^{+2} , Ba^{+2} , Zn^{+2} e Cd^{+2} (0,05 M). A Figura 19 mostra que a atividade enzimática foi reduzida frente a os íons Zn^{+2} e Cd^{+2} , em comparação com os outros íons.

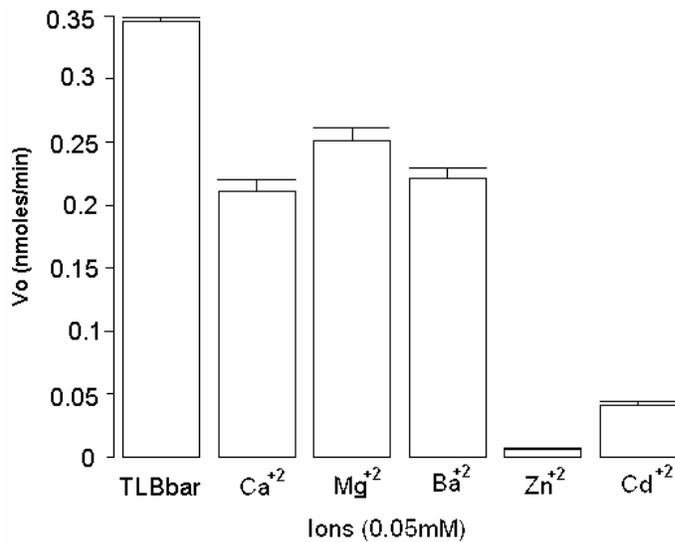


Figura 19. Efeito de íons na atividade enzimática utilizando o substrato BApNA.

4.5 Avaliações Farmacológicas

4.5.1 Atividade Edematogênica.

Foi avaliada a ação inflamatória da serinoprotease TLBbar (in vivo) através da inoculação da toxina via subcutânea na região subplantar em camundongo (pata direita), tendo como controle a inoculação de PBS (pata esquerda). As concentrações utilizadas foram de 5,0; 25; e 50 μ g. Os resultados (Figura 20 A) mostram que a serinoprotease apresenta uma atividade dose e tempo dependente, a máxima inflamação foi apresentada com dose de 50 μ g que corresponde a 43,4% (\pm 2,45) de edema. O aumento da área de inoculação foi medida após 0,5, 1, 3, 6, 9 e 24 horas.

Para efeito de comparação foi avaliada a ação inflamatória do veneno total *Bothrops barnetti* “in vivo”. As concentrações utilizadas foram de 2, 5 e 10 μ g. Os resultados (Figura 19 B) mostram que o veneno tem uma máxima inflamação com dose de 10 μ g que corresponde a 40,01% (\pm 2,20) de edema, observa-se que as doses tem um efeito até as 6 horas após aplicação, seguidamente perdem a atividade inflamatória progressivamente.

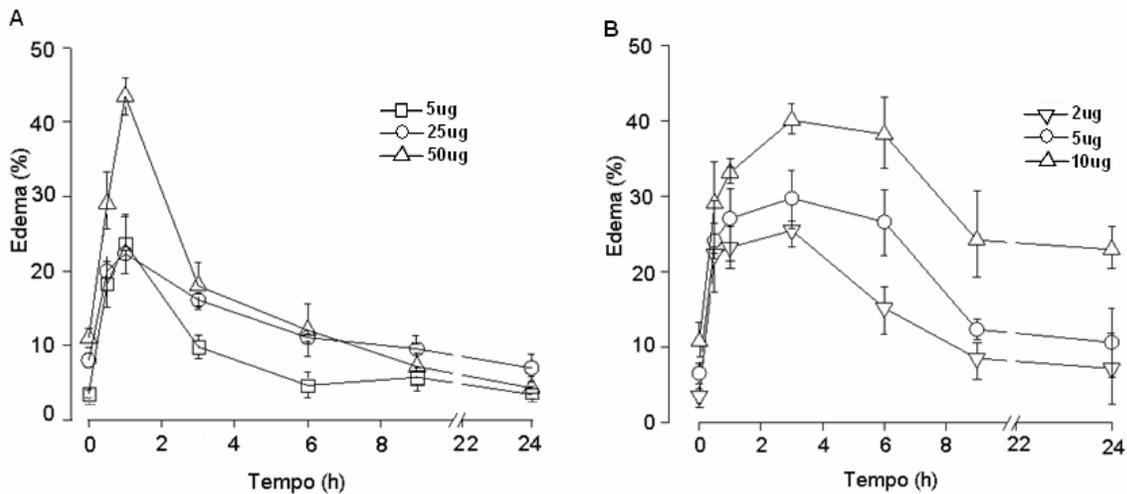


Figura 20. Atividade edematogênica. (n=3) Diferença significativa de ($p < 0,05$). **A:** Avaliação da TLBbar. **B:** Avaliação do veneno total. Os resultados foram calculados em porcentagem de edema em relação com o branco (PBS)

4.5.2 Atividade Miotóxica.

Foram feitas injeções no músculo gastrocnêmio direito de camundongo doses 10, 20 e 50 μ g da serinoprotease TLBbar. Nos intervalos de tempo estabelecidos foram extraídas da veia caudal amostras de sangue para determinar os níveis de CK plasmático. Os resultados (Figura 21A) evidenciam mínima atividade creatina quinase em plasma depois de três horas de injeção com valores acima de 120 U/l com dose de 50 μ g. As avaliações foram medidas nos intervalos de tempo de 1, 3, 6, 9 e 24 horas. As avaliações da atividade miotóxica no veneno total *Bothrops barnetti*, com doses de 5, 10 e 20 μ g (Figura 21B) mostra uma atividade toxica alta de 1414,4 \pm 115,25 U/L com dose de 20ug que se mantem a partir das 3 a 6 horas de inoculação da toxina.

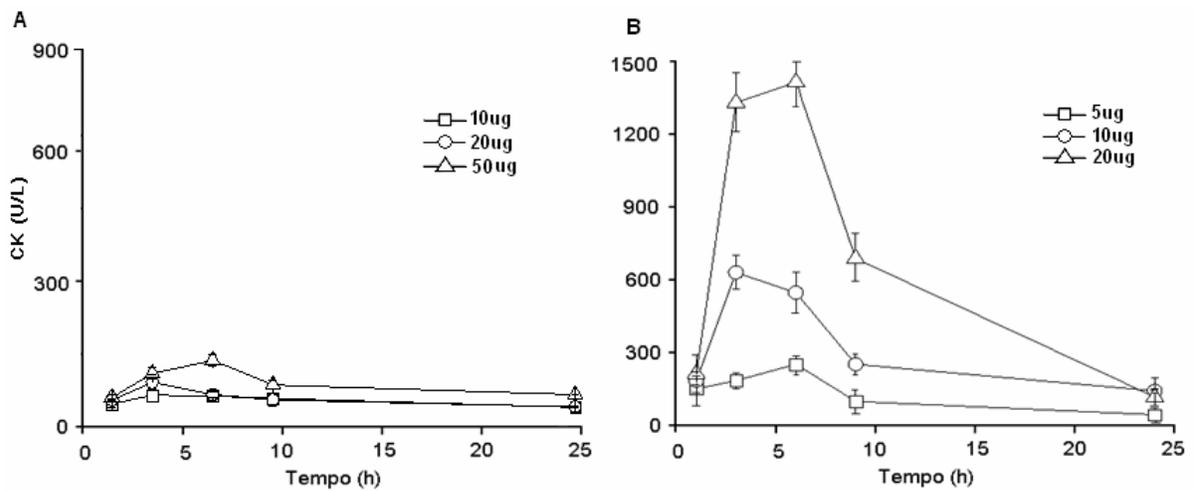


Figura 21. Atividade miotóxica avaliada no gastrocnemius de camundongos (n=3). Diferença significativa de ($p < 0,05$). **A:** serinoprotease TLBbar **B:** Veneno Total.

4.5.3 Atividade hemorrágica.

O gráfico mostra as avaliações da atividade hemorrágica do veneno total de *Bothrops barnetti* em três doses: 40, 50 e 60µg em 100µl de solução, e como controle 100µl de PBS. A dose hemorrágica mínima (DHM) do veneno foi de 34,13µg (Figura 22). A serinoprotease TLBbar não apresentou atividade hemorrágica.

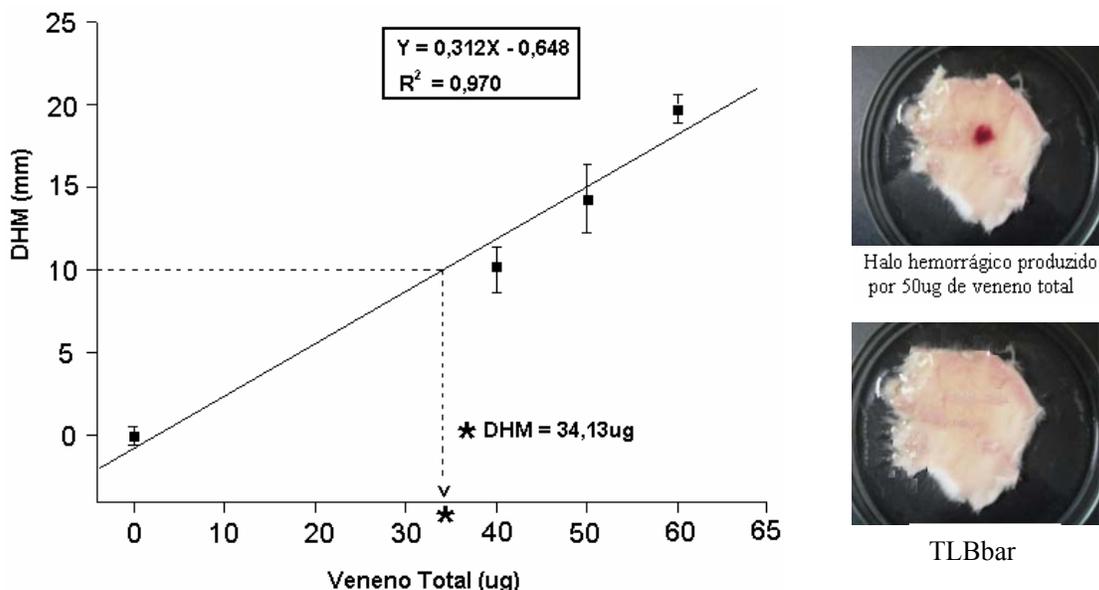


Figura 22. Atividade hemorrágica do veneno total *Bothrops barnetti* avaliada na zona dorsal dos camundongos (n=3). As avaliações foram medidas após duas horas de inoculação da toxina. Diferença significativa de ($p < 0,05$).

4.5.4 Agregação Plaquetária.

As concentrações avaliadas foram preparadas em diluições seriadas de 0,03125; 0,625; 1,25 e 2,5µg. A Figura 23 mostra que TLBbar apresentou alta atividade agregante sobre o plasma sanguíneo a qual foi capaz de induzir agregação plaquetária, atividade similar a trombina que foi usado como controle. A concentração de 0,325 não apresentou efeito agregante, concentrações de 0,625 e 1,25µg apresentam mais de 70% de agregação; concentração de 2,5µg apresenta 90% de agregação tendo o mesmo comportamento que a trombina. Observa-se também, que TLBbar começa sua agregação após três minutos quando comparado com o controle (trombina agrega após 1min). A serinoprotease TLBbar (2,5 µg) foi avaliada em presença do inibidor PMSF, apresentando efeito inibitório na atividade agregante.

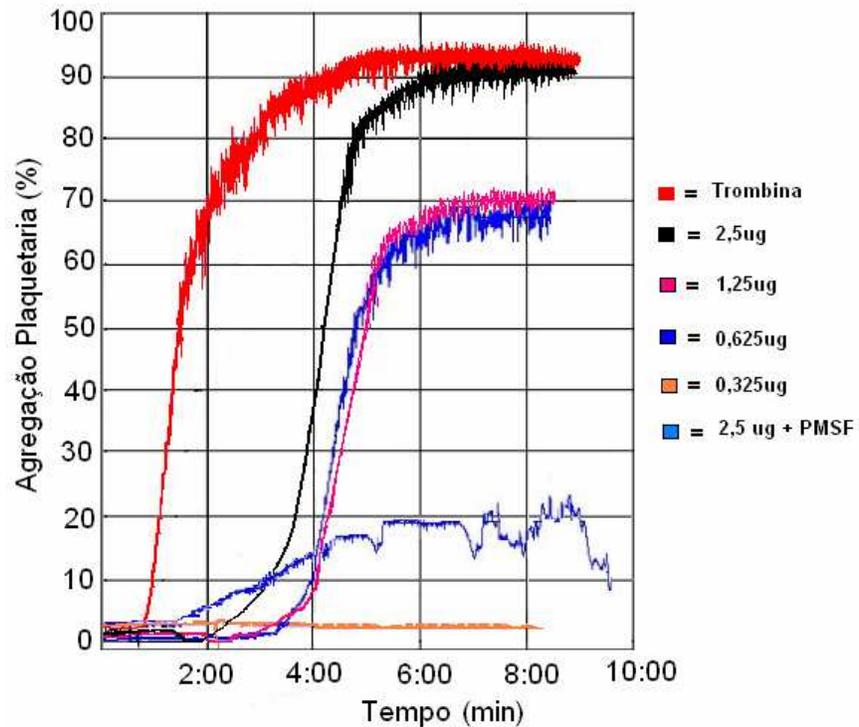


Figura 23. Agregação plaquetária da TLBbar avaliada em plaquetas lavadas do sangue humano em diferentes concentrações. Diferença significativa de ($p < 0,05$).

4.5.5 Atividade coagulante sobre o plasma humano.

TLBbar isolada do veneno *Bothrops barnetti* apresentou atividade coagulante sobre plasma humano. Em diferentes concentrações, foi capaz de induzir à formação de coágulo. A atividade foi confirmada através da resposta dose-dependente realizada para obtenção da dose coagulante mínima que foi determinada em $1,71\mu\text{g}$ (DCM = dose mínima de proteína capaz de coagular o plasma em 60 segundos) (Figura 24).

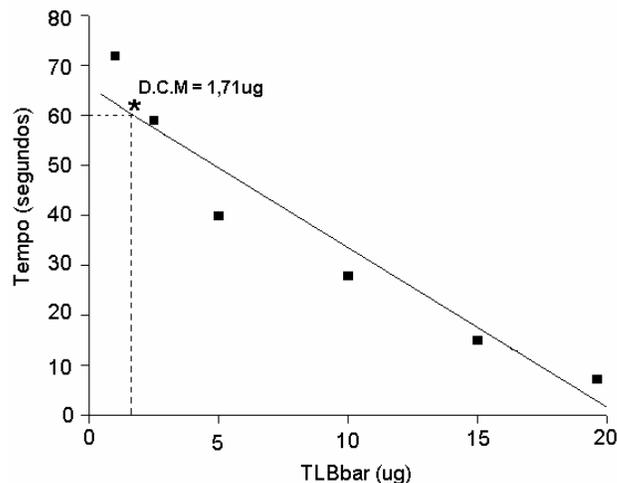


Figura 24. Dose coagulante mínima (DCM) de TLBbar sobre o plasma humano em diferentes concentrações (1, 3, 5, 10, 15 e $20\mu\text{g}$).

4.5.6 Atividade coagulante sobre fibrinogênio bovino

A atividade coagulante foi caracterizada pelo imediato aparecimento da rede de fibrina a partir do fibrinogênio bovino e conseqüentemente a formação do coágulo em diferentes tempos. TLBbar apresentou alta atividade coagulante, formando a rede de fibrina num tempo de 8 segundos. A fração Bbt-Ia (G-75) e o veneno total apresentaram tempo de coagulação de 10 e 31 segundos respectivamente (Figura 25).

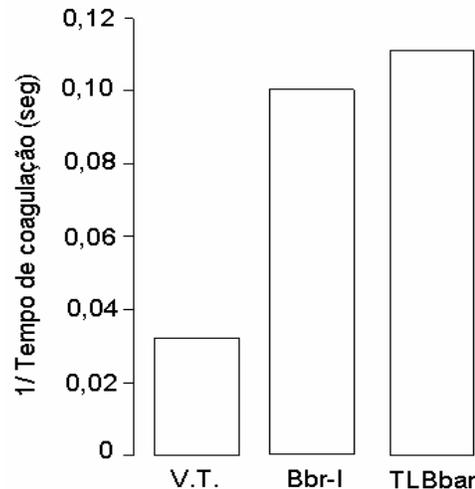


Figura 25. Atividade coagulante sobre o fibrinogênio bovino das amostras: Veneno total (VT), fração do Sephadex G-75 com atividade serinoprotease (Bbt -Ia), Fração purificada no HPLC fase reversa (TLBbar).

4.5.7 Atividade fibrinogenolítica.

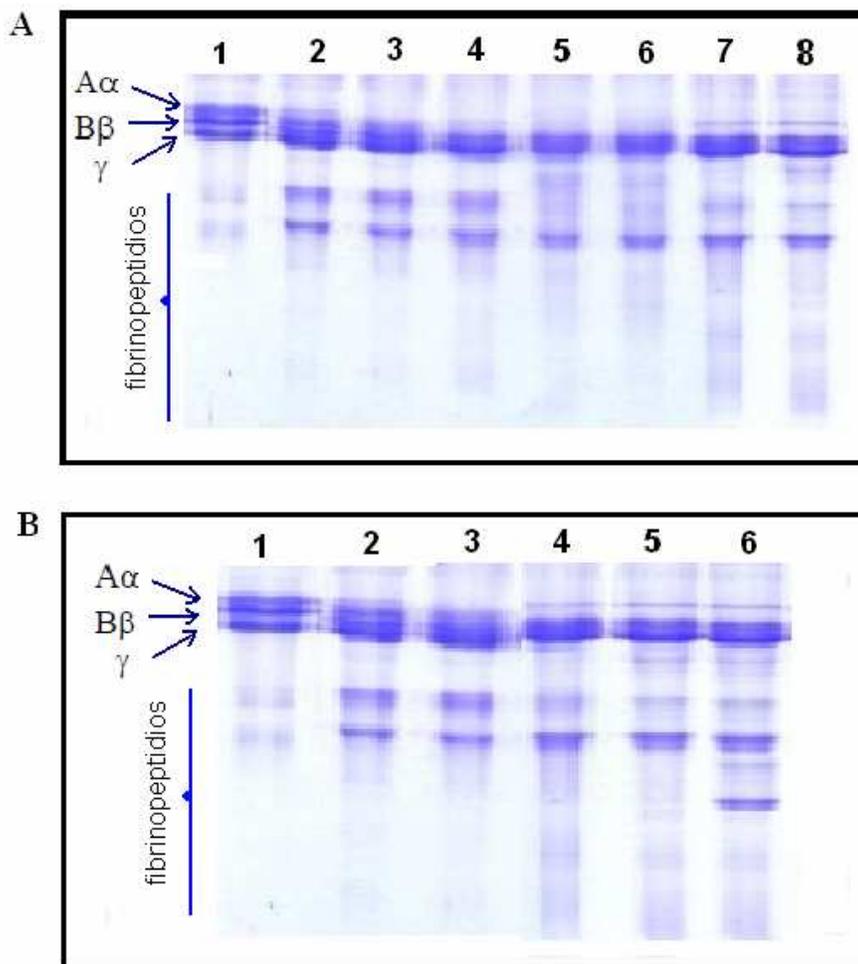
O controle do fibrinogênio (bovino) apresentou três bandas no gel correspondentes as cadeias $A\alpha$, $B\beta$ e γ como esperado (Figura 26 A, pista eletroforética 1). TLBbar apresentou atividade fibrinogenolítica liberando fibrinopeptídios A através da degradação da cadeia $A\alpha$ do fibrinogênio em um tempo de 15min e em 2 horas se observa sua completa degradação. (Figura 26 A, pistas 2-8).

A concentração de 1,25ug (Fig 26 B, pistas 2-6) foi suficiente para começar a clivar a cadeia $A\alpha$ com eficiência, a avaliação da concentração é dose dependente observado na aparição de bandas de massas moleculares relativas menores, que são proporcionais ao aumento da concentração da enzima, sendo os fibrinopeptídeos, produtos da quebra da cadeia do fibrinogênio através da atividade proteolítica.

A atividade fibrinogênica de TLBbar foi avaliada em diferentes temperaturas de incubação, evidenciando que a quebra da cadeia do fibrinogênio é melhor entre 30 e 40°C (Figura 26 C)

A atividade fibrinogênica Do mesmo modo foi avaliado com a presença de diferentes íons divalentes (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Ba^{2+} , Cu^{2+} , Cd^{2+} , Zn^{2+}), os resultados mostram que a atividade proteolítica de TLBbar é aumentada na presença de íons cálcio, magnésio e bário (Figura 26D).

As atividades fibrinogênicas foram submetidas na presença de agentes químicos (Leupeptina, PMSF, EDTA, EGTA e heparina) para avaliação de inibição. Os resultados evidenciam o efeito inibitório característico para serinoprotease dos inibidores Leupeptina e PMSF. (Figura 25E).



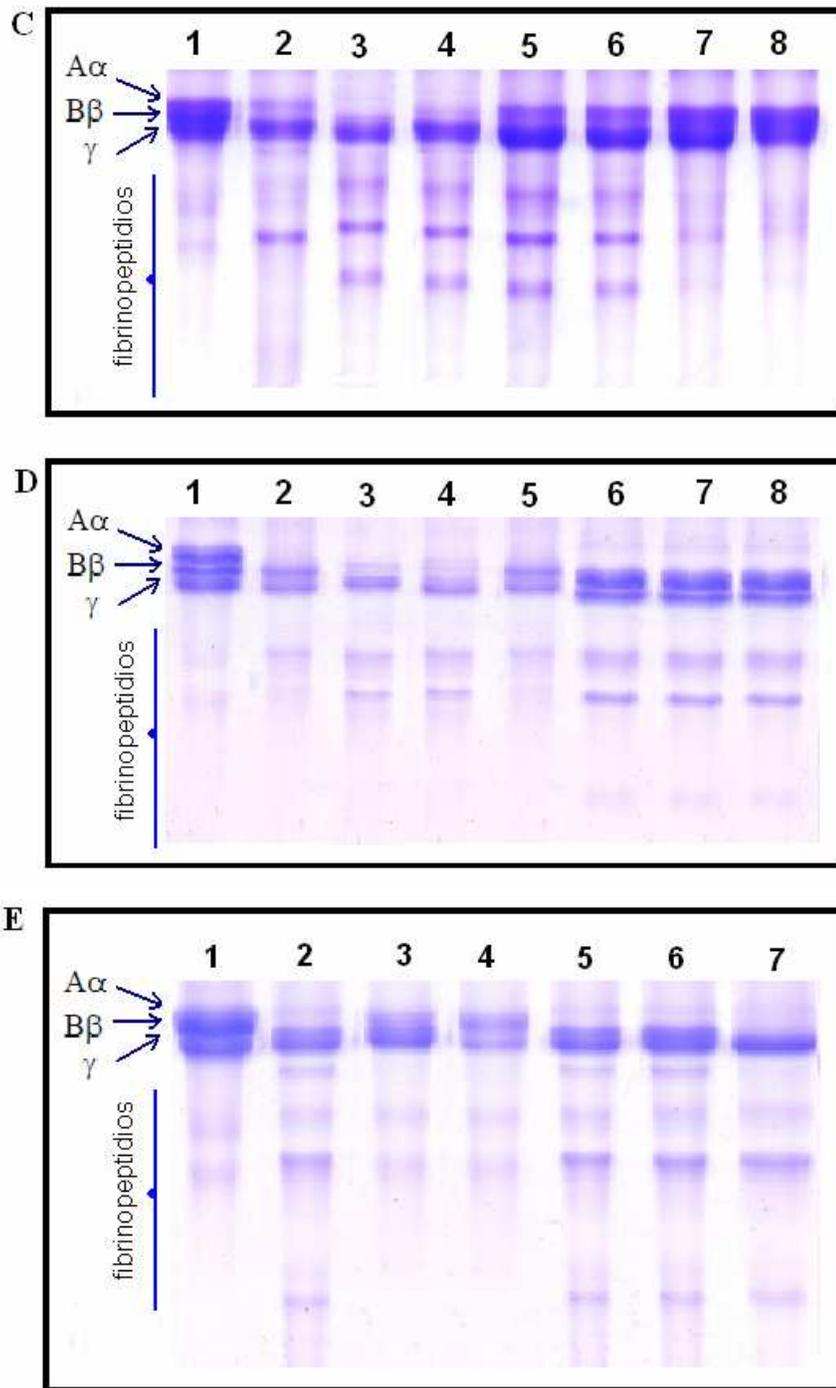


Figura 26. Atividades fibrinogênicas da TLBbar (15µg) **A:** Tempo dependente (1) Controle de fibrinogênio bovino 1,5mg/ml. (2) 15min de incubação (3) 30min de incubação. (4) 60min de incubação. (5) 2 horas de incubação. (6) 4 horas de incubação. (7) 6 horas de incubação. (8) 24 horas de incubação. **B:** Dose dependente (1) Controle de fibrinogênio bovino 1,5mg/ml. (2) 1,25µg de enzima (3) 2,5µg de enzima. (4) 5,0µg de enzima. (5) 10µg de enzima (6) 20µg de enzima. **C:** Temperatura. (1) Controle de fibrinogênio bovino 1,5mg/ml. (2) 20°C (3) 30°C (4) 40°C (5) 50°C (6) 60°C (7) 70°C (8) 80°C **D:** Íons. 1) Controle de fibrinogênio bovino 1,5mg/ml. (2) TLBbar (3) TLBbar com íon calcio (4) TLBbar com íon magnésio (5) TLBbar com íon bário (6) TLBbar com íon zinco (7) TLBbar com íon cobre (8) TLBbar com íon cádmio. **E:** Inibição. (1) Controle de fibrinogênio bovino 1,5mg/ml. (2) TLBbar (3) Leupeptina (4) PMSF (5) EDTA (6) EGTA (7) Heparina.

5. DISCUSSÃO.

O Peru é um país com características climáticas e geográficas muito variadas que contém uma riquíssima diversidade de flora e fauna, porém no percurso do tempo as pesquisas sobre venenos de serpentes têm sido mais abrangentes. Diferentes trabalhos indicam que as espécies do gênero *Bothrops* são as principais agressoras (entre 61% e 88.5%), considerando-se que a espécie *Bothrops atrox* ("jergón") é a mais comum em seu gênero para as zonas de floresta, *Bothrops barnetti* ("macanche") para a costa norte e *Bothrops pictus* ("víbora de costa") para as costas centro e sul. O gênero *Lachesis* resulta ser muito ocasional (1% a 2.32%). No caso do gênero *Crótalus* registrado no departamento de Puno e Madre de Deus, a porcentagem é menor do que 1%. Não tem informações sobre acidentes com espécies da família Elapidae e Hydrophiidae (Bustamante JL, 2007; Rojas, 2005).

Na América do Sul, venenos de serpentes do gênero *Bothrops* vêm sendo estudados devido a sua predominância e importância médica em países como Brasil, Argentina, Colômbia, Equador, Venezuela, Bolívia e Peru, já que as serpentes botrópicas são as responsáveis por 90% dos acidentes ofídicos que acontecem nestes países (Funasa, 2002).

O veneno de serpentes é formado por uma mistura de peptídeos e proteínas (principalmente enzimas), os quais conferem ao veneno as propriedades farmacológicas. As enzimas que se encontram em maior quantidade são as fosfolipases A₂, metaloproteases, hialuronidases e serinoproteases (Kini 2003)

As Serinoproteases de veneno de serpentes (SVSPs) estão entre as enzimas de venenos melhores caracterizadas e afetam o sistema hemostático. Elas atuam sobre vários componentes da cascata de coagulação, atuando nos sistemas fibrinogénicos e fibrinolíticos, calicreína-cininada e agregação plaquetária, causando sobre as células da presa um desequilíbrio no sistema hemostático, atividades semelhantes à trombina, por isso as SVSPs são também chamadas de trombina-like (Serrano, 2005). Estas enzimas pertencem ao grupo S1 da família da tripsina que é a maior família das peptidases (Halfon e Craik, 1998), estão presentes principalmente na família Viperidae, com pouca concorrência nas famílias Crotalidae, Elapidae e Coluibridae.

As SVSPs são enzimas caracterizadas por apresentar um sítio catalítico em comum, nomeada "triada catalítica" que envolve o mecanismo que inclui uma alta reatividade do resíduo Ser 195, que tem um rol importante na formação do complexo acil-enzima, que é estabilizado por histidina 57 e ácido aspártico 102 (Castro, 2004)

O isolamento das SVSPs trombina-like é de grande interesse para a comunidade científica, devido ao desenvolvimento de reagentes diagnósticos, no tratamento de alterações hemostáticas e como agente desfibrinogenante (Marsh; Williams, 2005). Grande parte das enzimas trombina-like já estudadas, são dos venenos de serpentes do gênero *Agkistrodon*, *Trimeresurus*, *Crotalus* e *Bothrops*. O interesse comercial na atualidade é de uso clínico para o tratamento de infarto do miocárdio, trombozes em veias profundas, pancadas ou embolia pulmonar (Markland, 1988).

Devido às diferenças naturais e a biodiversidade das enzimas entre as serpentes de diferentes espécies e origens geográficas, o estudo de novas serinoproteases pode prover conhecimentos relevantes para o entendimento de suas funções para a busca de novas alternativas farmacológicas.

Até o presente momento nenhum estudo abordou a caracterização bioquímica, estrutural ou farmacológica de serinoproteases do veneno de *Bothrops barnetti*. O presente trabalho descreve o isolamento e purificação de uma serinoprotease como atividade trombina-like denominada TLBbar, assim como sua caracterização Físico-química e avaliação farmacológica.

5.1. Isolamento e purificação da serinoprotease do veneno *Bothrops barnetti*

TLBbar foi purificada através da combinação de duas etapas cromatográficas: Cromatografia de exclusão molecular Sephadex G-75 seguida de HPLC de fase reversa (C8), usando bicarbonato de amônia (0,5 M) e acetonitrila (66%), respectivamente como tampões de eluição. Este tampão tem a vantagem de não interferir na atividade enzimática das amostras, além da sua rápida eliminação durante a liofilização, evitando os exaustivos processos de diálise, conferindo rapidez ao processo e mantendo a funcionalidade das proteínas, podendo ser utilizadas em estudos biológicos posteriores.

O perfil cromatográfico de exclusão molecular do veneno total de *Bothrops barnetti* apresenta seis frações (Bbt-I, Bbt-Ia, Bbt-II, Bbt-IIa, Bbt-III, Bbt-IV) (Figura 10). Atividades proteolíticas e coagulantes só foram encontradas na fração Bbt-Ia. HPLC de fase reversa da Bbt-Ia permitiu isolar 13 frações (Figura 11). A fração 11 apresentou alta atividade proteolítica sobre o substrato BApNA ($0,35 \pm 0,07$ nanomoles/min), as outras frações não apresentaram atividade (figura 16 B), além disso, a fração 11 evidenciou alta atividade coagulante com um tempo de coagulação de 8 segundos (tabela 3), as outras frações coagularam após 60 segundos. Portanto, a fração

11 que foi denominada como TLBbar confirmou sua atividade serinoproteases realizando-se a caracterização enzimática e farmacológica.

Os resultados mostram que a combinação da cromatografia de exclusão molecular com HPLC de fase reversa foi eficiente, principalmente esta última que se mostrou bastante efetiva, proporcionando um grande aumento na atividade proteolítica de TLBbar (0,35 nmol/min), quando comparado à atividade proteolítica de veneno total e da fração Bbt-Ia ($0,027 \pm 0,002$ e $0,166 \pm 0,009$ nanomoles/min respectivamente) (Figura 16 A). Além disso, há preservação da seletividade e da capacidade de resolução e um alto grau de pureza evidenciado na repurificação (Figura 14) como também a preservação das atividades enzimática e biológica.

5.2 Avaliações Físico-químicas.

Eletroforese em condições desnaturantes tem sido um método muito utilizado para determinar o grau de pureza e massa molecular aparente das serinoproteases. Tem sido reportado na literatura que estas famílias de enzimas possuem massas moleculares em torno de 25 a 35 kDa (Cavinato 1998). No entanto, foram purificadas serinoproteases com variabilidade de massas entre 23 a 67 kDa como é descrito para flavoridis de 23kDa de *Trimisurus flavoridis* (Shiesh *et al.*, 1988) PABJ de *B jararaca* 30kDa. (Serrano *et al.*, 1995), TVS-PA de *Trimesurus stejneri* 33 kDa (Zhang *et al.*,1995), LV-PA de *Lachesis muta* com 33 kDa (Sanchez *et al.*, 2000). Outras apresentam massas moleculares mais elevadas como cerastocitin 38kDa de *Ceraste cerastes* (Marrakchi *et al.*,1997), CPIE-2 de *Akgistrodon caliginosus* com 44 kDa (Shimokawa e Takahashi 1993), Bothrops protease A de *Bothrops jararaca* descrito com 67kDa (Murayama *et al.*, 2003).

Os resultados de eletroforese em SDS-PAGE (12,5%) evidenciou para TLBbar uma única banda eletroforética restrita com massa molecular relativa de ~28,5 kDa em condições não reduzidas mostrando alto grau de homogeneidade molecular. Sob condições desnaturantes (DTT) evidencia-se a presença de uma única banda com massa relativa de 40,96 kDa (Figura 12 e 13). Assim, pode-se inferir que TLBbar é uma proteína de cadeia polipeptídica única, em condições reduzidas ocorre a redução das pontes dissulfeto intracadeia da TLBbar, fazendo com que a cadeia polipeptídica fique “esticada” deixando de ser globular, diminuindo sua migração eletroforética no gel de poliacrilamida (maior dificuldade de migração através da malha do gel), mostrando um aumento aparente de massa molecular.

TLBbar apresentou 258 resíduos de aminoácidos, compostos por 31Asp/Asn, 20 Glu/Gln, 18Ser, 26Gly, 6His, 12Arg, 14Thr, 13Ala, 23Pro, 7Tyr, 15Val, 5Met, 8Cys, 16Ile, 19Leu, 9Phe, 15Lys. Estes resultados apresentam similaridade com os descritos na literatura como para Serinoprotease TLBm (Vilca-Quispe *et al.*, 2010). O ponto isoelétrico de TLBbar foi registrado em 7,5 segúm esses dados indicam que se trata de uma enzima básica (Tabela 4).

O sequenciamento, via espectrometria de massas modo MS/MS, dos três peptídeos trípticos obtidos a partir da digestão da TLBbar, demonstrou homologia estrutural com outras serinoproteases de veneno de serpentes, como a trombina-like denominada Calobin, isolada e caracterizada a partir de *Agkistrodon caliginosus* (Korean Viper), Crotalase (*Crotalus adamanteus*), flavoxobin (*Trimeresurus flavoviridis*) entre outras (Figura 15). As diferenças moleculares entre a TLBbar e as outras desta família de proteínas poderiam ser atribuídas à magnitude das glicosilações da cadeia polipeptídica. Este fato é possível desde que as enzimas trombina like exibam uma micro heterogeneidade, devido às diferenças em suas cadeias polipeptídicas glicosiladas formadas no processo das modificações pós-traducionais, como é o caso das serpentes *Agkistrodon rhodostoma* (Hatton, 1973; Burkhart, *et al.*, 1992), *Crotalus horridus horridus* (Shu, *et al.*, 1983), *Lachesis muta muta* (Silveira, *et al.*, 1989), *Bothrops jararaca* (Serrano, *et al.*, 1995) e *Bothrops jararacussu* (Zaganelli, *et al.*, 1996). As serinoproteases reportadas na literatura, com as quais foi comparada a TLBbar, apresentam os aminoácidos conservados do sítio catalítico (His57, Asp102, Ser195). A TLBbar apresenta o aminoácido histidina na posição 57 da triada catalítica no segundo peptídeo tríptico. Embora não tenha sido avaliado outros peptídios onde se registre os dois aminoácidos da tríada catalítica (Asp102, Ser195), podemos dizer que os resultados, em conjunto com as atividades enzimáticas e biológicas, confirmam que TLBbar pertence ao grupo de enzimas serinoproteases com atividade trombina-like.

Sabe-se que o comportamento de uma enzima perante seu substrato e as propriedades exibidas por um determinado inibidor estão relacionados, entre outros fatores, à possibilidade de ocorrência de forças de atração entre a molécula do substrato e os átomos que compõem o sítio ativo da enzima. Estas interações podem ser eletrostáticas, ligações de hidrogênio ou mesmo interações hidrofóbicas. A afinidade da enzima pelo substrato então depende dos tipos de interações presentes entre estes.

A nomenclatura geral das posições do sítio de clivagem do substrato pelas enzimas serinoproteases foram formuladas por Schechter e Berger (1967), 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...**). Os aminoácidos da porção C-terminal são enumerados como **P1'**, **P2'**, **P3'**, etc. Já os subsítios 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. Portanto, o aminoácido em **P1** interage principalmente com **S1** (subsítio 1) na enzima, o aminoácido em **P2** interage com **S2**.

O substrato utilizado no trabalho para a caracterização enzimática de TLBbar é o cromogênico BApNA (N-benzoil-D,L-arginil paranitroanilida) o qual apresenta o resíduo de arginina na posição P1, que se liga com a TLBbar na posição S1 que corresponderia provavelmente ao resíduo de Aspartato (102) presente no centro ativo da enzima; esta afinidade de ligação enzima-substrato poderia basear-se quimicamente em interações de ordem eletrostático, já que arginina possui radicais de nitrogênio carregados positivamente que podem interatuar com Aspartato 102, que apresenta cargas negativas, presente na triada catalítica (Figura 26). Além disso, este resíduo polar ácido poderia incrementar a disponibilidade de cargas na nuvem eletrônica disponibilizando o ambiente de clivagem devido à presença de elétrons livres provenientes de seus dois átomos de nitrogênio na extremidade de sua cadeia presente em S1 do centro ativo da serinoprotease, corroborando assim a especificidade destas famílias de enzimas por Arg e Lys em P1 (Perona et al., 1995).

Dessa forma podemos inferir que a interação destes aminoácidos, aspartato e arginina, não só dependem das cargas de suas cadeias laterais pela preferência por Arg em P1, mas também pela sua conformação espacial e tamanho da molécula.

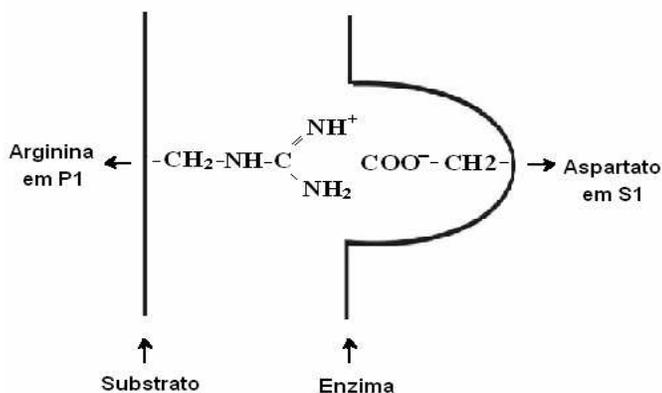


Figura 26. Interação entre Arg situada em P1 e Asp situado em S1. (P1 aminoácido do substrato que interage ativamente com aminoácido presente no sitio ativo da enzima S1)

O estudo cinético tem importância nas enzimas, já que os resultados são indicativos de sua velocidade de hidrólise, afinidade pelo substrato e estabilidade frente a determinados parâmetros como temperatura, íons e pH. Os resultados mostram que TLBbar apresenta maior atividade proteolítica quando comparado com o veneno total ($0,35 \pm 0,17$ e $0,027 \pm 0,012$ nanomoles/min respectivamente) (Figura 16 A). O efeito da concentração de substrato sobre a atividade proteolítica de TLBbar evidencia um comportamento clássico michaeliano (Figura 17A). De maneira similar foi observado para TLBm-I, utilizando o mesmo substrato (Vilca-Quispe et al., 2010)

Os valores de V_{max} e K_m encontrados para TLBbar foram $0,42\text{nmol/min}$ e $0,433\text{mM}$ respectivamente, (Figura 17B) estes valores podem ser comparados com trombinas-like isoladas de *Bothrops atrox* como TLE-1 a qual apresenta um K_m de $0,33\text{mM}$ e TLE-2 com K_m de $0,46\text{mM}$ (Petretski et al., 2000) valores cercanos a TLBbar. *Lachesis muta muta* também apresenta valores de K_m de $0,075\text{mM}$ e V_{max} de $0,36\text{nmol/min}$. (Yarleque et al., 1989) Esses dados foram resultados das atividades cinéticas frente ao mesmo substrato BApNA, onde se observa que a trombina-like de *Laquesis muta muta* tem mais afinidade com o substrato comparado com TLBbar. O valor de V_{max} foi encontrado similar com serinoprotease Ba III-4 de *Bothrops atrox* (Ponce-Soto et al., 2007) que tem V_{max} de $0,41\text{nmol/min}$. As atividades cinéticas de TLBbar são parecidas a outras trombina-like já estudadas.

Atividade proteolítica de TLBbar foi verificada em diferentes valores de temperatura e pH. A atividade ótima ocorre a 37°C e pH de 8 (Figura 17C, D) Embora as atividades proteolíticas observadas apresentem estes valores, TLBbar evidenciou ainda atividade na faixa de 40 a 45°C o que indica a estabilidade da molécula frente ao calor devido à presença de pontes dissulfeto e o enovelamento adequado que dá estabilidade molecular; essa estabilidade também é explicada pela natureza pecilotérmica das serpentes. A variação da temperatura corporal dos répteis afeta muitos processos fisiológicos e de desenvolvimento (Peterson et al., 1993). Moléculas com estruturas rígidas e estáveis que possam manter a sua funcionalidade frente às variações de temperatura do ambiente são necessárias para a sobrevivência das serpentes. TLBbar apresenta estabilidade em pH básicos, no entanto registrou-se ausência de atividade em pH ácidos, o qual evidencia a natureza básica da enzima.

Outros estudos cinéticos efetuados neste trabalho são de inibição e efeito de íons. Inibidores específicos de serinoproteases têm sido utilizados, tais como Leupeptina e polimetilsulfonilfluoride (PMSF) os quais inibem a atividade proteolítica de SVSPs

assim confirmando que estas enzimas pertencem a família das serinoproteases. Leupeptina é um inibidor competitivo, este inibidor compete com o substrato pelo sítio ativo da enzima, sendo deslocado quando o substrato está em excesso, revertendo portanto sua atividade inibitória. (Sant'Ana, 2008). O PMSF tem a capacidade de ligar-se ao resíduo de aminoácido serina do sítio catalítico, provocando uma ligação irreversível e inativando-a. TLBbar apresentou inibição quase totalmente na presença de leupeptina e PMSF, calculando-se atividades residuais de 4,01 e 8,82% respectivamente (Figura 18), confirmando assim que a proteína purificada é uma serinoprotease.

As serinoproteases são geralmente insensíveis a inibidores de tripsina como SBT-I e alfa1-antitripsina. (Castro, 2004). No entanto, o SBT-I em alguns casos mostrou seu efeito inibitório em altas concentrações, tais como ACC-C (Orthner *et al.*, 1988) e Cerastocitin (Marrakchi *et al.*, 1995). A Incubação de TLBbar com SBT-I, apresentou uma atividade residual de 52,51%, indicando que SBT-I estaria tendo um efeito inibitório médio. EDTA e EGTA tiveram efeito inibitório em torno de 50% apresentando atividades residuais de 53,20% 54,81%, respectivamente. No caso da heparina não houve inibição significativa, apresentando uma atividade residual de 78,87%. Estes resultados são semelhantes a serinoproteases descritos como Ceractocytin de *Cerastes cerastes* com inibição negativa para heparina e positiva para SBT-I (Dekhil *et al.*, 2003) e Batroxombin de *Bothrops atrox* que também mostra inibição negativa para heparina e SBT-I (Serrano, 2005).

A TLBbar na presença de alguns íons bivalentes como cálcio, magnésio e bário (0,05M) apresenta uma leve diminuição da atividade proteolítica sobre o BApNA, entretanto os íons zinco e cádmio diminuem essa atividade (Figura 19) Com base nestes resultados pode-se sugerir que, já que a ligação do substrato ao sítio catalítico é favorecida por interação eletrostática, ocorrendo entre os grupos carregados em P1 e S1, os cátions presentes no meio provavelmente competem com o substrato pela carga negativa do Asp presente em S1, desfavorecendo a ligação enzima-substrato, e conseqüentemente diminuindo a atividade enzimática.

O aumento da força iônica, causado pelo aumento da concentração de sais em solução, leva a uma diminuição da atração entre íons de carga oposta e, conseqüentemente, desfavorece a interação entre a Arg em P1 e o Asp em S1. Tal fato também pode explicar a atividade inibidora destes íons sobre a TLBbar. A força iônica de uma solução depende da concentração molar de cada íon, mas também da carga destes íons. Quanto maior a carga do íon maior será seu efeito na força iônica.

Os íons cálcio, magnésio e bário têm comportamento similar pelo fato de encontrar-se em um mesmo grupo químico, tendo similares características como raio iônico, eletro negatividade, entre outros. Os cátions como zinco e cádmio tem um raio iônico menor ($0,74 \text{ \AA}$) que os elementos do grupo alcalinos terrosos (magnésio, cálcio, bário ($0,86; 0,99; 1,34 \text{ \AA}$ respectivamente)), se sugere que eles podem se mobilizar mais rapidamente para competir pelas cargas negativas do aminoácido Aspartato, diminuindo em grande medida a ligação enzima-substrato. Além disso, esta variabilidade poderia ser provocada por alguma mudança conformacional devido à interação destes cátions com outra região da enzima que não seja o centro ativo, mas que altere a estrutura do sitio de catálise, interferindo na interação enzima-substrato.

5.3 Avaliações Farmacológicas.

O envenenamento botrópico pode ser classificado segundo a presença das manifestações locais ou sistêmicas. Entre as manifestações locais estão a mionecrose, hemorragia, inflamação e entre as sistêmicas, hemorragia, alterações na coagulação, na função plaquetária e do fibrinogênio (Hati *et al.*, 1999). Estes efeitos podem ser causados por miotoxinas, desintegrinas, peptídeos vasoativos e enzimas, tais como fosfolipases A_2 , metaloproteases, hialuronidases, serinoproteases entre outros.

Neste trabalho foram avaliadas as atividades edematogênica, miotóxica, hemorrágica, agregação plaquetária e fibrinogolíticas de TLBbar comparada em alguns casos com o veneto total, com efeito de mostrar a contribuição dessas atividades em relação da TLBbar isolada do veneno.

O edema é o acúmulo anormal de líquido no compartimento extra-celular intersticial ou nas cavidades corporais devido ao aumento da pressão hidrostática, aumento da permeabilidade vascular (inflamações) e diminuição da drenagem linfática, sendo uma das principais manifestações de um processo inflamatório. A inflamação é causada por diversas frações do veneno botrópico, por exemplo, aminas biogênicas, pré-formadas do tipo histamina, PLA_2 , esterases, proteases, enzimas liberadoras de cininas e lectinas (Teixeira *et al.*, 2003).

A contribuição de TLBbar ao efeito edematogênico do veneno total pode ser considerado irrelevante, uma vez que foram necessários $50\mu\text{g}$ de proteína para induzir $43,3\% \pm 2,45$ de edema, já o veneno total induz a mesma magnitude de edema com uma concentração 5 vezes menor de proteína ($10\mu\text{g}$) (Figuras 20 A, B). A serinoprotease não causa edema nem lesão celular evidenciado em estes resultados, o efeito edemaogênico

do veneno total deve-se a presença de outros componentes de proetases ou fosfolipases (Landucci *et al.*, 2000)

A miotoxicidade é definida como a habilidade das toxinas para induzir necrose na musculatura esquelética *in vivo*, a partir de injeção intramuscular ou, *in vitro*, através da incubação com músculos esqueléticos diferenciados (Gutierrez e Ownby, 2003; Lomonte *et al.*, 2003) e é evidenciada pela capacidade de aumentar os níveis plasmáticos de CK após a injeção intramuscular ou intravenosa. A mionecrose induzida por esses venenos tem dois mecanismos fundamentais: (1) ação direta de toxinas, denominadas miotoxinas, sobre as células musculares, originando lesão e (2) isquemia que se desencadeia no tecido como consequência do sangramento, compressão tissular e outras alterações inflamatórias, que também contribuem para a mionecrose (Gutiérrez *et al.*, 2008).

TLBbar não induz miotoxicidade local já que os valores de atividade CK plasmático foram similares ao controle ($126,98 \pm 11,87$ U/l, 6 horas após aplicação). Por outro lado, o veneno total aumentou consideravelmente a atividade CK até atingir valores máximos de $1414,4 \pm 115,25$ U/l (Figuras 21 A, B). Estes resultados demonstram ausência de atividade miotóxica de TLBbar.

O intenso efeito tóxico sobre as fibras musculares induzido pelo veneno total é provavelmente devido aos outros componentes miotóxicos como as PLA₂ (Ponce-Soto *et al.*, 2007) e metaloproteases (Torres-Huaco *et al.*, 2010). Por outro lado, não pode ser descartado um possível efeito sinérgico destes componentes do veneno, já que estes estudos foram feitos com toxinas isoladas, restaria, portanto realizar avaliações de possíveis efeitos potencializadores das atividades farmacológicas devido a associações destes principais componentes do veneno botrópico (Gutiérrez *et al.*, 2002).

A atividade hemorrágica do veneno é causada principalmente por toxinas denominadas hemorraginas, que são enzimas proteolíticas do tipo metaloprotease, sendo sua atividade enzimática dependente da presença de um átomo de zinco no seu sítio ativo (Bjarnason e Fox, 1994). As hemorraginas podem romper a integridade do endotélio vascular e tem atividade desintegrina, além de serem potentes inibidoras da agregação plaquetária. Já foram descritos e estudados os efeitos hemorrágicos de várias metaloproteases de espécies botrópicas, como é caso da BaP1, toxina hemorrágica isolada de veneno de *Bothrops asper* (Rucavado *et al.*, 1995), BjussuMP-I, isolada de veneno de *Bothrops jararacussu* (Mazzi *et al.*, 2004), a jararagina, isolada de *Bothrops jararaca* (Kamiguiti *et al.*, 1994), entre outras.

O veneno total de *Bothrops barnetti* induz atividade hemorrágica alcançando uma dose hemorrágica mínima (DHM) de 34,13 µg (Figura 22), fato que indica a presença de um ou mais fatores hemorrágicos no veneno. Entretanto, TLBbar não induz atividade hemorrágica ainda que em concentrações elevadas, devendo esta atividade ser atribuída a possíveis enzimas metaloproteases comumente presentes nos venenos botrópicos (Torres-Huaco *et al.*, 2010).

Agregação plaquetária consiste na formação de pontes intracelulares entre proteínas solúveis (principalmente fibrinogênio e fator VIII) e glicoproteínas insolúveis GP-Ib e GP-IIIa presente nas membranas plasmáticas. Esse processo é desencadeado quando a concentração de fibras expostas de colágeno é muito alta ou quando há presença de agonistas, tais como ADP, ácido araquidônico, trombina, serotonina e epinefrina (Weiss e Lages, 1997).

As plaquetas aderentes sofrem um processo de ativação (mudança conformacional) durante o qual ocorre liberação do conteúdo de seus grânulos ADP, Ca²⁺, ATP, serotonina, FvW e fator plaquetário IV. O receptor de trombina está acoplado à proteína G e ativado por protease sendo expresso na membrana plasmática das plaquetas, células endoteliais vasculares, células musculares lisas e fibroblastos. A ativação do receptor de trombina envolve a clivagem proteolítica de um domínio extracelular do receptor pela trombina. O novo ligante fixado ao NH₂-terminal liga-se intramolecularmente a um sítio distinto dentro do receptor e desencadeia a sinalização intracelular. A ativação do receptor de trombina resulta em ativação das fosfolipases mediada pela proteína G.

Existem descritos de serinoproteases trombina-like com atividade de agregação plaquetária tais como Bothrombin de *B. jararaca* (Nishida *et al.*, 1994) Cerastocitin de *Cerastes cerastes* (Marrakchi *et al.*, 1995) PA-BJ de *B. jararaca* (Serrano *et al.*, 1995) entre outras. Os resultados mostram que TLBbar tem capacidade de agregar plaquetas e em concentração de 2,5 µg exibe um comportamento semelhante à trombina, atingindo 90% de agregação (Figura 23) pelo que se infere que a TLBbar ativa o receptor da trombina da plaqueta para sua ativação via proteína G. A causa da agregação plaquetária por TLBbar foi corroborada com inibição de PMSF, inibidor específico das serinoproteases que, causou efeito inibitório da atividade agregante na concentração de 2,5µg. Interessantemente TLBbar assim como estimula a agregação, também atrasa o tempo da atividade de agregação, quando comparado com o controle (trombina).

TLBbar começa agregar entre o terceiro e quarto minuto, já a trombina agrega no transcurso do primeiro minuto.

A interpretação do gráfico tem sido avaliada seguindo os traços da curva (Warell *et al.*, 2004). As duas primeiras partes do gráfico antes da agregação correspondem a uma leve diminuição devido à diluição com o agente de agregação (neste caso a trombina), seguidamente de um estado transitório devido ao inchaço inicial de plaquetas pela mudança conformacional que sofrem para ser ativadas. Baseados nestes resultados pode-se sugerir que TLBbar ativa as plaquetas em um tempo mais prolongado que a trombina o que indicaria que, a variação estrutural na superfície da membrana pela liberação de agentes como ADP e tromboxanos A_2 são processos que se desenvolvem com maior lentidão para alcançar a adesão plaquetaria alcançada rapidamente quando é utilizada trombina.

O índice de coagulação (*CI*) foi definido por Cavinato (1998), através da fórmula: $CI = t^{-1} \times 1000$: donde t^{-1} = inverso do tempo. O *CI* de TLBbar é de 125, valor alto quando comparado com TLBm de *Bothrops marajoensis* (Vilca-Quispe, 2010) com *CI* de 55,5. Do mesmo modo foi registrada para TLBbar a dose coagulante mínima (DCM) de 1,71 μ g (Figura 24). As serinoproteases bothrombin de *B. jararaca* e batroxobin de *Bothrops moojeni* apresentam atividade coagulante sobre o fibrinogênio (Serrano, 2005) de maneira similar TLBbar induz coagulação do fibrinogênio em 9 segundos, já o veneno total de *Bothrops barnetti* coagula em 31 segundos (Figura 25).

Com base nestes resultados é evidente que não se trata apenas de uma enzima com ação proteolítica sobre o fibrinogênio, por isso denominada trombina-like, mas também de uma enzima com capacidade de coagular o plasma, sugerindo que TLBbar poderia estar agindo não somente sobre o fibrinogênio, mas também sobre outros fatores da cascata de coagulação, apresentando atividade pró-coagulante.

No fibrinogênio a cadeia $A\alpha$ é clivada na ligação peptídica Arg16-Gly17, por isto as serinoproteases de veneno de serpentes permitem a liberação de fibrinopeptídios A (Serrano, 2005). Ancrod de *Calloselasma rhodostoma* libera fibrinopeptídios A e B das cadeias $A\alpha$ e $B\beta$ do fibrinogênio (Burkhart *et al.*, 1992), Batroxobin (*Bothrops atrox moojeni*) libera fibrinopeptídios A da cadeia $A\alpha$ e mais lentamente fibrinopeptídios B da cadeia $B\beta$ (Itoh *et al.*, 1987).

TLBbar degrada a cadeia A α liberando o fibrinopeptídeo A, cuja atividade é tempo e dose dependente (Figura 26 A, B), a semelhança de Bothrombin (*B. jararaca*) (Nishida *et al.*, 1994) e Flavoxobin (*Trimeresurus flavoviridis*) (Shieh *et al.*, 1988). A degradação do fibrinogênio foi evidenciada pela clivagem da cadeia A α com 15 μ g da enzima, sendo degradada com máxima eficiência aos 15 minutos de incubação, e com duas horas houve completa degradação, corroborada também pela liberação de fibrinopeptídeos. TLBbar é classificada como uma enzima fibrinogênolítica da classe A (Venombin A). Avaliações com temperatura mostram que a quebra da cadeia alfa do fibrinogênio é maior a temperaturas de 30 a 40°C (Figura 26 C).

A serinoprotease TLBbar foi previamente incubada com diferentes íons e inibidores, sendo verificada posteriormente sua capacidade proteolítica sobre o fibrinogênio. Na presença de íons cálcio, magnésio e bário se evidencia uma alta atividade fibrinogênolítica (Figura 26 D), principalmente com cálcio. Este efeito confirma que TLBbar têm atividades trombina-like já que na presença de cálcio o fator Va da cascata de coagulação cliva o fibrinogênio em fibrina para posteriormente formar o coágulo sanguíneo. Já os íons cobre, cádmio e zinco não interferem na degradação, possivelmente porque estes íons não estão presentes na cascata de coagulação.

A trombina-like TSV-PA do veneno de *Trimeresurus stejnegeri* (Zhang *et al* 1995), foi previamente tratada com inibidores para enzimas da classe serinoproteases, como o PMSF, SBTI, EDTA, Hirudin, Heparina e Leupeptina; sendo posteriormente testada sua capacidade proteolítica sobre o fibrinogênio. TSV-PA teve sua atividade completamente inibida pelos inibidores PMSF e Leupeptina. Quando tratada com EDTA (agente quelante) não apresentou nenhuma modificação em sua atividade indicando, portanto, que TSV-PA seja uma serinoprotease e não uma metaloprotease, já que essas enzimas são zinco-dependentes. Do mesmo modo não houve alteração da atividade proteolítica da TLBbar com SBTI nem heparina.

Leupeptina e PMSF inibiram a atividade fibrinogênolítica de TLBbar (Figura 26 E) confirmando que o seu sítio catalítico é o responsável pela sua atividade proteolítica, e a leupeptina compete com o substrato pelo sítio catalítico da enzima, evidenciando uma inibição competitiva. Os inibidores EDTA, EGTA e heparina não apresentam inibição de forma semelhante a TSV-PA como foi reportado por Serrano (2005).

Outra atividade farmacológica descrita para as SVSPs é a atividade fibrinolítica, como é apresentada pela rhinocerase isolada de *Bitis gabonica rhinoceros* (Vaiyapuri, 2010). TLBbar por sua vez, dissolveu completamente o coágulo do plasma após

incubação de 36 horas. A incapacidade de TLBbar de dissolver o coágulo quando incubada com PMSF sugere que TLBbar precisa da atividade proteolítica para degradar à fibrina.(Figura não mostrada)

Através de suas características bioquímicas e farmacológicas podemos dizer que TLBbar é uma nova serinoprotease com atividade trombina-like isolada do veneno de *Bothrops barnetti*. Está formada por uma única cadeia polipeptídica com 258 resíduos de aminoácidos, possui uma massa molecular relativa de ~28 kDa e apresenta atividades proteolíticas, fibrinolítica e agregação plaquetária, afetando principalmente o sistema hemostático da presa ou do ser humano.

CONCLUSÕES.

A metodologia utilizada no processo de purificação de TLBbar a partir do veneno *Bothrops barnetti*, demonstrou ser rápida e eficiente conservando as suas atividades biológicas.

TLBbar é uma serinoprotease com massa molecular relativa de ~28,5 kDa conformada por 258 resíduos de aminoácidos e um ponto isoelétrico de 7,5. Apresenta homologia sequencial com outras serinoproteases como Crotalase, Flavoxobin, entre outros. A histidina conserva sua posição específica (57) da tríada catalítica e a cisteína é bem conservada para a formação de pontes dissulfeto própria deste tipo de proteases.

TLBbar demonstrou maior atividade proteolítica a temperatura de 37°C e em pH de 8, evidencia atividade proteolítica sobre BApNA, sendo inibida por PMSF (inibidor irreversível) e Leupeptina (inibidor competitivo reversível) inibidores específicos de serinoproteases. Sua atividade foi diminuída principalmente na presença de íons bivalentes como cálcio, magnésio, bário, zinco, e cádmio pela competição de cargas positivas com o substrato pelas cargas negativas do aspartato presente na região catalítica da enzima, desfavorecendo a ligação enzima-substrato, e conseqüentemente diminuindo a atividade enzimática.

Com respeito às atividades farmacológicas podemos dizer que a TLBbar induz agregação plaquetária, de forma similar à trombina, atingindo um 90% de agregação com 2,5µg de enzima. Apresenta também atividade pró-coagulante sobre plasma humano. Sua atividade fibrinólítica foi evidenciada pela liberação de fibrinopeptídeos A (FPA) da cadeia α do fibrinogênio, atividade que foi inibida por PMSF e Leupeptina, a presença de cálcio acelerou a quebra do fibrinogênio. Por outro lado se sugere que TLBbar apresenta atividade fibrinolítica ao dissolver o coágulo de fibrina gerado pela trombina. TLBbar é uma serinoprotease não tóxica, já que tem ausência de atividades hemorrágica, edematogênica e miotóxica quando analisadas separadamente.

Serinoprotease TLBbar com atividade trombina-like apresenta atividade pro-coagulante sobre plasma humano, evidenciado na dose coagulante mínima (DCM) de 31,14µg assim mesmo foi evidenciado alta coagulabilidade (8 segundos) sobre fibrinogênio bovino. No entanto, provavelmente esta proteína não ativa o fator estabilizador da rede de fibrina, o fator XIII, porque produz um coágulo semi-rígido.

A TLBbar pode ser considerada uma nova serinoprotease trombina-like, com potencial clínico, já que não apresenta efeitos tóxicos (miotoxicidade, edema, hemorragia), pelo contrário, evidencia um potente efeito pró-coagulante e agregante plaquetário.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

- Agudelo Y. (2005). Actualización en accidente ofídico. En: Medicina que aprende para enseñar y enseña para aprender. Memorias 5º curso de actualización en conocimientos médicos generales. ANIR. Medellín: 255-266.
- Amaral A. (1980). In. Serpentes do Brasil: iconografia colorida. Editora da Universidade de São Paulo.
- Ariens RAS., Lai TS., Wesiel JW., Greenberg CS., Grant PJ. (2002). Role of factor XIII in fibrin clot formation and effectson genetic polymorphisms. *Blood*; 100:743-754
- Barraviera B. & Pereira PCM. (1994). Acidentes por serpentes do gênero *Bothrops*. In: Barraviera B. Venenos animais. (1. Ed) EPUC, Rio de Janeiro, Brasil.
- Bjarnason JB., Barish A., Direnzo GS., Cambell R., Fox JW. (1983). Kallikrein-like enzyme from *Crotulus atrox* venom, *J. Biol. Chem*; 238: 12566 - 12573.
- Boon GD. (1993). An overview of hemostasis. *Toxicol. Pathol.* V; 21(2):170-179.
- Bortoleto RK., Murakami MT., WatanabeL., Soares AM., Arni RK. (2002). Purification characterization andcrystallization oj Jararacussin-I, a fibrinogen-clotting anzyme isolated from the venom of *Bothrops jararacussu*. *Toxicon*; 40:1307-1312.
- Braud S., Bon C., Wisner A. (2000). Snake venom acting on hemostasis. *Biochimie. v.* 82:851-859.
- Burkhart W., Smith G.F., Su J.L., Parikh I., LeVine H. (1992). 3rd. Amino acid sequence determination of ancrod, the thrombin-like alpha-fibrinogenase from the venom of *Akistrodon rhodostoma*. *FEBS Lett.* 297, 297–301.
- Bustamante JL., Flores V. (2007). Informe Final de la Consulta Técnica sobre Accidentes con Animales Ponzosñosos en Latino América. São Paulo, Brasil, Panaftosa, 55p.
- Campbell JA., Lamar W. (2004). *The Venomous Reptiles of Latin America*. Cornell University Press, Ithaca, NY, p. 425.
- Cardoso JLC., França FOS., Fan HW., Málaque CS., Haddad Jr. (2003) V. In: Sarvier. Introdução ao Ofidismo. São Paulo: Ed. Sanvier, 3. Animais Peçonhentos no Brasil - Biologia, Clínica e Terapêutica dos Acidentes. São Paulo. Ed. Sarvier.
- Carrillo de Espinoza N., Icochea J. (1995) Lista taxonomica preliminar de los reptiles vivientes del Perú. *Publicaciones del Museo de Historia Natural de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (A)* 49: 1-27.

- Castrillón-Estrada DF. (2007). Envenenamiento ofídico snake poisoning. Salud Uninorte. Barranquilla (Col.); 23 (1): 96 -111
- Castro HC., Silva DM., Craik C., Zingali RB. (2001). Estructural features of a snake venom thrombin-like enzyme: thrombin and trypsin on a single catalytic platform Biochim Biophys Acta, v; 1547:183-195
- Castro HC., RB. Zingali MG., Albuquerque M., Pujol-Luza and CR. Rodrigues. (2004). Snake venom thrombin-like enzymes: from reptilase to now CMLS Cellular and Molecular Life Sciences. CMLS, Cell. Mol. Life Sci. 61 :843–856
- Cavinato RA., Remold H., Kipnis TL. (1998). Purification and variability in thrombin-like activity of *Bothrops atrox* venom from different geographic regions. Toxicon; 36(2): 257-267
- Costa Oliveira J. (2010). Caracterização funcional e estrutural de novas proteases isoladas de peçonha de *Bothrops alternatus* e do látex de *Euphorbia milii*. var *hislopii*. Universidade Federal de Uberlândia. Inst. de genética e bioquímica.
- Dekhil, H., Wisner, A., Marrakchi, N., El Ayeb, M., Bon, C., Karoui, H., (2003). Molecular cloning and expression of a functional snake venom serine proteinase, with platelet aggregating activity, from the *Cerastes cerastes* viper. Biochemistry 42, 10609–10618.
- Deshimaru M., Ogawa T., Nakasjima K., Nobuhisa I., Chijiwa T., Shimohigashi Y., Fukumaki Y., Niwa M., Yamashina I., Hattori S., Ohno M., (1996). Accelerated evolution of crotalinae snake venom gland serine proteases. FEBS Lett. 397, 83–88.
- Drake TA., Morrissey JH & Edgington TS. (1989). Selective cellular expression of tissue factor in human tissues: implications for disorders of hemostasis and thrombosis. Am J Pathol 134: 1087-1097.
- Edgar W., Prentice CRM. (1973). The proteolytic action of ancrod on human fibrinogen and its polypeptide chains. Thromb. Res. v. 2:85-95.
- 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.
- Fenton II JW., Ofosu FA., Brezniak DV., Hassouna HI. (1998). Thrombin and antithrombotics, Semin. Thromb. Hemost. 24: 87-91.
- Ferreira SH. (2000). Angiotensin Converting Enzyme: History and Relevance. Sem. Perinatology. v. 24 (1):7-10.

- Franco RF. (2001). Fisiologia da coagulação, anticoagulação e fibrinólise. Medicina. Ribeirão Preto. 34: 229-237
- Funassa Fundação Nacional de Saúde. (2002). Acidentes por animais peçonhentos e sistemas nacionais de informação. Brasília: Funassa, Ministério da Saúde.
- Garfin SR., Castilonia RR., Mubarak SJ., Hargens AR., Akeson WH., Russel FE. (1985). The effect of antivenin on intramuscular pressure elevations induced by rattlesnake venom. *Toxicon*; 23: 677 - 80.
- Gutiérrez J. (2002). Comprendiendo los venenos de serpientes: 50 años de investigaciones en América Latina. *Rev. biol. Trop*; 50 :377-394.
- Gutiérrez JM., Ponce-Soto LA., Marangoni S., Lomonte B. (2008). Systemic and local myotoxicity induced by snake venom group II Phospholipases A₂: Comparison between crotoxin, crotoxin B and a Lys49 PLA₂ homologue. *Toxicon* 51: 80-92.
- Gutiérrez JM., 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 310-23.
- Gutiérrez JM., Ownby CL. (2003). Skeletal muscle degeneration induced by venom phospholipases A₂: insights into the mechanisms of local and systemic myotoxicity. *Toxicon*; 42(8): 915-31.
- Gutiérrez JM., Rucavado A. (2000). Snake venom metalloproteinases: their role in the pathogenesis of local tissue damage. *Biochimie*; 82: 841-850.
- Hahn BS., Yang KY., Park EM., Chang M., Kim YS. (1996). Purification and molecular cloning of Calobin, a thrombin-like enzyme from *Agkistrodon caliginosus* (Korean Viper). *J. Biochem* 119, 835–843.
- Halfon S., Craik CS., (1998). In: Barrett AJ., Rawlings ND., Woessner JF. (Eds.) Introduction: serine peptidases and their clans *Handbook of Proteolytic Enzymes*. Academic Press, London, pp. 3–4.
- Hati R., Mitra P., Sarker S., Bhattacharyya KK. (1999). Snake venom hemorrhaginsm *Crit. Rev. Toxicon*; 29:1-19.
- Hatton MWC. (1973) Studies on the coagulant enzyme from *Agkistrodon rhodostoma* venom. Isolation and some properties of the enzyme. *Biochemical Journal*. Vol.
- Heinrikson RL., Meredith SC. (1984). Amino acid analysis by reverse phase high-performance liquid chromatography: precolumn derivatization with

- phenylthiocyanate. *Analytical Biochemistry* 13: p.65-72. Edman, P., Begg, G., (1967). A protein sequenator. *Eur J Biochem.* 1: 80-91.
- Hong Tan N. (2010). Isolation and characterization of the thrombin-like enzyme from *Cryptelytrops purpureomaculatus* venom. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C* 151:131–136
- Huang K., Zhao W., Gao Y., Wei W., Teng M. and Niu L. (2011) Structure of saxthrombin, a thrombin-like enzyme from *Gloydius saxatilis*. *Acta Cryst.* F67, 862-865
- Incio-Ruiz R., Incio-Ruiz L., Zavaleta Martínez-Vargas A., Salas-Arruz M., Gutierrez JM. (1993). Toxicidad y neutralización de venenos ofídicos peruanos de los géneros *Bothrops* y *Lachesis* (Serpentes: Viperidae). *Rev. Biol. Trop*; 41:351–357.
- 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.
- Kamiguiti AS., Slupsky JR., Zuzel M., Hay CR. (1994). Properties of fibrinogen cleaved by Jararhagin, a metalloproteinase from the venom of *Bothrops jararaca*. *Throm Haemos*; 72: 244-9.
- Kawasaki T., Fujimura Y., Usami Y., Suzuki M., Miura S., Sakuri Y., Makita K., Taniuchi Y., Hirano K., Titani K. (1996). Complete amino acid sequence and identification of the platelet glycoprotein Ibbinding site of Jararaca GPIb-BP, a snake venom protein isolated from *Bothrops jararaca*. *J Biol Chem.* 271, 10635–10639.
- Kini RM. (2003). Excitement ahead: structure, function and mechanism of snake venom phospholipase A₂ enzymes. *Toxicon*; 42: 827- 40.
- Kini RM. (2005a) Serine proteases affecting blood coagulation and fibrinolysis from snake venoms. *Pathophysiol Haemost Thromb*; 34:200 -4.
- Koh DCI. Armugan A., Jeyaseelan K. (2006) Snake venom components and their applications in biomedicine. *Cell. Mol. Life. Sci*, v.63, p.3030-3041,
- Kornalic F. (1985). The influence of snake venom enzymes on blood coagulation *Pharmacology and Therapeutics*, V; 29, p 353-405,
- Kornalic F. (1990). The influence of snake venom enzymes on blood coagulation *Pharmacology and Therapeutics*, V; 29:353-405.

- Laemmli U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-85.
- Landucci EC., de Castro RC., Toyama M., Giglio JR, Maramgoni S., De Nucci G., Antunes E. (2000). Inflammatory edema induced by the lys-49 phospholipase A(2) homologue piratoxin-i in the rat and rabbit. Effect of polyanions and p-bromophenacyl bromide. *Biochem Pharmacol*; 59: 1289 - 94
- Lee WH., Du XY., Lu QM., Clemetson KJ., Zhang Y. (2003). Stejnulxin, a novel snake C-type lectin-like protein from *Trimeresurus stejnegeri* venom is a potent platelet agonist acting specifically via GPVI. *Thromb. Haemost*; 90:662-671.
- Lomonte B., Angulo Y., Calderón L. (2003). An overview of Lysine-49 phospholipase A2 myotoxins from crotalid snake venoms and their structural determinants of myotoxic action. *Toxicon*; 42: 885-901.
- Lomonte B., Tarkowski A., Hanson LA. (1993). Host response to *Bothrops asper* snake venom. Analysis of edema formation, inflammatory cells, and cytokine release in a mouse model. *Inflammation*; 17: 93 – 105
- Markland JR, FS. (1998). Snake venoms and the hemostatic system. *Toxicon*. V; 36:1749-1800
- Marrakchi N., Barbouche R., Guermazi S., Karoui H., Bon C., El Ayeb M. (1997). Cerastotin, a serine protease from *Cerastes cerastes* venom, with platelet-aggregating and agglutinating properties. *Eur. J. Biochem.* 247, 121–128.
- Marrakchi N., Zingali RB., Karoui H., Bom C., Ayeb M. (1995). Cerastocytin, a new thrombin-like platelet activator from the venom of the Tunisian viper *Cerastes cerastes*. *Biochim Biophys Acta*, V;1244:147-156.
- Marsh N., Williams V. (2005). Practical applications of snake venom toxins in haemostasis. *Toxicon*. In press. p. 1-11
- Matsui T., Fujimura Y., Titani K. (2000). Snake venom proteases affecting hemostasis and thrombosis. *Biochimic. Biophysica Acta*, 1477: 146 – 156.
- Mazzi MV., Marcussi S., Carlos GB., Stábeli RG., Franco JJ., Tieli FK., Cintra AC., França SC., Soares AM., Sampaio SV. (2004). A new hemorrhagic metalloprotease from *Bothrops jararacussu* snake venom: isolation and biochemical characterization. *Toxicon* 44(2):215-23
- Miyagui C. (2007). clonagem de serino proteases do veneno da cascavel *crotalus durissus terrificus* e expressão da gioxina em célula de mamífero. Instituto de pesquisas energéticas e nucleares autarquia associada à universidade de São Paulo

- Moreira L., Gutierrez JM., Borkow G., Ovadia M. (1994). Pathological changes induced by BaH1, a hemorrhagic proteinase isolated from *Bothrops asper* (Terciopelo) snake venom, on mouse capillary blood vessels. *Toxicon* ; 32: 976 -87.
- Murayama N., Saguchi K., Mentele R., Assakura MT., Ohi H., Fujita Y., Camargo AC., Higuchi S., Serrano SM. (2003). The unusual high molecular mass of *Bothrops* protease A, atrypsin-like serine peptidase from the venom of *Bothrops jararaca*, is due to its high carbohydrate content. *Biochim. Biophys. Acta* 1652, 1–6.
- Narayanan S., Hamasaki N. (1998). Current concepts of coagulation and fibrinolysis. *Adv. Clin. Chem.* V; 33:133- 68,
- Nikai T., Ohara A., Komori Y., Fox JW., Sugihara H. (1995). Primary structure of a coagulant enzyme, bilineobin, from *Agkistrodon bilineatus* venom, *Arch. Biochem. Biophys.* 318: 89-96.
- Nishida S., Fujimura Y., Miura S., Ozaki Y., Suzuki M., Titani K. (1994). Purification and characterization of bothrombin, a fibrinogen-clotting serineprotease from the venom of *Bothrops jararaca*. *Biochemistry*, v.33, p.1843-1849,
- Orthner CL., Bhattacharya P., Strickland DK. (1988). Characterization of a protein C activator from the venom of *Agkistrodon contortrix contortrix*. *Biochemistry* 27, 2558–2564.
- Otero R., Mesa MB. (2001). Mordeduras graves por serpientes. En: Quevedo, A.,
- Ouyang C., Teng C M., Huyang TF. (1987). Characterization of snake venom principles affecting blood coagulation and platelet aggregation. *Asian Pacific J.Ptiarm.* 2:169-179.
- Perona JJ., Hedstrom L., Rutter WJ., Fletterick, RJ. (1995). Structural origins of substrate discrimination in trypsin and chymotrypsin. *Biochemistry* V; 34:1489-1499.
- Peterson CR., Gibson RA., Dorcas ME. (1993) Snake thermal ecology: the causes and consequences of body temperature variation. In: Seigel RA, Collins JT (eds) *Snakes: ecology and behavior*. The Blackburn, Caldwell, pp 241–314.
- Petretski JH., Kanashiro M., Silva CP., Alves EW., Kipnis TL. (2000). Two related thrombin-like enzymes present in *Bothrops atrox* venom. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 33, 1293–1300.
- 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. *Thromb. Haemost* 65, 444–450.
- Ponce-Soto LA., Bonfim VL., Novello JC., Navarro Oviedo R., Yarlequé Chocas A., Marangoni S. (2007). Isolation and characterization of a serine protease, Ba III-4, from Peruvian *Bothrops atrox* venom. *Protein J.S*; 26(6):387-94.
- Radomski M., Moncada S. (1983). An improved method for washing of human-platelets with prostacyclin. *Thrombosis Research*. 383-389.
- Rawlings ND., Barrett A.(1993). Perspectives in biochemistre and biophysics families and clans of serino peptidases. Department of biochemistry strangeways laboratory.
- Rocha e Silva M., Beraldo WT., Rosenfeld G.(1949). Bradykinin, a hypotensive and smooth muscle stimulating factor released from plasma globulin by snake venoms and by trypsin. *Am J Physiol.*;156(2):261-73.
- Rodrigues VM., Soares AM., Guerra-sa R., Rodrigues V., Fontes MRM., Giglio JR (2000). Structural and functional characterization of neuwiedase, a nonhemorrhagic fibrinolytic metalloprotease from *Bothrops neuwiedi* snake venom. *Arch. Biochem. Biophys.* v. 381:213-224.
- Rojas E., Quesada L., Arce V., Lomonte B., Rojas G., Gutiérrez JM. (2005). Neutralization of four Peruvian *Bothrops* sp Snake venoms by polyvalent antivenoms produced in Peru and Costa Rica: preclinical assessment. *Acta Tropica* 93: 85-95.
- Rucavado A., Lomonte V., Obadia M., Gutierrez JM. (1995). Local tissue damage induced by BaP1, a metalloproteinase isolated *Bothrops asper* (Terciopelo) snake venom. *Exp Mol Patho*; 63: 186-99.
- Sanchez EF., Santos CI., Magalhães A., Diniz, CR., Figueiredo, S., Gilroy, J., Richardson, M. (2000). Isolation of a proteinase with plasminogenactivating activity from *Lachesis muta muta* (bushmaster) snake venom. *Arch Biochem Biophys*, V; 378:131-141.

- Sant'Ana CD., Tieli F K., Oliveira L L., Giglio JR., Rechia CGV., Fuly AL., Selistre de Araújo HS., Franco JJ., Stabeli RG., Soares AM., Sampaio SV. (2008). BjuusuSP-I: A new thrombin-like enzyme isolated from *Bothrops jararacussu* snake veno. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A* 151 :443-454
- Schechter I., Berger A. (1967). On the size of the active site in proteases.I.Papain. *Biochem Biophys Res Commun*, V; 27:157-162.
- Selistre de Araújo HS. (2007). Atividade hemorrágica de toxinas, in: Selistre de Araújo HS., Ferreira de Sousa DH. Métodos em toxinologia: Toxinas de serpientes. Edusfscar. São Carlos. Brasil. PP 45 – 51.
- Serrano SMT., Maroun RC. (2005). Snake venom serine proteinases: sequence homology vs. substrate specificity, a paradox to be solved. *Toxicon*. In press, p.1-18
- Serrano SMT., Mentele R., Sampaio CAM., 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*, v. 34, p.7186-7193, 1995.
- Shieh TC., Kawabata S., Kihara H., Ohno M., Iwanaga S. (1988). Amino acid sequence of a coagulant enzyme, flavoxobin, from *Trimeresurus flavoviridis* venom. *J. Biochem. (Tokyo)* 103: 596 – 605.
- Shimokawa K., Takahashi H. (1993b). Some properties of a capillary permeability-increasing enzyme-2 from the venom of *Agkistrodon caliginosus* (Kankoku-Mamushi). *Toxicon* 31,
- Shu YY., Moran JB., Green CR. (1983) A thrombin-like enzyme from rattlesnake venom. *Biochimica et Biophysica Acta*. Vol. 748, p.236-244.
- Silveira AMV., Magalhaes A., Diniz CR., Oliveira EB (1989). Purification and properties of the thrombin-like enzyme from the venom of *Lachesis muta muta*. *Int. J. Biochem.* 21, 863–871.
- Stocker KF. (1990). Composition of snake venoms. In: Stocker KW, ed. *Medical use of snake venom proteins*. Boca Raton, Fla.: CRC Pres., pp. 33-56.
- Teixeira CFP., Landucci ECT., Antunes E., Chacur M., Cury Y. (2003) Inflammatory effects of snake venom myotoxic phospholipases A₂. *Toxicon*; 42: 947-62.
- Thomazini-santos IA., Barraviera SRCS., Mendes-giannini MJS., Barraviera B. (2001). Surgical adhesives. *j. venom. anim. toxins*. V7; 2:159-171,

- Torres-Huaco FD., Ponce-Soto LA., Martins-de-Souza D., Marangoni S. (2010) Purification and characterization of a new weak hemorrhagic metalloproteinase BmHF-1 from *Bothrops marajoensis* snake venom. *Protein J.* 29(6):407-16.
- Tu AT. (1996) Overview of snake venom chemistry. *Adv Exp Med Biol*; 391:37-62.
- Vaiyapuri S., Harrison RA., Bicknell AB., Gibbins JM., Hutchinson G. (2010). Purification and functional characterisation of rhinocerase, a novel serine protease from the venom of *Bitis gabonica* rhinoceros. *PLoS One.* 12;5(3):e9687
- Verstraete M., Vermeylen JJ. (1989). *Trombose* p. 1-45,
- Vilca-Quispe A., Ponce-Soto LA., Flavia Vischi Winck ., 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
- Voet Donald., Voet Judith., Pratt Charlotte W. (2002) *Fundamentos de Bioquímica.*
- Warrell DA. (2004). Snakebites in Central and South America: epidemiology, clinical features, and clinical management. In: Campbell JA, Lamar WW, eds. *The venomous reptiles of the western hemisphere. Vol 2.* New York: Cornell University Press, pp. 709-62.
- Weiss H., Lages B. (1997). Platelet prothrombinase activity and intracellular calcium responses in patients with storage pool deficiency, glycoprotein IIb-IIIa deficiency, or impaired platelet coagulant activity--a comparison with Scott syndrome. *Blood*; 89(5):1599-1611.
- Xiuxia L., Jiashu C., Yingna Z., Pengxin Q., Guangmei Y. (2002). Purification and biochemical characterization of factor II(a), a fibrinolytic enzyme from *Agkistrodon acutus* venom. *Toxicon*; 39: 1133-1139.
- Yarleque A., Campos S., Escobar E., Lazo F., Sanchez N., Hyslop S., Marsh NA., Butterworth PJ., Price RG.(1989) Isolation and characterization of a fibrinogen-clotting enzyme from venom of the snake, *Lachesis muta muta* (Peruvian bushmaster). Facultad de Ciencias Biologicas, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Peru. *Toxicon*; 27(11):1189-97.
- Zaganelli GL., Zaganelli MGM., Magalhaes A., Diniz CR., De Lima EM. (1996). Purification and characterization of a fibrinogen-clotting enzyme from the venom of Jaracucu (*Bothrops jararacussu*). *Toxicon*, 34: 807-819.

- Zavaleta A., Salas M. (1996). Ofidismo: envenenamiento por mordedura de serpientes. In: Martínez-Villaverde, J.R., León-Barúa, R., Vidal-Neira, L., Losno-García, R. (Eds.) Emergencias en Medicina Interna. Lima, Perú: 241– 260.
- Zhang Y., Wisner A., Xiong Y., Bon C. (1995). A novel plasminogen activator from snake venom: purification and characterization, and molecular cloning. *J. Biol. Chem*; 270 : 10246-10255.



UNICAMP



CEUA/Unicamp

Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA/Unicamp

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 2313-1, sobre "Avaliação das atividades farmacológicas de uma serinoprotease, isolada a partir do veneno total de Bothrops barneti", sob a responsabilidade de Prof. Dr. Sergio Marangoni / Magaly Alejandra Brousett Minaya, 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 13 de junho de 2011.

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº 2313-1, entitled "_____", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - Unicamp) on June 13, 2011.

Campinas, 13 de junho de 2011.

Profa. Dra. Ana Maria A. Guaraldo
Presidente

Fátima Alonso
Secretária Executiva