

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO SUDOESTE DA BAHIA – UESB PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

MANUELA ANDRADE SANTOS

Purificação e avaliação da interferência de BthMP (uma metaloprotease da peçonha de Bothrops moojeni) na coagulação sanguínea

Jequié - BA Março/2016

MANUELA ANDRADE SANTOS

Purificação e avaliação da interferência de BthMP (uma metaloprotease da peçonha de Bothrops moojeni) na coagulação sanguínea

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestra em Química.

Área de concentração: Química de Produtos Naturais.

ORIENTADOR: Dr. Mário Sérgio Rocha Gomes CO-ORIENTADORA: Dra. Luzia A. Pando

> Jequié - BA Março/2016

	Santos, Manuela Andrade.
S236	Purificação e avaliação da interferência de BthMP (uma metoloprotease da peçonha de Bothrops moojeni) na coagulação sanguínea/Manuela Andrade Santos Jequié, UESB, 2016.
	61 f: il.; 30cm. (Anexos)
	Dissertação de Mestrado (Pós-graduação em Química)- Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, 2015. Orientador: Profº. Drº. Mário Sérgio Rocha Gomes.
	 Metaloprotease BthMP proveniente da peçonha da serpente Bothorps moojeni – Purificação e avaliação da interferência 2. Cascata de coagulaçãos 3. Peçonha de serpente I. Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia II. Título.
	CDD – 543



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO SUDOESTE DA BAHIA – UESB Recredenciada pelo Decreto Estadual Nº 9.996, de 02.05.2006 Programa de Pós-Graduação em Química

Manuela Andrade Santos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Química.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 02/03/2016.

Comissão Examinadora:

today

\$érgio Rocha Gomes (UFU, Uberlândia-MG, 2013) Pro Dr Mário (Orientador)

Luzia Aparecida Pando (UNICAMP, Campinas-SP, 2001) Profa. Dra. (Coorientadora)

Prof. Dr. Danilo Avelar Sampaio Ferreira (USP, Ribeirão Preto-SP, 2015)

Prof. Dr. Daniel de Melo Silva (UFAL, Maceió-AL, 2010)



Dedico não somente este trabalho, mas toda a minha vida, tudo o que tenho e todos os meus títulos, a minha grande razão de viver, meu Senhor Jesus Cristo. Tudo é do Pai!

Agradecimentos

- Ao grande autor da minha fé, o Soberano Deus, por sua misericórdia, amor e pela graça do Senhor Jesus Cristo. Louvado seja o Senhor Jesus Cristo!
- Ao meu orientador Mário Sérgio, que é um verdadeiro presente de Deus. Não tenho palavras para agradecer as inúmeras orientações, toda paciência e compreensão e, por confiar no meu trabalho.
- À minha co-orientadora Luzia pela disponibilidade e ajuda, sem a qual não seria possível concretizar este trabalho.
- > À banca pela disponibilidade, atenção e contribuições valiosas.
- À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de mestrado e pelo apoio financeiro para a realização desta pesquisa.
- Ao Programa de Pós-Graduação em Química da UESB (PPGQUI-UESB) por me proporcionar esta oportunidade impar de desfrutar do ensino de profissionais de excelência da química.
- Aos educadores da PPGQUI que tanto contribuíram para a minha formação profissional.
- Ao Laboratório de Bioquímica da UESB pela disponibilidade do espaço e dos instrumentos para a concretização deste estudo.
- Ao laboratório de Química Analítica da UESB pelas colaborações nas análises dos espectros.
- À Prof. Dr^a Veridiana de Melo Rodrigues (LQPPN/UFU) e a Prof^a Dr^a Marina
 S. Castro (LT/UnB), pelas valiosas colaborações na realização dos experimentos.
- À minha mãe Maria Borges pelo amor incondicional e por sempre acreditar que eu poderia ir além.
- > A toda minha família pela compreensão, aconchego, ajuda e orações.
- À minha prima, irmã, amiga e mãe, Maria Reis, por ter se encarregado destas quatro funções desde o meu nascimento até os dias atuais.
- A todos meus irmãos em Cristo da Igreja Família de Deus pela comunhão que tanto me alegra, e aos meus pastores Ivan Luis e Neide Moura pelas orações, pelos sábios conselhos e pelos abraços acolhedores.

- À minha amiga de todos os momentos, Maxsandra Mirandra, como é bom saber que não existe distância, falta de tempo e cansaço suficiente para impedir nossa amizade.
- As amizades que me foram inseparáveis, prazerosas e colaboradoras na concretização deste sonho, Jeferson Barreto, Nubia Novaes, Juliana Pereira, Mirela Santos e Joseli Santana.
- A todos os colegas do mestrado pelas trocas de conhecimento e pelos risos fáceis.

Muito obrigada!

"Quando abro a porta de uma nova descoberta já encontro Deus lá dentro" Albert Einstein

Lista de Figuras

CAPÍTULO 1	INTERFERÊNCIA DAS METALOPROTEASES DE PEÇONHA
	DE SERPENTES NO SISTEMA HEMOSTÁTICO

Figura 1. Esquema do processo de coagulação sanguínea e fibrinólise	17
---	----

- Figura 2. Estrutura do fibrinogênio......18

- Figura 5. Exemplar de serpente do gênero *Bothrops moojeni* e as principais regiões brasileiras onde *B. moojeni* são comumente encontradas......21
- Figura 6. Organização estrutural das classes de SVMPs e suas subclasses após modificações pós-traducionais, proposta por Fox & Serrano (2008)......23
- Figura 7. Representação do domínio metaloprotease das SVMPs......24

CAPÍTULO 2 PURIFICAÇÃO E AVALIAÇÃO DA INTERFERÊNCIA DA *BthMP* (UMA METALOPROTEASES DA PEÇONHA DE *Bothrops moojeni*) NA COAGULAÇÃO SANGUÍNEA

- Figura 1. Sistema de cromatografia de troca iônica, realizada no Laboratório de Bioquímica da UESB......42
- Figura 2. Representação gráfica da cromatografia de troca iônica DEAE-Sepharose com peçonha da serpente *Bothrops moojeni*......43
- **Figura 4.** Cromatografia de exclusão molecular de MD2 usando resina Sephadex G-75 e SDS-PAGE (14%) das frações cromatográficas (*em pools*)......45
- Figura 5. Curva de calibração usada para determinar a quantidade de *BthMP* isolada......45
- Figura 6. Perfil da cromatografia líquida de alta eficiência da *BthMP*......46

Figura 8. Perfil do espectro de massa dos fragmentos obtidos pela digestão da BthMP em tripsina
Figura 9. Perfil do espectro gerado pela análise do peptídeo 1594.793Da em MALDI-TOF utilizando a técnica de <i>Peptide Mass Fingerprinting</i> (PMF)49
Figura 10. Alinhamento da sequência peptídica proveniente do pico 1594.831Da da <i>BthMP</i> com SVMPs da classe PI49
Figura 11. Efeitos da <i>BthMP</i> sobre a azocaseína, com e sem inibidores enzimáticos
Figura 12. Perfil da digestão do fibrinogênio bovino em SDS-PAGE a 14%52
Figura 13. Dosagem do fibrinogênio plasmático utilizando a peçonha bruta de <i>Bothrops moojeni</i> e <i>BthMP</i> 53
Figura 14. Determinação do TP (Tempo de Trombina) e do TTPa (Tempo de Tromboplastina Parcial ativada) da <i>BthMP</i> 54
Figura 15. Representação simplificada do estudo da <i>BthMP</i> 54

Lista de Abreviaturas e Siglas

ADAMs	A Disintegrin And Metalloproteinase.
AMBIC	Bicarbonato de amônio.
BM	Membrana basal.
BSA	Bovine serum albumine.
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal.
Da	Dalton.
DBPA	Diretrizes Brasileira de Práticas para a utilização de
	Animais.
EDTA	Ácido etilenodiamino tetracético.
FPA	Fibrinopeptídeo A.
FPB	Fibrinopeptídeo B.
HPLC	High performance liquid chromatography.
MALDI-TOF	Matrix Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Fligth.
NCBI	National Center for Biotechnology Information.
PL	Fosfolipideo.
PMF	Peptide Fragment Fingerprint.
PMSF	Fluoreto de fenilmetilsulfonila.
SDS	Sodium dodecyl sulfate.
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS.
SVMP	Metaloproteases de peçonha de serpentes (Snake Venom
	Metaloproteinase).
TEMED	N,N,N`,N`-tetrametiletileno-diamino.
ТР	Tempo de protrombina.
Tris	Hidroximetil-aminometano.
TTPa	Tempo de Trombina Parcial ativada.
U	Unidade de absorvância.

Sumário

CAPÍTULO 1	INTERFERÊNCIA DAS METALOPROTEASES DE PEÇO DE SERPENTES NO SISTEMA HEMOSTÁTICO	NHA
APRESENTAG	ÇÃO	14
1.1 HEMOSTA 1.1.1 Agre 1.1.2 Coág	ASIA gação Plaquetária julo de Fibrina	15 15 16
1.2 PEÇONHA 1.2.1 Meta 1.2.2 Meca	A DE SERPENTES aloproteases: Estrutura e Classificação anismo de Ação das SVMPs	20 22 25
REFERÊNCIA	S BIBLIOGRÁFICAS	27
CAPÍTULO 2	PURIFICAÇÃO E AVALIAÇÃO DA INTERFERÊNCIA DA <i>Bth</i> (UMA METALOPROTEASE DA PEÇONHA DE <i>Bothrops moo</i> NA COAGULAÇÃO SANGUÍNEA	ıMP jeni)
RESUMO		32
2.1 MATERIAI 2.1.1 Mate 2.1.2 Anim 2.1.3 Frac 2.1.4 Dete 2.1.5 Eletr SDS) 2.1.6 Dete Prote 2.1.7 Ativio 2.1.8 Ativio 2.1.9 Dete 2.1.10 Qua 2.1.11 Ana	S E MÉTODOS eriais nais ionamento Cromatográfico da Peçonha rminação Quantitativa de Proteínas oforese em Gel de Poliacrilamida com Agentes Desnaturantes (F) erminação da Massa Molecular por MALDI-TOF MS e Identificaç ease por Bioinformática dade Proteolítica sobre o Fibrinogênio dade Proteolítica sobre a Azocaseína rminação dos Parâmetros de Coagulação (TP e TTPa) antificação do Fibrinogênio Plasmático álise Estatística dos Resultados	34 34 35 PAGE- 35 ão da 36 36 36 36 37 37 38
2.2RESULTAI 2.2.1 Purif 2.2.2 Cara 2.2.3 Cara 2.2.4 Ativio 2.2.5 Tem	DOS E DISCUSSÃO icação da <i>BthMP</i> icterização Estrutural da <i>BthMP</i> icterizações Enzimáticas da <i>BthMP</i> dade Fibrinogenolítica po de Protrombina (TP) e de Tromboplastina Parcial ativada (TTF	39 41 46 49 50 Pa).53
REFERÊNCIA	S BIBLIOGRÁFICAS	56

Capítulo I

Interferência das metaloproteases de peçonha de serpentes no sistema hemostático

Apresentação

O capítulo a seguir tem por finalidade mostrar que as metaloproteases provenientes da peçonha de serpentes possuem ação enzimática sobre componentes da hemostasia. O seu desenvolvimento acontece da seguinte maneira: em um primeiro momento, apresenta sucintamente o sistema hemostático e algumas etapas envolvidas neste complexo sistema. Posteriormente, discorre sobre serpentes peçonhentas, especificamente do gênero *Bothrops*, pois estas são as principais responsáveis pelos casos de envenenamentos no Brasil e constitui o foco do nosso estudo. Grande parte da peçonha desta espécie é composta por uma diversidade de proteínas com ação enzimática e não enzimática. E ainda, o final deste capítulo se incumbe de falar especialmente sobre as metaloproteases, visto que são responsáveis por induzirem uma série de efeitos fisiopatológicos locais e sistêmicos durante o envenenamento, abordando desta forma sobre a estrutura, classificação e algumas funções biológicas das classes destas proteases como a hemorrágica e a ação sobre componentes hemostáticos, e evidenciando o potencial clinico terapêuticos dessas metaloproteases.

1.1 HEMOSTASIA

O sistema circulatório humano é um sistema fechado, constituído pela circulação do sangue entre os vasos capilares. Quando este sistema é acometido por algum tipo de dano, quer seja de pequeno ou elevado grau, uma complexa série de reações é desencadeada entre as diversas substâncias que o compõe com a finalidade de voltar a mantê-lo funcionando em seu perfeito estado. Este fenômeno fisiológico é denominado de hemostasia. As substâncias que participam da hemostasia, os componentes hemostáticos, incluem as plaquetas, os vasos, as proteínas da coagulação do sangue, os anticoagulantes naturais e o sistema de fibrinólise [1].

Os componentes do sistema hemostático são acionados no momento da lesão vascular, onde imediatamente o estímulo do trauma provoca a contração da parede do vaso e reduz o fluxo de sangue [2]. A partir daí, as plaquetas do sangue, juntamente com os componentes hemostáticos interagem, de modo, a formar um coágulo estável que tampona o local lesionado (tampão hemostático). À medida que os vasos são regenerados, o excesso de coágulo é degradado por um processo chamado de fibrinólise e o sangue volta a circular normalmente.

O coágulo que forma o tampão hemostático contém um aglomerado de plaquetas, glóbulos sanguíneos e o plasma, presos a redes de fibrina [2, 3]. Didaticamente, a formação de agregados plaquetários e da rede de fibrina é descrita separadamente, conforme apresentados a seguir, mas vale ressaltar que ambos os processos se desenvolvem quase simultânea e instantaneamente no momento da lesão, de maneira interdependente.

1.1.1 Agregação Plaquetária

Durante a produção dos elementos sanguíneos, uma grande célula é gerada, chamada de *megacariócito*, a qual se fragmenta, na medula óssea ou logo após entrar no sangue, em pedaços de plaquetas. Assim, as plaquetas são células anucleadas do sangue, que, embora não possuam núcleo e não se reproduzam, têm muitas características funcionais em seu citoplasma e na sua membrana que contribuem para a formação inicial de um tampão plaquetário no momento da lesão vascular [2, 4].

A constrição da parede vascular, provocada durante o trauma, reduz o fluxo de sangue, como mencionado anteriormente, e favorece o contato das plaquetas com compostos do endotélio capilar expostos, como colágenos e células endoteliais.

As três principais etapas que estão envolvidas no processo de agregação plaquetária são: (1) adesão ao colágeno exposto, que desencadeia uma série de reações (ativação plaquetária); (2) liberação dos conteúdos de grânulos das plaquetas, os quais contêm uma variedade de substâncias que modulam a agregação plaquetária e a coagulação, como por exemplo, a trombina; (3) agregação plaqueta/plaqueta no sítio do dano [2, 3, 4]. Como consequência, ocorre formação de um tampão plaquetário razoavelmente frouxo no local lesionado [2], o qual diminui o fluxo sanguíneo, mas que não é estável, processo denominado de hemostasia primária. Por isto, outro processo da coagulação sanguínea é acionado com a finalidade de formar polímeros insolúveis de fibrina, que apreendem as plaquetas e outros componentes do sangue, e desenvolve um coágulo estável de fibrina, constituindo o fenômeno conhecido como hemostasia secundária.

1.1.2 Coágulo de fibrina

Para o mecanismo de formação do coágulo de fibrina se desenvolver, duas vias são ativadas, a extrínseca e a intrínseca. A via extrínseca se inicia em decorrência de traumas na parede vascular ou em células próximas ao local danificado, e a intrínseca começa durante o contato que ocorre entre o sangue e células lesadas [5]. Os componentes envolvidos nas duas vias são denominados de fatores de coagulação.

Existe uma imprecisão sobre quais dessas duas vias são primeiramente ativadas *in vivo*, mas, de acordo com a forma como desenvolve a via extrínseca, pressupõe-se ocorrer a partir dela [1, 3]. No momento da lesão vascular, as células endoteliais presentes na parede dos vasos capilares, em contato direto com o sangue, expressam o fator tecidual no local danificado, o qual, em condições normais, não circula no plasma sanguíneo. O fator tecidual exposto interage com o fator VII e, através da autocatálise, ativa-se em fator VIIa, formando o chamado complexo de fator tecidual. Subsequentemente, o FVIIa ativa o fator X e o fator IX da via intrínseca (Figura 1) [1, 3, 4, 6].



Figura 1. Esquema do processo de coagulação sanguínea e fibrinólise. Fonte: [3].

Procedimento semelhante de ativação em cascata dos fatores da coagulação acontece na via intrínseca, envolvendo os fatores XII, XI, IX, VIII, a précalicreína (PK), cininogênio, Ca²⁺ e fosfolipídeos plaquetários (PL), resultando também na ativação do fator X [3]. Como se pode observar, a ativação do fator X em fator Xa é um ponto em comum entre as duas vias (Figura 1).

O fator Xa é um precursor de ativação da protrombina (zimogênio produzido no fígado) em trombina. Para isto, é necessária a formação do complexo protrombinase, o qual é resultado de reações entre os fatores Va e Xa, íons Ca²⁺ e fosfolipídios plaquetários aniônicos e a protrombina (Figura 1) [3]. A presença de íons cálcio é necessária para promover ou acelerar as reações [2], ou seja, Ca²⁺ é uma espécie de catalisador iônico. Entre várias funções que a trombina exerce na formação do coágulo sanguíneo, especificamente na via final comum, as duas principais funções são converter fibrinogênio a fibrina e ativar o fator XIII em fator XIIIa; este, por sua vez, estabiliza o coágulo de fibrina formando assim o coágulo denso [1, 3, 6].

O fibrinogênio é uma molécula circulante do plasma sanguíneo de massa molecular de 340 KDa e constitui o fator I da cascata de coagulação. Estruturalmente, tem a forma dimérica com três pares de cadeias (A α , B β e γ) [7], ligadas covalentemente por uma série de pontes de dissulfeto próximas a regiões amino terminais [3] constituindo um domínio central, possui também dois domínios periféricos de regiões carboxila terminais (Figura 2). Estas cadeias são pontos importantes de interação do fibrinogênio com outras moléculas, como a trombina [7].



Figura 2. Estrutura do fibrinogênio; sendo, FPA o Fibrinopeptídeo A, FPB Fibrinopeptídeo B e COO⁻ são ligações carboxilas terminais. Fonte: [3]

Ocorre que, mediante a ação proteolítica da trombina, as cadeias A α e B β do fibrinogênio são clivadas, especificamente nas ligações Arg-Gly que ficam localizadas nos extremos amino terminais centrais destas duas cadeias. Como consequência deste efeito, dois fragmentos peptídicos são liberados das cadeias alfa e beta, denominados respectivamente de Fibrinopeptídeos A (FPA) e B (FPB) [3, 7], produzindo monômeros de fibrina com a estrutura da subunidade (α , β e γ)₂ e expondo sítios de ligação, favorecendo a agregação dos monômeros de fibrina em forma de um arranjo irregular, unidos por ligações não covalente fracas [3].

Esse polímero insolúvel de fibrina apreende plaquetas, eritrócitos e outros componentes e forma um coágulo inicial relativamente fraco, devido à força de ligações não covalentes fracas [3]. A partir daí, novamente a trombina entra em ação e ativa o fator XIII em XIIIa, o qual catalisa a formação de ligações peptídicas entre monômeros de fibrina, que por sua vez são ligações fortes [7], possibilitando maior resistência a rede de fibrina e promovendo a estabilização do coágulo formado, ocasionando assim o tamponamento do local danificado.

Diante disto, observa-se que a trombina tem muitas funções na hemostasia que contribuem para a formação do coágulo sanguíneo, pois é o ativador mais potente de plaquetas e, na via final comum da cascata de coagulação, converte o fibrinogênio a fibrina e ativa o fator XIII em fator XIIIa [1, 3, 6] (Figura 3).



Figura 3. Representação das contribuições da trombina para a formação do coágulo sanguíneo: atuação na ativação plaquetária (à esquerda) e na cascata de coagulação (à direita), onde converte o fibrinogênio em monômeros de fibrina e catalisa a ativação do Fator XIII à Fator XIIIa, estabilizando a rede de fibrina. Fonte: Reprodução de Markus Berguer [8], adaptação nossa.

Vale ressaltar que, no sistema hemostático as concentrações de trombina são cuidadosamente controladas de duas maneiras, para prevenir a formação descontrolada do coágulo de fibrina: pelo mecanismo de retroalimentação, na cascata de coagulação, proporcionando um balanço entre ativação e inibição e; pela presença de inibidores da trombina, de ocorrência natural no plasma sanguíneo, como a antitrombina III [3].

Não somente a formação da trombina, mas todo este processo deve ser finamente controlado, pois para ocorrer à formação apropriada do trombo é necessária a regulação das proteases que ativam esses zimogênios [4]. Caso contrário, qualquer desequilíbrio nestas reações tem como consequência distúrbios hemorrágicos ou trombóticos [1].

Por fim, uma vez o coágulo sanguíneo formado, juntamente com os fibroblastos, o tecido cresce regenerando o local da lesão [2]. O crescimento do coágulo é prevenido pela interrupção da coagulação sanguínea e pelo acionamento da fibrinólise, a qual é responsável em degradar a fibrina do coágulo [4].

Existem no mercado vários fármacos para a terapia antitrombótica relacionada à ativação plaquetária (os antiplaquetários), formação de trombina e fibrina (anticoagulantes) e formação de fibrinólise (fibrinolíticos) [2, 3, 4]. O achado

de modelos moleculares para a formulação destes fármacos é, na maioria das vezes, proveniente de diversas matrizes biológicas. A peçonha de serpentes, ao longo das últimas décadas, vem se destacando neste mercado mostrando enzimas com ação eficiente sobre os componentes hemostáticos.

1.2 PEÇONHA DE SERPENTES

As serpentes são animais pertencentes ao grupo dos répteis que podem ser classificadas como peçonhentas e não peçonhentas. Existem critérios básicos que distinguem ambas, um deles é a presença de fosseta loreal, que é um orifício que fica situado entre o olho e o nariz, responsável em detectar a presença de calor (órgão sensorial termorreceptor), característico de serpentes peçonhentas, as quais apresentam dentes inoculadores bem desenvolvidos, por onde uma substância tóxica, conhecida como peçonha, é injetada no corpo da presa [9, 10, 11, 12].

Os dentes inoculadores de veneno são produtos de um processo evolutivo das serpentes [9] e a diferenciação do tipo de dentição destes animais agrupa-as em quatro grupos: áglifas; opistóglifas; proteróglifas e solenóglifas (Figura 4) [9, 10].



Figura 4. Diferenciação do tipo de dentição das serpentes durante o processo evolutivo. Fontes: [10] e [11], adaptação nossa.

A fauna de serpentes brasileiras é formada por nove famílias, sendo apenas as famílias *Elapidae* e *Viperidae* que possuem gêneros de serpentes peçonhentas [9, 13]. Na família *Viperidae*, os gêneros *Bothrops, Crotalus e Lachesis* apresentam importância clinica, dentre outras [9, 10, 14]. Os principais efeitos provocados pelo envenenamento de viperídeos são dano no tecido local, como edema, bolhas e necrose; ação hemorrágica e coagulante [9, 10, 15, 16], o quadro clinico pode variar de manifestações locais a sistêmicas [9].

Os acidentes ofídicos acontecem em maior incidência com as serpentes do gênero botrópico, cerca de 80-90% dos casos de envenenamentos [9, 10, 13]. São em torno de 30 espécies de serpentes do gênero *Bothrops* distribuídas em todo território brasileiro que habitam principalmente nas zonas rurais e em periferias de grandes cidades [10].

Uma espécie que tem crescido em casos de envenenamentos é a *Bothrops moojeni (caiçaca)*, devido à facilidade de se adaptar aos diferentes ambientes, possuir um porte avantajado, podendo superar 1,5m, e ser bastante agressiva. Como a principal espécie dos cerrados do Brasil, distribui-se do Paraná ao Maranhão (Figura 5.) [9, 11, 13].



Figura 5. (A) Exemplar de serpente do gênero Bothrops moojeni e (B) principais regiões brasileiras onde *B. moojeni* são comumente encontradas. Fontes: (A) [11] e (B) [10].

A peçonha das serpentes é composta por uma mistura complexa de proteínas, cerca de 90% do peso seco do veneno, que possuem uma grande variedade de atividades biológicas [14]. Para isto, incluem-se as proteínas com atuação enzimática como as serinoproteases, metaloproteases, fosfolipases A₂ e L-aminoxidases; e as não enzimáticas como desintegrinas, lectinas do tipo C e toxinas *three-finger* [17].

Destas enzimas, as metaloproteases estão presentes em grande quantidade em peçonha de viperídeos [17] e são responsáveis por induzirem uma série de efeitos fisiopatológicos locais e sistêmicos durante o envenenamento, como hemorragia, edema, mionecrose, coagulação, necrose na pele e reação inflamatória [18].

Diante de amplas funções biológicas, recentes estudos têm vislumbrado o uso de metaloproteases de peçonha de serpentes com potencial para aplicações clínico-terapêutica.

1.2.1 Metaloproteases: Estrutura e Classificação

As metaloproteases são proteases do tipo endopeptidase que contém em seu sítio catalítico uma ligação com um íon metálico, geralmente o Zn²⁺, responsável por sua atividade enzimática [14, 19, 20].

As metaloproteases zinco dependente são componentes abundantes em peçonha de serpentes, SVMPs (*Snake Venom Metalloproteinases*), e também estão presentes em tecido reprodutor de mamíferos, ADAMs (*a desintegrin and metalloproteinases*) [21, 22]. Ambas metaloproteases pertencem à família *metzincin* e a subfamilia das *adamalisins*, devido a semelhanças estruturais [15, 22, 23].

As metaloproteases provenientes da peçonha de serpentes são enzimas que estruturalmente estão divididas em classes, de acordo com a presença de domínios. Fox e Serrano (2008) as classificaram nas classes PI, PII e PIII, onde as metaloproteases PI são compostas apenas pelo domínio metaloprotease, as PII possuem o domínio metaloprotease e o domínio desintegrina (RGD) e as PIII contém o domínio metaloprotease, um tipo desintegrina (*desintegrin-like*) (XCD) e o *cysteine-rich* (*Cys-rich*) [18].

As SVMPs são sintetizadas em glândulas especializadas na forma de próenzima (zimogênio). Esta condição de inatividade decorre principalmente devido à presença das sequências conservadas PRCG(V/N)PD e PKMCGVT, respectivamente, localizadas antes do domínio catalítico, onde a cisteína interage com o átomo de zinco, bloqueando assim ligações do zinco com moléculas de água e outros substratos, inibindo a atividade proteolítica do íon metálico. Este mecanismo é denominado de *cysteine-switch* [15, 18, 19, 22, 23]. Também são compostas por várias pontes dissulfeto, que mantêm sua estabilidade estrutural e funcional [18, 21, 23].

Ainda no corpo da serpente, depois de sintetizadas, as metaloproteases podem sofrer modificações pós-traducionais, perdem o pró-domínio, ocorrendo ativação enzimática e clivagem entre os domínios, originando assim outras



subclasses (Pla, Plla, Pllb, Pllc, Plld, Plle, Plla, Pllb, Pllc e Plld), como mostrado na Figura 6 [18, 24].

Figura 6. Organização estrutural das classes de SVMPs e suas subclasses após modificações póstraducionais, proposta por Fox & Serrano (2008). Sendo, P: peptídeo sinalizador; Pro: segmento da pró-proteína; Proteinase: sequência HEBXHXBGBXH; S: espaçador; Dis: domínio disintegrina; Dislike: domínio semelhante à disintegrina; Cys-rich: domínio rico em cisteína; Lec: lectina tipo-C. Fonte: [18].

A classe mais simples das SVMPs é a PI, a qual varia de peso molecular 20-30 KDa, o seu único domínio, o metaloprotease, é o responsável por sua atividade enzimática. Estruturas tridimensionais têm delineado este ambiente, no qual além do íon metálico, existe uma sequência consenso HEXBHXBGXHZ, onde as três histidinas (em negrito) se ligam tetrahedicamente com o zinco. Revela também um resíduo fixo de metionina, na sequência CIMXP, conhecido como "*Met-turn*", localizado abaixo do sítio catalítico que forma uma base hidrofóbica para o átomo de zinco e os três resíduos de histidinas do sítio (Figura 7) [18, 19, 21, 22, 23].



Figura 7. Representação do domínio metaloprotease das SVMPs. Fonte: [23].

As SVMPs da classe PII, de 30-50 KDa, além do domínio metaloprotease são caracterizadas pela presença de um domínio adicional de desintegrina (Dis), que é uma proteína rica em cisteínas, a qual hospeda uma sequência padrão R-G-D (Arg-Gly-Asp), responsável por direcionar esta classe de metaloprotease para o seu alvo, geralmente através da ligação com integrinas de plaquetas [17, 18].

As metaloproteases PIII, de 50-100 KDa, constituem-se do domínio metaloprotease; de um domínio semelhante ao desintegrina, o *desintegrin-like* (*Dis-like*); e do *cysteine-rich* (*Cys-rich*). A típica clivagem entre os domínios metaloprotease e desintegrina que comumente acontece entre as SVMPs PIII durante as modificações pós-traducionais, foi recentemente observada por Sousa (2014) em duas isoformas de metaloproteases da classe PIIIb, sendo-as a P4b IB e a P4b FLONA, provenientes de peçonha de serpentes do gênero *Bothrops atrox* de cativeiro e de ambiente natural, respectivamente. Através da autólise *in vitro* ambas as proteases geraram bandas proteicas com cerca de 30 KDa, correspondentes aos domínios desintegrina e rico em cisteína [24]. A presença destes domínios adicionais contribui para o aumento da atividade da toxina, pois modulam a especificidade destas proteases [17, 18].

Durante o envenenamento por serpentes da família *Viperidae*, as SVMPs são as principais responsáveis por induzirem diversos efeitos fisiopatológicos locais e sistêmicos [15, 18].

1.2.2 Mecanismo de ação das SVMPs

Um efeito comum que as SVMPs induzem é a hemorragia. No entanto, a intensidade em que ocorre varia entre as classes das metaloproteases. As SVMPs da classe PIII contribuem para hemorragia sistêmica, enquanto que as da classe PI, quando ocorre hemorragia, o seu efeito é local [15, 16, 17].

Um dos motivos sobre esta disparidade é basicamente a composição estrutural destas proteases. Onde, especificamente, os domínios externos *dis-like e cys-rich*, característicos da classe PIII, se aderem aos principais constituintes da parede de capilares, que são a Membrana Basal (BM) e as células endoteliais, direcionando e possibilitando assim uma ótima posição para o domínio metaloprotease intensificar sua ação enzimática sobre a Membrana Basal (BM) e células endoteliais, degradando-os e provocando danos ao capilar e a subsequente hemorragia [15, 17, 25].

Investigações têm evidenciado diversas SVMPs PIII com ação na BM e em células endoteliais, através da inibição de componentes da membrana basal como fibronectina, laminina e colágeno tipo IV, quando incubados com estas metaloproteases em eletroforese em gel sob condições desnaturantes (SDS-PAGE); e/ou a partir das alterações em cultura de células. Conforme verificado em *Bothropoidin*, isolada da peçonha de *B. pauloensis* [19]; em *BjussuMP-I* de *B. jararacussu* [26] e em *Jararhajin* de *B. jararaca* [27].

No entanto, diferentemente das SVMPs PIII, as metaloproteases da classe PI, quando induzem a hemorragia são fracamente hemorrágicas. Certamente, apenas o domínio metaloprotease (quando hemorrágico) é insuficiente para causar um dano mais elevado por não permanecer ancorado no local específico do tecido [16]. São exemplos de PI não hemorrágicas: *BleucMP* proveniente da peçonha de serpentes do gênero *Bothrops leucurus* [28]; *BpMP-I* de *Bothropoides pauloensis* [29] e *BmooMPα-II* de *B. moojeni* [30], dentre outras descritas na literatura.

Algumas metaloproteases da classe PI são fracamente hemorrágicas, é o caso da *BthMP* isolada de *B. moojeni* [31] e da *Moozincina,* também isolada de *B. moojeni*, a qual apesar de não apresentar atividade hemorrágica direta, conforme verificado por Fonseca (2010), em concentrações elevadas e por um intervalo de tempo maior, induz o extravasamento sanguíneo em tecido pulmonar. Isto pode ser justificado ou por ação indireta da lesão muscular, ou realmente devido à presença

do domínio metaloprotease em maior concentração no sangue e por mais tempo, favorecendo assim, mesmo que tardia, a ação hemorrágica [32].

Além de hemorragia, outros efeitos são provocados pelas diferentes classes das SVMPs, como interferir nos componentes hemostáticos. Neste ponto, as metaloproteases da classe PI têm mostrado ação enzimática na ativação de protrombina em trombina; degradação das cadeias Aα e Bβ do fibrinogênio, com maior afinidade pelas cadeias Aα, ativação do fator X da cascata de coagulação, degradação do coagulo de fibrina, inibindo a agregação plaquetária, entre outros [17, 25].

Como se pode observar, apesar de pouca especificidade na atividade catalítica, parece ser de consenso entre as diversas SVMPs da classe PI a ação proteolítica sobre os componentes hemostáticos, principalmente sobre fibrinogênio. A maioria apresenta este comportamento fibrinogenilítico. Também atuam na ativação de protrombina, como é o caso da *EC217* isolada de peçonha do viperideo iraniano *E. carinatus* [33] e na degradação de fibrina como em *Batroxase* a partir de *Bothrops atrox* [34] e em *BJ-P12* a partir de *B. jararaca* [35].

Deste modo, a pouca ou nenhuma atividade hemorrágica associada à ação antitrombótica são atividades biológicas características das SVMPs PI, que revelam estas metaloproteases como promissoras para futuros estudos, relacionados à cascata de coagulação sanguínea, e confirmam a necessidade de pesquisas colaborativas sobre suas caracterizações enzimáticas e estruturais, para que estas proteases possam ser utilizadas como modelo molecular para a elaboração de novos fármacos com aplicação antitrombótica.

Diante disto, o presente trabalho de pesquisa objetivou realizar a purificação da metaloprotease *BthMP* (*Metaloprotease de Bothrops moojeni*) pela metodologia descrita por Gomes et al. (2009), visando obter dados complementares ao trabalho de purificação desta enzima proteolítica e avaliar a sua interação com componentes da coagulação sanguínea, de modo que se possa confirmar a possibilidade de utilização da referida protease como modelo molecular para a elaboração de fármacos antitrombóticos.

REFERÊNCIAS

[1] FRANCO, R. F. Fisiologia da coagulação, anticoagulação e fibrinólise. **Medicina**, Ribeirão Preto, n. 34, p. 229-237, jul./dez., 2001.

[2] GUYTON, A. C.; HALL, J. E. Hemostasia e Coagulação Sangüínea. In: GUYTON, A. C.; HALL, J. E. Tratado de Fisiologia Médica. 9. ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A. Cap. 36, p. 420-430, 1997

[3] RAND, M. L.; MURRAY, R. K. Hemostasia e Trombose. In: MURRAY, R. K. **Harper:** Bioquímica Ilustrada. 26. ed. São Paulo: Atheneu Editora. Cap. 51, p. 598-609, 2006

[4] SMITH, C.; MARKS, A. D.; LIEBERMAN, M. Proteínas Plasmáticas do Sangue, Coagulação e Fibrinólise. In: SMITH, C. **BIOQUÍMICA MÉDICA BÁSICA DE MARKS**. Cap. 45, p. 827-840.

[5] SANT'ANA, C. M. Atividade plasmina símile e seqüência parcial de enzima fibrino(geno)lítica do veneno de Bothrops lanceolatus (Fer de lance). 2005. 94f. Dissertação (Departamento de Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2005.

[6] NORRIS, L. A. Blood Coagulation. Best Practice & Research, v. 17, n. 3, p. 369-383, 2003.

[7] SOUZA, J. C.; CARRIÇO, F.; DUARTE, C. Fibrinogénio e Fibrinólise: Relevância do Fibrinogénio Plasmático. In: PERDIGÃO, C.; SOUZA, J. C.; SANDANHA, C.; SILVA, J. M. **Fibrinogénio**: da fisiopatologia à clínica. Lisboa: Boehringer Mannheim. Cap. 2, p. 27-36, 1996.

[8] PINTO, A. F. M. Novos enfoques no estudo dos mecanismos de ação de metaloproteinases e outras proteínas tóxicas envolvidas no envenenamento ofídico e lonômico. 2006. 127f. Tese (Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.

[9] MELGAREJO, A. R. Serpentes peçonhentas: principais grupos, identificação, veneno, acidentes e primeiros socorros. Disponível em: < https://xa.yimg.com/kq/groups/24005556/.../serpentes+melgarejo.pdf>. Acessado em: 10/05/2015.

[10] BRASIL. Ministério Nacional da Saúde. **Manual de Diagnóstico e Tratamento de Acidentes por Animais Peçonhentos**, FUNASA; 3ª Edição, p. 1-112, 2001.

[11] FUNDAÇÃO EZEQUIEL DIAS (Brasil). **Animais Peçonhentos**. Belo Horizonte: Cartilha informativa sobre animais peçonhentos, 5^a Edição, p. 1-24, 2014.

[12] INSTITUTO BUTANTÃ. Animais Peçonhentos: Serpentes. Série Didática 5. São Paulo, SP s/d. Disponível em: http://www.toxnet.com.br/download/serpentes.pdf>. Acessado em: 04/03/2015.

[13] BERNARDE, P. S. Mudanças na classificação de serpentes peçonhentas brasileiras e suas implicações na literatura médica. **Gazeta Médica da Bahia**, v. 81, n.1, p. 55-63, 2011.

[14] CUNHA, M. E.; MARTINS, O. A. Principais compostos químicos presentes nos venenos de cobras dos gêneros *Bothrops* e *Crotalus* – uma revisão. **Revista Eletrônica de Educação e Ciência (REEC)**, v. 2, n. 2, p. 21-26, 2012. Disponível em: http://www.fira.edu.br/revista/reec_vol2_num2_pag21.pdf. Acessado em 12/05/2015.

[15] GUTIÉRREZ, M. J.; RUCAVADO, A.; ESCALANTE, T.; DÍAZ, C. Hemorrhage induced by snake venom metalloproteinases: biochemical and biophysical mechanisms involved in microvessel damage. **Toxicon**, v. 45, p. 997-1011, 2005.

[16] ESCALANTE, T.; RUCAVADO, A.; FOX, J. W.; GUTIÉRREZ, M. J. Key events in microvascular damage induced by snake venom hemorrhagic metalloproyeinases. **Journal of Proteomics**, v. 74, p. 1781-1794, 2011.

[17] SAJEVIC, T.; LEONARD, A.; KRIŽAJ, I. Haemostatically active proteins in snake venoms. **Toxicon**, v. 57, p. 627-645, 2011.

[18] FOX, J. W.; SERRANO, S. M. T. Snake Venom Metalloproteinases. In: MACKESSY, S. P. **Handbook of venoms and toxins of reptiles**. Taylor & Francis Group. Cap. 4, p. 95-113, 2010.

[19] GOMES, M. S. R. **Caracterização estrutural e funcional de metaloproteases isoladas de peçonhas botrópicas.** 2013. 72 f. Tese (Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2013.

[20] SOUZA, D. L. N. Caracterização bioquímica e funcional de uma nova metaloproteinase isolada da peçonha de *Bothropoides pauloensis (Bothrops pauloensis)*. 2011. 94 f. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2011.

[21] GUTIÉRREZ, J. M.; RUCAVADO, A.; ESCALANTE, T. Snake Venom Metalloproteinases: Biological Roles and Participation in the Pathophysiology of Envenomation. In: MACKESSY, S. P. **Handbook of venoms and toxins of reptiles**. Taylor & Francis Group. Cap. 5, p. 115-138, 2010.

[22] OLIVEIRA, A. K. Análises dos elementos estruturais de metaloproteinases das classes P-I e P-III do veneno de Bothrops jararaca importantes para suas interações com proteínas plasmáticas e da matriz extracelular. 2009. 47 f. Dissertação (Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia) apresentada à Universidade de São Paulo/Instituto Butantan, São Paulo, 2009.

[23] BODE, W.; GOMIS-RUTH, F. X.; STOCKLER, W. Astacins, serralysins, snake venom and matrix metalloproteinases exhibit identical zinc-binding environments

(HEXX-HXXGXXH and Met-turn) and topologies and should be grouped into a common family, the '*metzincins*'. **FEBS Letters**, 331, p. 134-140, 1993..

[24] SOUSA, L. A. F. Isolamento e avaliação das atividades biológicas de uma nova metaloproteinase (SVMP) da classe PIII da peçonha de *Bothrops atrox*. 2014. 84 f. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Recursos Naturais da Amazônia) apresentada â Universidade Federal do Oeste do Pará, Santarém, 2014.

[25] GASANOV, S. E.; DAGDA, R. K.; RAEL, E. D. Snake Venom Cytotoxins, Phospholipase A_2s , and Zn^{2+} -dependent Metalloproteinases: Mechanisms of Action and Pharmacological Relevance. **J Clinical Toxicol**, 4:181, p. 1-14, 2013.

[26] MAZZI, M. V. Caracterização funcional e estrutural de uma metaloprotease hemorrágica isolada da peçonha de Bothrops jararacussu. 2005. 142 f. Tese (Programa de Pós-Graduação em Toxicologia) apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2005.

[27] MOURA-DA-SILVA, A. M.; BALDO, C.; Jararhagin, a hemorrhagic snake venom metalloproteinase from *Bothrops jararaca*. **Toxicon**, 60, p. 280-289, 2012.

[28] GOMES, M. S. R.; QUEIROZ, M. R.; MAMEDE, C. C. N.; MENDES, M. M.; HAMAGUCHI, A.; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I.; SOUSA, M. V.; AQUINO, E. N.; CASTRO, M. S.; OLIVEIRA, F.; RODRIGUES, V. M. Purification and functional characterization of a new metalloproteinase (BleucMP) from *Bothrops leucurus* snake venom. **Toxicon**, 153, p. 290-300, 2010.

[29] SOUZA, D. L. N.; GOMES, M. S. R.; FERREIRA, F. B.; RODRIGUES, R. S.; ACHÊ, D. C.; RICHARDSON, M.; BORGES, M. H.; RODRIGUES, V. M. Biochemical and enzymatic characterization of BpMP- I, a fibrinogenolytic metalloproteinase isolated from *Bothropoides pauloensis* snake venom. **Toxicon**, 161, p. 102-109, 2012.

[30] QUEIROZ, M. R. **Purificação e caracterização de uma nova metaloprotease da serpentes Bothrops moojeni Hoge, 1966 (squamata: Viperidae) com ação na agregação plaquetária**. 2011. 60 f. Dissertação (Programa de Pós-Graduação do Mestrado Profissional em Inovação Biofarmacêutica) apresentada ao Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2011.

[31] GOMES, M. S. R.; MENDES, M. M.; OLIVEIRA, F.; ANDRADE, R. M.; BERNARDES, C. P.; HAMAGUCHI, A.; ALCÂNTARA, T. M.; SOARES, A. M.; RODRIGUES, V. M.; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I. BthMP: a new weakly hemorrhagic metalloproteinase from *Bthrops moojeni* snake venom. **Toxicon**. 53, p. 25-32, 2009.

[32] MAMEDE, C. C. N. **Caracterização bioquímica e funcional de uma metaloprotease isolada da peçonha da serpente Bothrops moojeni**. 2011. 82 f. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica) apresentada à Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2011. [33] BYOKI, E. A.; MIRAKABADI, A. Z. Partial purification and characterization of anticoagulant factor from the snake (*Echis Carinatus*) venom. **Iranian Journal of Basic Medical Sciences**. 16, p. 1139-1144, 2013.

[34] DE TONI, L. G. B. **Batroxase, uma nova metaloprotease da classe Pl isolada da peçonha de Bothrops atrox: avaliação da atividade funcional**. 2011. 120 f. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Toxicologia) apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2011.

[35] SILVA, I. R. F. **Purificação e caracterização de uma mataloprotease da peçonha da serpente** *Bothrops jararaca*. 2014. 125 f. Dissertação (Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas) apresentada à Universidade de Campinas, Campinas, 2014.

Capítulo 2

Purificação e avaliação da interferência de BthMP (uma metaloprotease da peçonha de Bothrops moojeni) na coagulação sanguínea

SANTOS, M. A.; GOMES, M. S. R.; PANDO, L. A. Purificação e avaliação da interferência de BthMP (uma metaloprotease da peçonha de Bothrops moojeni) na coagulação sanguínea. **Química Nova**. 2016.

Purificação e avaliação da interferência de BthMP (uma metaloprotease da peçonha de Bothrops moojeni) na coagulação sanguínea

Autora: Manuela Andrade Santos Orientador: Prof. Dr. Mário Sérgio Rocha Gomes Co-orientadora: Prof^a. Dra. Luzia Aparecido Pando

Resumo: No presente trabalho de pesquisa, relatou-se a purificação da metaloprotease *BthMP*, proveniente da peçonha da serpente *Bothrops moojeni*. Para a purificação desta protease, utilizaram-se os passos cromatográficos de troca iônica (DEAE-Sepharose) e de exclusão molecular (Sephadex G-75), sendo o produto desses processos uma banda protéica com elevado grau de pureza, visualizada em SDS-PAGE a 14%, denominada *BthMP*. Esta, por sua vez, quando analisada em MALDI-TOF revelou o peso molecular na forma nativa de 23,050 KDa e 23,872 KDa na forma reduzida, e a partir dos fragmentos peptídicos obtidos por Peptide Mass Fingerprinting (PMF) em MS (MALDI-TOF/TOF), indicou alta similaridade com a metaloprotease BmooMPa-I. Em termos enzimáticos, BthMP mostrou atividade proteolítica sobre azocaseína e frente ao PMSF e benzamidina, enquanto que esta atividade foi inibida na presença de EDTA, 1,10-phenanthroline e β -mercaptoetanol, sendo portanto uma metaloprotease zinco dependente da classe PI. Ainda com este propósito, verificou-se sua especificidade enzimática sobre as cadeias Aα e Bβ do fibrinogênio e também o consumo de fibrinogênio in vivo, sem contar na sua ação em componentes da cascata de coagulação, devido ao prolongamento do Tempo de Protrombina (TP) e do Tempo de Tromboplastina Parcial ativada (TTPa). Desta forma, a acentuada atividade fibrinogenolítica e o alto consumo de fibrinogênio in vivo, são resultados que indicam a ação anticoagulante da BthMP, além do mais, sua capacidade de interferir na cascata de coagulação nos sugere que esta protease é promissora para futuros estudos que possam indicar um novo modelo de fármaco antitrombótico.

Palavras Chaves: Cascata de Coagulação. Metaloprotease. Peçonha de Serpente.

Purification and Evaluation of the interference of BthMP (a metalloprotease from Bothrops moojeni) in blood clotting

Author: Manuela Andrade Santos Advisor: Prof. Dr. Mário Sérgio Rocha Gomes Co-supervisor: Prof^a. Dra. Luzia Aparecido Pando

Abstract: In the present work reported the purification of the metalloprotease *BthMP*, from the venom of Bothrops moojeni. For purification of the protease was used to ion exchange chromatographic steps (DEAE-Sepharose) and molecular exclusion (Sephadex G-75), the product of these processes is a protein band with high purity, visualized on SDS-PAGE 14%, referred BthMP. This when analyzed on MALDI-TOF revealed the molecular weight of the native form 23.050 KDa and 23.872 KDa in the reduced form, and from the peptide fragments obtained by Peptide Mass Fingerprinting (PMF) in MS (MALDI-TOF/TOF) indicated high similarity with *BmooMPa-I* metalloprotease. In enzymatic terms, *BthMP* showed proteolytic activity on azocasein using PMSF and benzamidine, while this their activity was inhibited in the presence of EDTA; 1,10-Phenanthroline and β -mercaptoethanol, it is therefore a zinc-dependent metalloprotease class PI. To this end, we contemplate its enzymatic specificity of the A α and B β chains of fibrinogen and also the consumption of fibrinogen in vivo, apart from its action on the components of the coagulation cascade, due to prolongation of prothrombin time and partial thromboplastin time. Thus, the sharp fibrinogenolytic activity and high consumption of fibrinogen in vivo, are results that indicate the anticoagulant action of *BthMP*, furthermore their ability to interfere with the coagulation cascade, suggested that this protease is promising for future studies might indicate a new antithrombotic agent model.

Key Words: Coagulation. Metalloprotease. Cascade Venom Snake.

2. Materiais e Métodos

2.1.1 Materiais

Neste estudo foi utilizada a peçonha bruta liofilizada da serpente do gênero de *Bothrops moojeni*, obtida a partir de espécies mantidas no Serpentário Proteína Bioativas LTDA–Batatais/SP. A peçonha foi estocada a -20°C no laboratório de Bioquímica da UESB.

Utilizou-se também os reagentes listados a seguir: Acrilamida, bis-Acrilamida, bicarbonato de amônia, TEMED, EDTA, azul de bromofenol, Coomassie Brilliant Blue R-250, Coomassie Brilliant Blue G, glicina, fibrinogênio bovino, persulfato de amônio, soroalbumina bovina, Tris (Hidroximetil-aminometano), azocaseína; inibidores enzimáticos como: aprotinina, benzamidina, 1,10-fenantrolina, resinas cromatográficas (Sigma Chem. Co. e GE Healthcare). Vale destacar que os demais reagentes usados foram todos de grau analítico.

2.1.2 Animais

Os experimentos envolveram camundongos da raça swiss (Família *Muridae*), com aprovação do comitê de ética em experimentos animais da UESB; nº de protocolo 25/2013 (em anexo). Os cuidados com os animais foram conduzidos de acordo com as orientações do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e as Diretrizes Brasileira de Práticas para o Cuidado e a Utilização de Animais para fins Científicos e Didáticos (DBPA).

2.1.3 Fracionamento Cromatográfico da Peçonha

Cerca de 200mg de peçonha bruta de *Bothrops moojeni* foi dissolvida em 2mL de tampão Bicarbonato de amônia (AMBIC) 0,05 molar, pH 7,8, e, posteriormente centrifugada numa rotação de 1000xg a 4°C por 10 minutos. O sobrenadante resultante foi aplicado em 50mL de resina de troca iônica DEAE-Sepharose®, previamente equilibrada com o mesmo tampão. Este passo cromatográfico foi conduzido inicialmente com o tampão AMBIC 0,05 molar e a partir da fração 85, foi estabelecido o gradiente convexo de concentração de 0,05 a 0,50 molar. Frações de 3mL foram coletadas com um fluxo lento (20 mL/hora). As frações cromatográficas foram acompanhadas por leitura em espectrofotômetro a

280nm. Neste passo cromatográfico, obtiveram-se as frações proteicas MD1, MD2a, MD2, MD3, MD4, MD5, MD6 e MD7.

O passo cromatográfico seguinte foi realizado com a fração MD2, a qual apresentou bom grau de pureza em gel de eletroforese (PAGE-SDS) a 14%. Esta fração foi resuspendida em 3mL do tampão AMBIC 0,05 molar com pH 7,8 e cromatografada em 100mL de resina de exclusão molecular Sephadex G-75®, previamente equilibrada com o mesmo tampão. Esta etapa cromatográfica foi conduzida com fluxo constante e frações de 3mL foram coletadas e monitoradas por leitura em espectrofotômetro a 280nm.

Neste passo cromatográfico, foram obtidas as frações G1, G2 e G3. A fração G2 (*BthMP* – Metaloprotease de *Bothrops moojeni*), que apresentou perfil único em PAGE-SDS a 14%, foi submetida à cromatografia de fase reversa em coluna μ RPC C4 de 4.6x150mm (GE Healthcare Bio-Sciences) através da diluição de 200 μ g de *BthMP* em 500 μ L do solvente (0,1% ácido trifluoracético, v/v e acetonitrila 5%, v/v) e eluída com o solvente (acetonitrila 80%, v/v e ácido trifluoracético 0,1%, v/v). Esta cromatografia foi realizada com o gradiente linear de 0 a 100% a um fluxo de 0,5 mL/min.

2.1.4 Determinação quantitativa de proteínas

As dosagens de proteínas em soluções foram realizadas utilizando o método estabelecido por Bradford (1976) [1]. As determinações das concentrações foram realizadas em triplicatas e a absorbância medida a 595nm. Paralelamente à dosagem de proteínas, foi construída uma curva padrão de soroalbumina bovina (BSA) (1mg/mL), considerando o coeficiente de extinção molar em 280nm (0,665). Assim, determinou-se a concentração de proteínas em µg/µL, a partir de cálculos de regressão linear baseados nos valores obtidos na curva padrão.

2.1.5 Eletroforese em gel de poliacrilamida com agentes desnaturantes (SDS-PAGE)

As eletroforeses em gel de poliacrilamida a 14% com agentes desnaturantes (SDS) foram realizadas conforme a técnica descrita por Laemmli (1970) [2].

O tampão do eletrodo continha Tris 0,025M, glicina 0,192M e SDS 0,1% (m/v), pH 8.3. As amostras foram dissolvidas em tampão da amostra (Tris-HCI 0,06M pH 6.8, azul de bromofenol 0,001% (m/v), glicerol 10% (v/v) e β -mercaptoetanol 10%

(v/v)). As eletroforeses foram realizadas em sistema de eletroforese Vertical GRS 300STD. Após a corrida, os géis foram corados em uma solução de *Coomassie Brilliant Blue R-250* 0,1% (m/v) em água e metanol na proporção de 1:1 (v/v) e descorados numa solução de ácido acético a 7%.

2.1.6 Determinação da massa molecular por MALDI-TOF MS e Identificação da protease por bioinformática

A massa molecular da protease também foi determinada por espectrometria de massas com ionização (MALDI-TOF-MS) (*Matrix-assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry*). As análises foram feitas em espectrofotômetro de massas tipo duplo TOF com fonte MALDI (MALDI-TOF/TOF, modelo AutoFlex III Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha).

A metodologia de espectrometria de massa foi utilizada para a identificação da sequencia parcial da protease. Uma amostra da enzima foi digerida com tripsina e o espectro de massa foi analisado com o *software Biotools* (Bruker Daltonics) e a identificação da proteína foi realizada com o software *Mascot* (Perkins et al. 1999 [3]). Posteriormente, foi realizada pesquisa no banco de dados NCBI (Johnson et al. 2008 [4]). Este teste foi feito em parceria com a Universidade de Brasília (UNB).

2.1.7 Atividade Proteolítica sobre o Fibrinogênio

A atividade proteolítica sobre o fibrinogênio bovino foi realizada conforme o descrito por Gomes et al. (2009) [5], com modificações. Amostras contendo 50µL de uma solução de fibrinogênio bovino (1.5mg/mL) em Tris-HCl 50mM, pH=7,4 foram pré-incubadas com 5µg da protease a 37°C em diferentes intervalos de tempo (5, 10, 15, 30 e 60 minutos). Interrompeu-se a reação com a adição de 50%(v/v) da solução tampão (stop) contendo tampão Tris-HCl 50 mM pH=6,5; SDS 2% (v/v); β-mercaptoetanol 5% (v/v); glicerol 10% (v/v) e azul de bromofenol 0,005% (m/v). Em seguida, a mistura foi aquecida a 100°C por 5 minutos e o produto da reação analisado em SDS-PAGE a 14%, conforme descrito anteriormente.

2.1.8 Atividade Proteolítica sobre a Azocaseína

Para a realização da atividade azocaseinolítica, foi utilizado o substrato sulfanilamida-azocaseína (*Sigma-Aldrich*). Amostra contendo 5,0µg de *BthMP* foi incubada com 800µL da solução de azocaseína (1.5mg/mL) em Tris-HCI 20mM,

pH=7,4, contendo CaCl₂ 5mM por 30 min. a 37°C. A reação foi interrompida pela adição de 200µL de ácido tricloro acético a 10% (v/v). A mistura permaneceu em repouso à temperatura ambiente por 20 minutos e posteriormente foi centrifugada por 15 minutos a 4.000*xg*. O sobrenadante foi retirado e a quantificação da atividade proteolítica foi realizada utilizando espectrofotômetro com leitura a 405nm. Uma unidade (U) de atividade azocaseinolítica foi definida como sendo o acréscimo de 0,001 unidades de absorbância a 405nm em relação às condições do ensaio controle. Os ensaios foram realizados em triplicatas.

O efeito dos inibidores de proteases também foi testado utilizando a atividade azocaseinolítica como parâmetro. Para este ensaio, utilizou-se 5,0µg de *BthMP*, a qual foi pré-incubada por 30 minutos à 37°C com 10µL de soluções de EDTA 10mM, 1,10-fenantrolina 10mM, benzamidina 10mM, PMSF 10mM e β -mercaptoetanol 10mM. Posteriormente ao período de incubação, a atividade proteolítica foi realizada conforme descrito anteriormente.

2.1.9 Determinação dos parâmetros de coagulação (TP e TTPa)

Para determinar a capacidade de *BthMP* em interferir nos parâmetros da coagulação sanguínea (TP, TTPa), grupos de 3 animais (*Swiss*, 20-25g,) foram injetados com 10µg/50µL de *BthMP* em solução salina 0,9% por via intraperitoneal (i.p.). Os animais controle receberam somente 50µL de salina. Após 3 horas de inoculação os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e o sangue coletado por punção cardíaca. O sangue foi centrifugado por 360x*g* durante 15, minutos a 4°C, e o plasma obtido foi utilizado para determinar o TP, TTPa, com base na metodologia descrita no kit comercial "HemoStat Kit". Os testes foram realizados em n=3. Este teste foi feito em parceria com a Universidade Federal de Uberlândia (UFU).

2.1.10 Quantificação do Fibrinogênio Plasmático

Para quantificar o fibrinogênio plasmático, 10µg da peçonha de *Bothrops moojeni* e de *BthMP* foram dissolvidos em 50µL de solução salina 0,9% e inoculado por via intraperitoneal (i.p.) em grupos de 3 animais (*Swiss*, 20-25g). Os animais controle receberam somente 50µL de Salina. Após 3 horas de inoculação os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e o sangue coletado por punção cardíaca. O sangue foi centrifugado por 360x*g* durante 15 minutos, a 4°C, e o

plasma obtido foi utilizado para determinar a quantidade de fibrinogênio plasmático, conforme metodologia descrita no kit comercial "HemoStat Kit". Realizou-se os teste com n=3. Este teste foi feito em parceria com a Universidade Federal de Uberlândia (UFU).

2.1.11 Análise Estatística dos Resultados

A montagem dos gráficos, os cálculos das médias e os desvios padrões das médias foram realizados com auxílio do software Prisma. As significâncias estatísticas dos resultados foram determinadas utilizando o teste t-Student's e os valores de p < 0,05 foram considerados significativos.

2.2 Resultados e Discussão

As transformações que a tecnologia tem provocado nas últimas décadas continuam alcançando os diversos pilares do conhecimento, desde o social, perpassando pelo filosófico e o científico. Com relação às ciências, especialmente a biológica, tem sido impactada.

Com isso, as investigações biológicas, que até então eram fundamentadas básica e quase exclusivamente em experimentações *in vivo* e *in vitro*, nesta era da bioinformática vêm inovando com uma forma de experimentação, denominada *in silico*, que envolve a bioinformática e viabiliza, por exemplo, a identificação de proteínas em banco de dados atuais utilizando técnicas de análise como a espectrometria de massas [6].

Com relação à bioinformática, o modo de tratamento que esta proporciona aos diversos dados de estudos biológicos, isto é, a organização e análise integrada bem como a diminuição e a automatização dos dados, favoreceu o surgimento de novas áreas de pesquisas da biologia, que são as "ômicas" [6].

A lista das "ômicas" é relativamente grande e existe um número crescente de outras surgindo [6]. Entre as já fundamentadas está à precursora genômica que estuda os genes e suas funções [6, 7], a transcriptômica, proteômica [6, 7, 8] e metabolômica, dentre outras [6].

Destas "ômicas", particularmente a proteômica, recentemente introduzida, em 1995 [8], encarrega-se de analisar e identificar as proteínas, produtos da expressão gênica [7, 8]. Além da caracterização estrutural, a proteômica se desenvolve também através das investigações de funções biológicas das proteínas.

A análise proteômica atinge, por excelência, campos da biologia e da biotecnologia, pois, em conjunto com dados da genômica e transcriptômica, fornece várias informações sobre a dinamicidade envolvida na rota metabólica celular da proteína [6, 7], até mesmo a respeito de possíveis modificações pós-traducionais [8], e viabiliza a identificação de novas moléculas bioativas em meios biológicos naturais, levando ao desenvolvimento de novos medicamentos [7].

É neste cenário de respostas a possíveis modificações traducionais e de descoberta de moléculas bioativas que estão sendo impulsionadas as investigações proteômicas com peçonha de serpentes.

Na literatura, além dos relatos de modificações pós-traducionais em toxinas de glândula venifera de serpentes [9], há exemplos de achados de modelos

moleculares isolados da peçonha de serpentes que impactaram a farmacologia e interferem de forma significativa na qualidade de vida das pessoas, como é o caso do já consolidado peptídeo de ação hipotensora proveniente do veneno da serpente *Bothrops jararaca*, a bradicinina, descrita por Maurício Rocha e colaboradores no final da década de 40 do século XX [10].

Ainda com este propósito, existem outros estudos sendo realizados. Outro exemplo está em uma breve revisão realizada por Liu et al. (2014) [11] que fala sobre ação antitumoral das peçonhas de serpentes, onde mencionam toxinas com capacidade de induzirem apoptose em células com câncer de ovário, de mama e de próstata [11].

Surpreendente, também, é a gama de substâncias bioativas na peçonha de serpentes com atuação na hemostasia. Sajevic et al. (2011) [12] assinalam diversas drogas já desenvolvidas para o tratamento de desordens trombo embólicas; inibidoras da formação de trombo, inibidoras do fator X/Xa e de trombina, enzimas proteolíticas que degradam potencialmente o fibrinogênio plasmático tornando assim o sangue mais fluido e incoagulável, dentre outras. Isto é possível, graças ao arsenal de proteínas existente na peçonha de serpentes que possuem ação sobre os componentes do sistema hemostático [12].

São justamente estes diversos compostos orgânicos bioativos os principais responsáveis pelos efeitos fisiopatológicos provocados durante o envenenamento de serpentes, dos quais se destacam as toxinas fosfolipases, neurotoxinas, serinoproteases e as metaloproteases zinco dependentes [12].

Especialmente as serinoproteases e as metaloproteases são as principais enzimas proteolíticas presentes nas peçonhas da família *Viperidae*. Análises de transcriptoma e proteômica têm demonstrado que estas proteases representam cerca de 40% da porção protéica enzimaticamente ativa. O alvo preferencial destas duas enzimas é o sistema hemostático de humanos e de outros mamíferos. As metaloproteases são capazes de estimular ou inibir o mecanismo hemostático, incluindo a cascata de coagulação sanguínea, fibrinólise, hipotensão, integridade vascular e função plaquetária.

Entre as principais ações dessa enzima sobre o sistema hemostático, destacam-se a sua capacidade de degradar o fibrinogênio e a fibrina (enzimas fibrin(ogen)oliticas), ativar os fatores V, X, proteína C, antitrombina e plasminogênio, inibir ou ativar a agregação plaquetária, bem como apresentarem atividade semelhante a calicreína plasmática. Além disto, as metaloproteases são potentes

enzimas que apresentam capacidade de degradar componentes da membrana basal (colágeno, fibronectina, laminina) e por consequência promover o extravasamento sanguíneo (hemorragia). Logo, estas proteases são as principais responsáveis pelo sangramento tanto local quanto sistêmico causado pelo envenenamento ofídico [12, 13, 14, 15, 16].

É estimando esta diversidade de proteínas e/ou peptídeos bioativos em peçonha de serpentes e também tamanha aplicabilidade, que este trabalho teve como foco principal buscar dados complementares ao estudo da enzima proteolítica *BthMP (Metaloprotease Bothrops moojeni)* purificada por Gomes et al. (2009) [5], isto tanto em termos estruturais quanto ao biológico funcional, pois dados preliminares indicam uma possibilidade de *BthMP* interferir na coagulação sanguínea.

2.2.1 Purificação da Protease BthMP

Tendo em vista que cerca de 90% do peso seco da peçonha de serpentes é constituído de uma mistura complexa de proteínas [5], o primeiro passo realizado neste estudo foi a purificação da protease *BthMP*, uma metaloprotease da peçonha de serpente do gênero *Bothrops moojeni* (caiçaca), espécie pertencente à família das *Viperídea*. Este procedimento inicial se baseou no protocolo descrito por Gomes et al. (2009) para a obtenção de *BthMP* [5], que é a protease de interesse.

Desta forma, inicialmente, realizou-se o preparo da amostra, que consistiu da diluição de 200mg da peçonha de serpente *Bothrops moojeni* em 2,0mL do tampão bicarbonato de amônio (AMBIC) 0,05 M, a pH 7,8. Uma vantagem da utilização desta solução tampão é a facilidade de eliminação do amônio em uma posterior liofilização da amostra, devido à boa volatilização desta substância.

Por conta da maior propensão das proteínas de sofrerem alterações estruturais, foram tomados os devidos cuidados durante o manuseio da amostra, desde o controle da temperatura, para a não desnaturação, até mesmo ao simples fato de formação excessiva de bolhas, que contribui para a oxidação das macromoléculas [17], e danifica consequentemente os organismos vivos do material biológico, podendo interferir nos dados experimentais futuros.

Estando a peçonha diluída, esta solução foi submetida a uma centrifugação, de onde se extraiu o sobrenadante protéico. Com isso, até aqui foi possível tratar grande quantidade do material biológico da peçonha; aumentar a concentração de proteína, no sobrenadante e; preparar a amostra para ser aplicada em uma cromatografia [17], que foi o passo seguinte.

No processo de purificação de proteínas da peçonha de serpentes, o método analítico de separação comumente usado é a cromatografia líquida de baixa pressão e fluxo lento. Assim, o sobrenadante protéico da peçonha de *B. moojeni* foi submetido à técnica cromatográfica de troca iônica (aniônica) com a resina DEAE-Sepharose® (*Sigma-Aldrich*) previamente equilibrada com tampão AMBIC 0,05M, de pH 7,8 (Figuras 1 e 2), acompanhado de um posterior gradiente convexo de concentração de 0,05-0,50M do AMBIC, pH 7,8, gradiente este estabelecido a partir da fração 85.



Figura 1. Sistema de cromatografia de troca iônica, realizada no LB/UESB (Laboratório de Bioquímica da UESB). Peçonha de serpente B. *moojeni* (em amarelo, no centro da imagem) inserida em uma coluna cromatográfica DEAE-Sepharose com frações coletadas de 3 mL/tubo e fluxo de 20 mL/hora.

As medidas de absorbância obtidas traçaram o perfil das frações e revelaram picos cromatográficos bem definidos, o que possibilitou delimitar e reunir as frações em *pools*, sendo-as liofilizadas em seguida. Os picos selecionados foram denominados de MD1, MD2, MD2a, MD3, MD4, MD5, MD6 e MD7 (Figura 2).

De acordo com propriedades da coluna DEAE-Sepharose e do tampão AMBIC, pode-se conjecturar, qualitativamente, que as frações dos picos iniciais correspondem provavelmente a proteínas da peçonha de *B. moojeni* com caráter neutro ou levemente positivo, enquanto que as frações que interagiram com a resina, picos surgidos depois de estabelecido o gradiente salino, são constituídas por proteínas com caráter de carga negativa (Figura 2).



Figura 2. Representação gráfica da cromatografia de troca iônica DEAE-Sepharose com peçonha da serpente *Bothrops moojeni* e, representação do gradiente convexo de concentração que foi estabelecido a partir da fração 85 de 0,05-0,50M de AMBIC pH 7,8.

Em associação a esta cromatografia, visualizou-se os picos MD's em SDS-PAGE a 14% sob condições desnaturantes. Para isto, destaca-se o perfil eletroforético do MD2 que apresentou uma banda protéica com elevado grau de pureza no gel de eletroforese (Figura 3).

Assim, observa-se que, tanto o delineamento do pico cromatográfico MD2, quanto o seu elevado grau de pureza em SDS-PAGE a 14%, apresentaram aspecto semelhante ao da *BthMP* [5], logo o propósito de purificação de *BthMP* utilizando a metodologia de Gomes et al. (2009) mostrou-se eficiente até aqui. Por isto, o MD2 foi selecionado para o prosseguimento deste estudo.



Figura 3. SDS-PAGE (14%) mostrando o perfil eletroforético de frações cromatográficas (reunidas em *pools*) da peçonha de serpente *Bothrops moojeni* em resina DEAE-Sepharose com um gradiente convexo de concentração 0,05-0,50M do tampão AMBIC pH 7,8.

O próximo procedimento cromatográfico se encarregou de separar as proteínas presentes em MD2 de acordo com a massa molecular, através da cromatografia de exclusão molecular, usando a resina Sephadex-G-75 (*Sigma-Aldrich*). Onde se obtiveram três picos cromatográficos, dos quais foram selecionadas as frações do segundo pico, o qual apresentou elevada semelhança com a protease *BthMP* obtida por Gomes et al., (2009) [5], devido ao seu elevado grau de pureza observado em SDS-PAGE à 14% (Figura 4.).

Além do grau de pureza da proteína, esta eletroforese também mostrou o peso molecular estimado da *BthMP* reduzida, em torno de 23,8 KDa, como também já determinado por Gomes et al. (2009) [5].

Assim, a partir das hipóteses de que: as metaloproteases do tipo zinco dependentes estão presentes em grande quantidade nas peçonhas das serpentes *Viperidae* [9, 12, 14, 15, 18] e de que as metaloproteases da classe PI, consideradas como, estruturalmente, as mais simples das SVMPs, pois apresentam apenas o domínio metaloprotease, variam de peso molecular de 20-30 KDa [12, 15, 18], isto de acordo com a recente classificação proposta por Fox e Serrano (2008) [09], esta protease purificada possivelmente se trata de uma metaloprotease da classe PI. Notou-se também que em todos os procedimentos cromatográficos foram obtidos perfis semelhantes ao de Gomes et al. (2009) [5].



Figura 4. (1) Cromatografia de exclusão molecular de MD2 usando resina Sephadex G-75 com eluição num fluxo de 18 mL/h do tampão AMBIC 0,05M de pH 7,8. **(2)** SDS-PAGE (14%): (A) marcador de peso molecular, (B) 10 μ g da peçonha bruta de serpente *B. moojeni* e (C) 10 μ g de *BthMP* reduzida com β -mercaptoetanol.

A quantificação da protease *BthMP* foi realizada utilizando-se a metodologia estabelecida por Bradford [1], onde demonstrou-se o perfil gráfico da equação da reta utilizada para a dosagem protéica (Figura 5) com nível de confiança de 98%.



Figura 5. Curva de calibração usada para determinar a quantidade de *BthMP* isolada. Elaborada a partir de 0,00; 5,00; 10,0; 15,0; 20,0; 25,0 e 30,0µg da solução padrão BSA (Solução de Soro Albumina 1,0mg/mL) em 3,0mL do reagente de Bradford, os volumes foram completados para 3,10 mL com água deionizada. As medidas foram realizadas em um espectrofotômetro em um λ =585nm.

Estando a *BthMP* isolada e quantificada, foram feitas posteriores caracterizações as quais buscaram confirmar e enriquecer os dados já publicados, através do estudo mais aprofundado da estrutura desta protease, bem como avaliar a sua interferência na coagulação sanguínea.

2.2.2 Caracterização Estrutural da Protease BthMP

Parte da análise estrutural da *BthMP* foi realizada em um Espectrômetro de Massas de Ionização e Dessorção de Matriz Assistida por Laser (MALDI-TOF-MS). Diante da resposta rápida, precisa e sensível que este tipo espectrômetro fornece nas medidas das macromoléculas [7,19], este processo de detecção necessariamente requer uma amostra com elevado grau de pureza, por isso, uma pequena porção de *BthMP* foi submetida ao sistema de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) (Figura 6).



Figura 6. Perfil da cromatografia líquida de alta eficiência da *BthMP*, realizada com uma coluna do tipo µRPC C4 de 4,6x150mm (GE Healthcare Bio-Sciences). Cerca de 200µg de *BthMP* foi diluída em 500µL de solvente A* e aplicada em um sistema de HPLC. Este passo cromatográfico foi eluído com um gradiente linear de 0 a 100% do solvente B**, num fluxo de 0,5mL/min. *Solvente A: acetonitrila 5% em TFA 0,1% (v/v). **Solvente B: acetonitrila 80% em TFA 0,1% (v/v).

Assim, utilizando a amostra proveniente da fase reversa, a qual revelou também elevado grau de pureza, realizou-se a determinação da massa molecular de *BthMP*, de acordo com sua razão m/z (massa/carga) por MALDI TOF, sendo de 23,050 KDa a forma nativa, e quando reduzida, revelou massa molecular de 23,872 KDa (Figura 7). Esta massa molecular condiz com o já estimado anteriormente em SDS-PAGE 14%, que foi em torno de 23,0 KDa, porém em um nível maior de precisão devido a sensibilidade da técnica utilizada.

A forma reduzida desta proteína foi obtida através do uso do agente redutor β-mercaptoetanol, o qual tem a característica de romper ligações dissulfeto da estrutura terciária da proteína [20]. Logo, a diferenciação entre a massa reduzida e nativa indica que, em sua composição estrutural, *BthMP* possui um valor considerável de pontes dissulfeto, as quais são estabelecidas por resíduos de aminoácidos de cisteina. A este respeito, os investigadores Fox e Serrano (2010) expõem que em peçonha de serpentes, especificamente as metaloproteases (*SVMPs*), são caracterizadas por possuírem diversas pontes dissulfeto. Anteriormente, em 2005, estes mesmo autores verificaram, por meio das análises de estruturas cristalizadas de *SVMPs* PI, que estas proteases possuem de duas a três pontes dissulfeto, as quais contribuem na estrutura tridimensional [9] e, consequentemente em sua atividade biológica; entretanto a quantidade de pontes de sulfeto é ainda maior em SVMPs das classes PII e PIII devido à presença dos domínios adicionais [14, 15].

Como exemplos de proteínas extraídas da peçonha de serpentes com peso molecular próximo ao da *BthMP*, incluem-se a *BJ-P12* de *B. jararaca* com 23,080 KDa [21], *Batoraxase* de *B. atrox* com 22,900 KDa [22], *BmooFIB* de *B. moojeni* com 22,700 KDa [23], *BleucMP* de *B. leucurus* com 23,060 KDa [24] e *BbMP-I* de *B. brazili* com 22,930 KDa [25], todos determinadas por MALDI-TOF-MS. Neste contexto, destaca-se a similaridade do peso molecular de *BmooFIB* [23] com o da *BthMP*, confirmando assim a possível existência de isoformas, algo que é comum em proteases que são isoladas de peçonha de serpentes, como é o caso da metaloprotease *Mutalysin II*, isolada a partir do veneno de *Lachesis muta muta*, que possui duas isoformas de massas moleculares similares [26].



Figura 7. Massas moleculares de *BthMP* determinada em MALDI TOF-MS na forma (1) nativa e (2) reduzida.

Também foi determinada uma sequência peptídica desta proteína, para isto *BthMP* foi digerida em solução de tripsina (endopeptidase que fragmenta a proteína em pequenos peptídeos/polipeptídeos) [19] e submetida ao espectrômetro de massa, de onde se obteve o espectro dos fragmentos peptídicos (Figura 8). Este espectro foi analisado utilizando a técnica de bioinformática em MALDI TOF, com o programa Marcot Search Results (*Matrix Science*), o qual revelou score significativo (score de 80 e p<0.05) com a metaloprotease não hemorrágica *BmooMPα-I*, proveniente também da peçonha da serpente do gênero Bothrops *moojeni* [27]. Posteriormente, selecionou-se o peptídeo de massa 1594.793 Da, e, no mesmo aparelho de MALDI TOF, foi aplicada a técnica do tipo duplo TOF, através de análise peptídica conhecida como *Peptide Mass Fingerprinting* (PMF). Com esta metodologia foi possível determinar a sequência do peptídeo 1594.793Da proveniente a digestão da protease *BthMP* (Figura 9).



Figura 8. Perfil do espectro de massas dos fragmentos obtidos pela digestão da *SVMP BthMP* sobre a ação enzimatica da tripsina. Os espectros de massa foram analisados com o *software Mascot Search* e os valores são mostrados em Da (Dalton). A propabilidade observada no score significativo (p<0.05).



Figura 9. Perfil do espectro gerado pela análise do peptídeo 1594.793Da em MALDI TOF utilizando a técnica de *Peptide Mass Fingerprinting* (PMF).

Além de *BmooMPa-I de Bothrops moojeni*, a sequência peptídica obtida pela análise do peptídeo 1594.793Da proveniente de *BthMP* apresentou alta homologia com outras metaloproteases da classe PI (Figura 10), tais como *Atrolysin – E* de *Crotalus atrox* [28] e *BaP1* de *Bothrops asper* [29]. Desta maneira, pode-se afirmar, de acordo com a classificação das metaloproteases apresentadas por Fox e Serrano (2008) [9], que *BthMP* é uma metaloprotease da classe P-I.

CLUSTAL (1.0) multiple sequence alignment

BthMP-------HIELVVVADHGMFKVIPDEVH-----QNQIFR-----QNQIFR-----BmooMPalfa-I-FSPRHIELVVVADHGMFKKYNSNLNTIRKWVHEMVNSMNGFYRSVDVTASLANLEVAtrolysin-EEQQRFPQRYIELAIVVDHGMYTKYSSNFKKIRKRVHQMVSNINEMCRPLNIAITLALLDVBAP1--ERFSPRYIELAVVADHGIFTKYNSNLNTIRTRVHEMLNTVNGFYRSVDVHAPLANLEV

Figura 10. Alinhamento da sequência peptídica proveniente do pico 1594,83Da obtida por PMF com *SVMPs* da classe PI: BmooMPalfa-I de Bothrops moojeni [27]; *Atrolysin – E* de *Crotalus atrox* [28], *BaP1* de *Bothrops asper* [29]. Para analise sequencial foi utilizado o programa de bioinformática *BLAST: Basic Local Alignment Search Tool* (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi).

2.2.3 CARACTERIZAÇÕES ENZIMÁTICAS DA BthMP

Em sua estrutura, as metaloproteases de peçonha de serpentes possuem no seu sítio catalítico um metal ligante (Zn⁺²), este por sua vez é o responsável pela atividade enzimática destas proteases [18]. Por isso, na intenção de testificar o comportamento enzimático da *BthMP*, esta proteína foi submetida a pré-incubação

com o substrato azocaseína e, como resultado pode-se observar que frente a este substrato, *BthMP* apresentou alta atividade proteolítica, mostrando assim seu potencial enzimático proteolítico (Figura 11.).

Em seguida, esta protease foi pré-incubada com os inibidores EDTA e 1,10phenantrolina e posteriormente realizado o ensaio sobre a azocaseína. Notou-se que a atividade proteolítica da *BthMP* foi afetada, devido a eficiência destes complexantes metálicos em formar quelatos estáveis com o íon zinco (Zn²⁺). No entanto, na presença dos reagentes PMSF (Fluoreto de fenilmetilsulfonila) e benzamidina, averiguou-se que a atividade proteolítica desta protease não foi inibida, isto porque os mesmos são inibidores de serinoproteases e não de metaloproteases, logo, mais uma vez, pode-se afirmar que *BthMP* é uma metaloprotease, especificamente zinco dependente. Neste contexto, também chamou atenção a alta inibição proteolítica da *BthMP* frente ao β-mercaptoetanol, mostrando desta maneira, que as pontes dissulfeto são componentes essenciais na manutenção da estrutura tridimensional da protease e por consequência na sua atividade proteolítica (Figura 11).



Figura 11. Efeitos da *BthMP* sobre a Azocaseína, com e sem inibidores enzimáticos. Os agentes inibidores foram pré-incubados separadamente com 5µg de *BthMP* por 40 minutos a 37°C e posteriormente realizado a atividade proteolítica sobre a azocaseína. Os resultados representados são provenientes da média de n=3. * diferença estatística significantes comparadas com atividade de *BthMP*.

2.2.4 Atividade Fibrinogenolítica

Com relação aos alvos enzimáticos das *SVMPs*, são reportadas variabilidades entre as classes das metaloproteases [9]. Por exemplo, *SVMPs* das classes PII e PIII normalmente induzem hemorragia, e da classe PI, não são hemorrágicas ou induzem muito pouca hemorragia, esta disparidade se deve basicamente à presença dos domínios externos *dis-like* e *cys-rich* (em PIII) e um tipo desintegrina (em PII) na estrutura tridimensional destas metaloproteases, os quais facilmente se ligam aos componentes da Membrana Basal (BM) e a células endoteliais, danificando assim os vasos capilares, sem contar que estes domínios externos também se ligam a integrinas de plaquetas, ajudando desta forma para que não ocorra agregação plaquetária e, consequentemente contribuindo para o maior potencial hemorrágico [12, 13, 25].

Enquanto isso, as metaloproteases PI, apesar da pouca ou nenhuma atividade hemorrágica, têm revelado alta atividade proteolítica sobre os componentes da cascata de coagulação sanguínea, especialmente sobre o fibrinogênio (Fator I). Muitas das *SVMPs* da classe PI apresentam este caráter, das quais temos *BJ-P12* de *B. jararaca* em Silva et al. (2012) [21]; *Batroxase* de *B. atrox* em Cintra et al. (2012) [22]; *BmooFIB* de *B. moojeni* em Torres et al. (2012) [23]; *BleucMP* de *B. leucurus* em Gomes et al. (2011) [24]; *BmooMPa-I* de *B. moojeni* em Bernardes et al. (2008) [27]; *BlaH1* de *B. lanceolatus* em Stroka et al. (2005) [30]; *Bothrojaractivase* de *B. jararaca* em Berger et al. (2008) [30]; *BpMP-I* de *B. pauloensis* em Souza et al. (2012) [32]; *BpirMP* de *B. pirajai* em Bernardes et al. (2013) [33]; *BmooAi* de *B. moojeni* em Queiroz et al. (2014) [34]; dentre outras. Estas metaloproteases são chamadas de enzimas fibrinogenoliticas, porque provocam o consumo do fibrinogênio, causando assim uma desfibrin(ogen)ação e, por consequência, tornando o sangue mais fluido e aumentando o tempo de coagulação [18].

As enzimas fibrinogenolíticas degradam as cadeias A α e B β do fibrinogênio, com maior preferência pela cadeia A α e dificilmente alcançam a cadeia γ [12]. Isso ocorre por causa da presença do íon metálico (Zn^{2+}) situado no sítio catalítico das *SVMPs* PI. Este comportamento também é comumente analisado através da inibição da atividade fibrinogenolítica destas metaloproteases frente a ação de agentes quelantes, como foi observado em *BaltMP-I* e *II* de *B. alternatus* por Costa et al. (2007) [35]. Diante disto, a atividade fibrinogenolítica da *BthMP* foi verificada através da incubação de fibrinogênio bovino com *BthMP* (Figura 12), onde foi possível observar que em apenas 5 minutos esta protease degradou completamente a cadeia A α e parcialmente a cadeia B β do fibrinogênio. E, com 10 minutos de incubação, a cadeia B β se mostrou praticamente hidrolisada pela ação proteolítica desta enzima. Sendo assim, pode-se designar *BthMP* como uma metaloprotease fortemente fibrinogenolítica, pertencendo desta forma à classe das α e β -fibrinogenases.



Figura 12. Perfil da digestão do fibrinogênio bovino em eletroforese de poliacrilamida (PAGE-SDS a 14%). Para este ensaio foram utilizados 50 µL de Solução de fibrinogênio bovino 1,5mg/mL incubados com 5µg de *BthMP* a 37°C em diferentes intervalos de tempos. A – Fibrinogênio controle. B-F: Fibrinogênio incubado com 4µg de *BthMP* por 5, 10, 15, 30 e 60 minutos, respectivamente.

No sistema circulatório humano, o fibrinogênio (fator I da cascata de coagulação) é uma proteína circulante do sangue que participa do complexo sistema de coagulação sanguínea. Sua principal atividade resulta na formação do coágulo de fibrina e se inicia a partir da ação da trombina (fator II), por meio de ativações em séries com os demais componentes participantes da cascata de coagulação [36, 37, 38].

Diante disto, percebe-se que a degradação do fibrinogênio provocada *por BthMP*, e por consequência o efeito de incoagulabilidade sanguínea leva a sugerir uma possível aplicação clínico-terapêutica para desordens relacionadas ao sistema hemostático.

Esta característica de interferência na coagulação sanguínea da protease *BthMP* foi verificada inicialmente por Gomes et al. (2009) [5], quando a protease foi injetada intraperitoneal em camundongos machos sadios da raça *swiss*, onde se

observaram a incoagulabilidade sanguínea nestes animais, devido, segundo estes pesquisadores, à provável capacidade desta metaloprotease em degradar fibrinogênio *in vivo* e de não ser inibida por fatores exógenos [5]. Por isso, ainda com este propósito, contemplamos esta propriedade da *BthMP* através da quantificação de fibrinogênio plasmático, onde verificou-se que esta metaloprotease provocou o consumo do fibrinogênio de maneira significativa (Figura 13), assim como, quando avaliada *in vitro* (Figura 12), desta forma, pode-se concluir que *BthMP* é uma enzima fibrinogenolítica que não sofre a interferência de fatores endógenos.

Vale ressaltar que a ação específica de enzimas sobre o fibrinogênio é muito importante, tendo em vista que o fibrinogênio (Fator I) é abundante no plasma e desempenha papel fundamental na hemostasia. Nas reações inflamatórias, tem provável papel no reparo tecidual e na cicatrização, sem contar que a dosagem sanguínea do fibrinogênio permite aos profissionais da área de saúde identificar patologia relacionada à coagulação [36, 37, 38].

Assim, atividade anticoagulante, somando-se ao fato de ser fracamente hemorrágica e de não ser inibida por fatores endógenos, são características da *BthMP* que sugerem a capacidade de esta metaloprotease ser uma forte candidata a modelo de fármacos antitrombóticos.



Figura 13. Dosagem do fibrinogênio plasmático utilizando 10µg da peçonha de *Bothrops moojeni* e 10 µg de *BthMP* diluído em 50µL de solução salina 0,9%. Como controle foi utilizado 50µL de salina. O resultado representa a média de n=3 e a significância relativa ao controle.

2.2.5 Tempo de Protrombina (TP) e Tempo de Tromboplastina Parcial ativada (TTPa)

Outra forma de analisar o sistema hemostático é através dos testes comumente utilizados na área clínica para diagnosticar distúrbios relacionados à coagulação, são os conhecidos testes *screening* [39]. Destes, o Tempo de Protrombina (TP) e o Tempo de Tromboplastina Parcial ativada (TTPa) avaliam anormalidades nos fatores da cascata de coagulação sanguínea.

O TP é um teste que avalia a via extrínseca e a via final comum (fatores VII, X, V, II e o fibrinogênio) e o TTPa avalia os fatores da via intrínseca e da via final comum (XII, XI, IX, VII, X, V, II e fibrinogênio) [39, 40]. Por isso, foi analisado a interferência da *BthMP* nos tempos de protrombina e de tromboplastina parcial ativada (Figura 14).

Em seus resultados, normalmente o TTPa pode variar entre 25 e 39 segundos, enquanto que TP de 10 a 14 segundos [41]. Observando os valores destes parâmetros frente à *BthMP*, verificou-se uma média de 186 segundos para TTPa e de 182 segundos para TP, respectivamente (Figura 14), isto informa que o tempo de ambos (TTPa e TP) foram prolongados, desta forma, pode-se sugerir que *BthMP* interfere em fatores da coagulação sanguínea da via extrínseca, intrínseca e também da via final comum, especialmente sobre o fibrinogênio plasmático, conforme testificado nas análises anteriores. Com isso, presume-se que a formação de coágulo de fibrina é comprometida quando *BthMP* se encontra no meio, assim, mais uma vez pode-se inferir que esta metaloprotease é uma protease com ação anticoagulante.



Figura 14. Determinação do TP (Tempo de Trombina) e do TTPa (Tempo de Tromboplastina Parcial ativado). Média do tempo de coagulação de salina (controle), do TP e TTPa através da incubação com 10 µg de *BthMP* por 3 horas (n=3).

Diante dos resultados mostrados nesta investigação, segue a baixo um resumo do estudo da *BthMP*:



Figura 15. Representação simplificada do estudo da BthMP.

Assim, olhando em sua totalidade, percebe-se neste estudo o potencial da *BthMP* como uma metaloprotease PI que possui ação sobre o sistema hemostático, especialmente sobre o fibrinogênio (fator I da cascata de coagulação), o que lhe confere a característica de enzima fibrinogenolítica com a provável utilização como modelo molecular de fármaco anticoagulante.

Porém, visto que existem diversos fatores estruturais e biológicos funcionais envolvidos neste processo, pode-se afirmar que esta investigação consistiu do aprofundamento e consolidação de alguns resultados, até então não relatados na literatura sobre a *BthMP*, como a confirmação da massa molecular em um nível elevado de precisão, a determinação da sequência peptídica, o que ocasionou também a confirmação de esta ser uma metaloprotease pertencente a classe PI, o fato de esta protease não ser inibida por fatores endógenos, a ação sobre o fibrinogênio e sobre as vias extrínseca e intrínseca avaliados em testes laboratoriais específicos para os fatores da cascata de coagulação.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com isso, percebe-se que este estudo complementa os dados já descritos por Gomes et al. (2009) [5] e pode-se concluir que esta enzima apresenta a capacidade de ser utilizada como modelo para a elaboração de um novo fármaco antitrombótico. Faz-se importante salientar que para tal são necessários testes mais aprimorados para o conhecimento das consequências e ação desta enzima no organismo humano.

REFERÊNCIAS

[1] BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgam quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem**. 72, p. 248-54, 1976.

[2] LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄. **Nature.** 227, p. 680-685, 1970.

[3] PERKINS, D. N.; PAPPIN, D. J.; CREASY, D. M. Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. **Electrophoresis.** 20, p. 3551-3567, 1999.

[4] JOHNSON, M.; ZARETSKAYA, I.; RAYTSELIS, Y. NCBI BLAST: a better web interface. **Nucleic Acids Research.** 36, W5–W9, 2008.

[5] GOMES, M. S. R.; MENDES, M. M.; OLIVEIRA, F.; ANDRADE, R. M.; BERNARDES, C. P.; HAMAGUCHI, A.; ALCÂNTARA, T. M.; SOARES, A. M.; RODRIGUES, V. M.; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I. BthMP: a new weakly hemorrhagic metalloproteinase from *Bthrops moojeni* snake venom. **Toxicon**. 53, p. 25-32, 2009.

[6] BINNECK, E. As ômicas: integrando a bioinformação. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, n. 32, p. 28-37, jan./jun. 2004. Disponível em: www.biotecnologia.com.br. Acesso em: 08 jul. 2015.

[7] PIMENTA, A. M. C. Os desafios do proteoma. **Ciência Hoje**, v. 32, n. 192, p. 16-22, abr. 2003.

[8] SILVA, A. M. S. Proteomica: uma abordagem funcional do estudo do genoma. **Saúde & Ambiente em Revista**, Duque de Caxias, v. 2, n. 2, p. 01-10, jul./dez. 2007.

[9] FOX, J. W.; SERRANO, S. M. T. Snake Venom Metalloproteinases. In: MACKESSY, S. P. **Handbook of venoms and toxins of reptiles**. Taylor & Francis Group, Cap. 4, p. 95-113, 2010.

[10] ZELANIS, A. Abordagens sistêmicas em toxinologia: Perspectivas e implicações de metodologias ômicas no estudo de toxinas de venenos de serpentes. **Estudo Biol., Ambiente Divers.**, v. 34, n. 83, p. 143-147, jul./dez. 2012.

[11] LIU, CUI-CUI; YANG, H.; ZHANG, LING-LING; ZHANG, Q.; CHEN, B.; WANG, Y. Biotoxins for Cancer Therapy. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 15, p. 4753-4758, 2014.

[12] SAJEVIC, T.; LEONARD, A.; KRIŽAJ, I. Haemostatically active proteins in snake venoms. **Toxicon**, v. 57, p. 627-645, 2011.

[13] GASANOV, S. E.; DAGDA, R. K.; RAEL, E. D. Snake Venom Cytotoxins, Phospholipase A_2s , and Zn^{2+} -dependent Metalloproteinases: Mechanisms of Action and Pharmacological Relevance. **J Clinical Toxicol**, 4:181, p. 1-14, 2013.

[14] ESCALANTE, T.; RUCAVADO, A.; FOX, J. W.; GUTIÉRREZ, J. M. Key events in microvascular damage induced by snake venom hemorrhagic metalloproteinases. **Journal of Proteomics**. 74, p. 1781-1794, 2011.

[15] RODRIGUES, R. S.; BOLDRINI-FRANÇA, J.; FONSECA, F. P. P., TORRE, P. L.; HENRIQUE-SILVA, F.; SANZ, L.; CALVETE, J. J.; RODRIGUES, V. M. Combined snake venomics and venom gland transcriptomic analysis of *Bothropoides pauloensis*. Journal of Proteomics. 75, p. 2707-2720, 2012.

[16] SELISTRE-DE-ARAÚJO, H. S. & FERREIRA DE SOUZA, D. H. Métodos em Toxinologia (toxinas de serpentes). **São Carlos, Ed. UFSCar**, 258, 2007.

[17] ALMEIDA, M. S.; KURTENBACH, E. Como Purificar Proteínas? **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**. n. 24, p. 30-35, jan./fev. 2002. Disponível em: www.biotecnologia.com.br. Acessado em: 08 jul. 2015.

[18] GUTIÉRREZ, J. M.; RUCAVADO, A.; ESCALANTE, T. Snake Venom Metalloproteinases: Biological Roles and Participation in the Pathophysiology of Envenomation. In: MACKESSY, S. P. **Handbook of venoms and toxins of reptiles**. Taylor & Francis Group. Cap. 5, p. 115-138, 2010.

[19] MAZUMDAR, S.; BANERJEE, S. Electrospray Ionization Massa Spectrometry: A Technique to Access the Information beyond the Molecular Weight of the Analyte. **International Journal of Analytical Chemistry**, v. 2012, p. 1-41, 2011.

[20] OLIVEIRA JUNIOR, F. O. R. Introdução à Bioquímica de Proteínas. In: MORAES, C. S.; OLIVEIRA JUNIOR, F. O. R.; MASSON, G.; REBELLO, K. M.; SANTOS, L. O.; BASTOS, N. F. P.; FARIA, R. C. R. **Série em Biologia Celular e Molecular**: Métodos instrumentais no estudo de proteínas. Rio de Janeiro: FIOCRUZ. Cap. 1, p. 9-23, 2013.

[21] SILVA, I. R. F.; LORENZETTI, R.; RENNÓ, A. L.; BALDISSERA JÚNIOR, L. ZELANIS, S. M. T. S.; HYSLOP, S. BJ-P12, a non-hemorrhagic metalloproteinase from *Bothrops jararaca* snake venom. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1820, p. 1809-1821, 2012.

[22] CINTRA, A. C. O.; DE TONI, L. G. B.; SARTIM, M. A.; FRANCO, J. J.; CAETANO, R. C.; MURAKAMI, M. T.; SAMPAIO, S. V. Batroxase, a new metalloproteinase from *B. atrox* snake venom with strong fibrinolytic activity. **Toxicon**, 60, p. 70-82, 2012.

[23] TORRES, F. S.; GOMES, M. T. R.; SALAS, C. E.; PIMENTA, A. M. C.; OLIVEIRA, F.; SANTORO, M. M.; DE LIMA, M. E. BmooFIBMP-I: A new fibrinogenolytic metalloproteinase from *Bothrops moojeni* snake venom. **ISRN Toxicology**, v. 2012, p. 1-10, 2012.

[24] GOMES, M. S. R.; QUEIROZ, M. R.; MAMEDE, C. C. N.; MENDES, M. M.; HAMAGUCHI, A.; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I.; SOUSA, M. V.; AQUINO, E. N.; CASTRO, M. S.; OLIVEIRA, F.; RODRIGUES, V. M. Purification and functional characterization of a new metalloproteinase (*BleucMP*) from *Bothrops leucurus* snake venom. **Comp Biochem Physiol C**,153, p. 290-300, 2010.

[25] KAYANO, A. M.; SIMÕES-SILVA, R.; MEDEIROS, P. S. M.; MALTAROLLO, V. G.; HONORIO, K. M.; OLIVEIRA, E.; ALBERICIO, F.; SILVA, S. L.; AGUIAR, A. C. C.; KRETTLI, A.; FERNANDES, C. F. C.; ZULIANI, J. P.; CALDERON, L. A.; STÁBELI, R. G. SOARES, A. M. BbMP-1, a new metalloproteinase isolated from *Bothrops brazili* snake venom with in vitro antiplasmodial properties. **Toxicon**. v. 106, p. 30-41, 2015.

[26] SANCHEZ, E. F.; SOUZA, C. T.; BELLO, C. A.; RICHARDSON, M.; OLIVEIRA, E. B.; MAGALHAES, A. Resolution of isoforms of mutalysin II, the metalloproteinase from *bushmaster* snake venom. **Toxicon**, v. 41, p. 1021-1031, 2003.

[27] BERNARDES, C. P.; SANTOS-FILHO, N. A.; COSTA, T. R.; GOMES, M. S. R.; TORRES, F.S.; COSTA, J.; BORGES, M. H.; RICHARDSON, M.; SANTOS, D. M.; PIMENTA, A. M. C.; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I.; SOARES, A. M.; OLIVEIRA, F. Isolation and structural characterization of a new fibrin(ogen)olytic metalloproteinase from *Bothrops moojeni* snake venom. **Toxicon**, v. 51, p. 574-584, 2008.

[28] SANCHEZ, E. F.; SCHNEIDER, F. S.; YARLEQUE, A.; BORGES, M. H.; RICHARDSON, M.; FIGUEIREDO, S. G.; EVANGELISTA, K. S.; EBLE, J. A.; The novel metalloproteinase atroxlysin-I from Peruvian *Bothrops atrox* (Jergón) snake venom acts both on blood vessel ECM and patelets. **Arch Biochem Biophys.** v. 496, p. 09-20, 2010.

[29] WATANABE, L., SHANNON, J.D., VALENTE, R.H., RUCAVADO, A., ALAPEI-GIRÓN, A., KAMIGUTI, A.S., THEAKSTON, R.D., FOX, J.W., GUTIERREZ, J.M., ARNI, R.K., Amino acid sequence and crystal structure of BaP1, a metalloproteinase from Bothrops asper snake venom that exerts multiple tissue-damaging activities. **Protein Sci.** 12, p. 2273-81, 2003.

[30] STROKA, A.; DONATO, J. L.; BON, C.; HYSLOP, S.; ARAÚJO, A. L. Purification and characterization of a hemorrhagic metalloproteinase from Bothrops lanceolatus (Fer-de-lance) snake venom. **Toxicon**, v. 25, p. 411-420, 2005.

[31] BERGER, M.; PINTO, A. F. M.; GUIMARÃES, J. A. Purification and caracterization of bothrojaractivase, a prothrombin-activating metalloproteinase isolated from *Bothrops jararaca* snake venom. **Toxicon**, v. 51, p. 488-501, 2007.

[32] SOUZA, D. L. N.; GOMES, M. S. R.; FERREIRA, F. B.; RODRIGUES, R. S.; ACHÊ, D. C.; RICHARDSON, M.; BORGES, M. H.; RODRIGUES, V. M. Biochemical and enzymatic characterization of BpMP-I, a fibrinogenolytic metalloproteinase isolated from Bothropoides pauloensis snake venom. **Comp Biochem Physiol B.** v. 161, p. 102-109, 2012.

[33] BERNARDES, C. P.; MENALDO, D. L.; CAMACHO, R.; ROSA, J. C.; ESCALANTE, T.; RUCAVADO, A.; LOMONTE, B.; GUTIÉRREZ, J. M.; SAMPAIO, S.

V. Proteomic analysis of *Bothrops pirajai* snake venom and characterization of BpirMP, a new P-I metalloproteinase. **J Proteomics**, v. 80, p. 250-267, 2013.

[34] QUEIROZ, M. R.; MAMEDE, C. C. N.; MORAIS, N. C. G.; FONSECA, K. C.; SOUSA, B. B.; MIGLIORINI, T. M.; PEREIRA, D. F. C.; STANZIOLA, L.; CALDERON, L. A.; SIMÕES-SILVA, R., SOARES, A. M.; OLIVEIRA, F. Purification and characterization of BmooAi: a new toxin from Bothrops moojeni snake venom that inibits platelet aggregation. **Biomed Res Int.** v. 2014, p. 01-07, 2014.

[35] COSTA, J. O.; PETRI, C. B.; HAMAGUCHI, A.; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I.; OLIVEIRA, C. Z.; SOARES, A. M.; OLIVEIRA, F. Purification and functional characterization of two fibrinogenolytic enzymes from *Bothrops alternatus* venom. J. Venom. **Anim. Toxins. incl. Trop. Dis**, v. 13, p. 640-654, 2007.

[36] FRANCO, R. F. Fisiologia da coagulação, anticoagulação e fibrinólise. **Medicina**, Ribeirão Preto, n. 34, p. 229-237, jul./dez. 2001.

[37] GUYTON, A. C.; HALL, J. E. Hemostasia e Coagulação Sangüínea. In: GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Tratado de Fisiologia Médica**. 9. ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A. Cap. 36, p. 420-430, 1997

[38] RAND, M. L.; MURRAY, R. K. Hemostasia e Trombose. In: MURRAY, R. K. **Harper:** Bioquímica Ilustrada. 26. ed. São Paulo: Atheneu Editora, 2006. Cap. 51, p. 598-609.

[39] RIZZATTI, E. G.; FRANCO, R. F. Investigação diagnóstica dos distúrbios hemorrágicos. **Medicina**, Ribeirão Preto, 34, p. 238-247, jul./dez. 2001.

[40] LABTEST. Guia técnico: Coagulação. p. 15, 2009. Disponível em: < www.labtest.com.br/download.php?a=5491> Acessado em 01/11/2015.

[41] CAGNOLATI, D.; SANKARANKUTTY, A. K.; ROCHA, J. P. S.; BEER, A.; CASTRO E SILVA, O. Hemostasia e distúrbios da coagulação. Ribeirão Preto. Disponívelem:http://rca.fmrp.usp.br/servico/gastro/documentos/cirurgia/gastro/capitulos/hemostasia_revisado.pdf Acessado em 30/10/2015.



Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia – UESB Autorizada pelo Decreto Estadual nº 7344 de 27.05.98 Comitê de Ética No Uso de Animais – CEUA / UESB

Concordância do Comitê de Ética no Uso de Animais - CEUA

O Protocolo 25/2013 referente ao projeto "Purificação e caracterização bioquímica de proteases de peçonhas botrópicas (*familia viperidae*) e interação com o sistema hemostático" sob responsabilidade do Dr Mário Sérgio Rocha Gomes foi **APROVADO** conforme determinação da reunião ocorrida em 25/03/2013 e reiterada pela reunião de 03/06/2013.

Lembramos ao pesquisador que:

 O responsável pelo projeto ou protocolo encaminhará à CEUA, ao final do estudo, um relatório de uso de animais. O relatório deverá conter informações básicas acerca do projeto ou protocolo de acordo com o roteiro publicado em conjunto com a RN nº 4 do CONCEA.

 No caso da necessidade da continuidade dos projetos ou protocolos usando animais para fins científicos ou didáticos é obrigatório o envio do Relatório à CEUA acrescido da justificativa.

 Para os casos da continuidade de projetos ou protocolos, após a análise do relatório e de esclarecimentos adicionais, se necessário, a CEUA pode deferir, suspender, ou requerer modificação dos mesmos, dentro de suas atribuições.

Itapetinga, 27 de Junho de 2013

Jouia Martins Teachers

Dr^a. Sônia Martins Teodoro Coordenadora CEUA/UESB