



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

**SEQUENCIAMENTO COMPLETO E ESTRUTURA
CRISTALOGRÁFICA DA METALOPROTEASE
LEUCUROLISINA-A, PURIFICADA DO VENENO DE
Bothrops leucurus.**

Rodrigo Novaes Ferreira

Orientador: Prof. Dr. Adriano Monteiro de Castro Pimenta

Co-orientador: Dr. Eládio Oswaldo Flores Sanchez

Co-orientador: Prof. Dr. Ronaldo Alves Pinto Nagem

Universidade Federal de Minas Gerais

Belo Horizonte

2009

Rodrigo Novaes Ferreira

SEQUENCIAMENTO COMPLETO E ESTRUTURA CRISTALOGRÁFICA
DA METALOPROTEASE LEUCUROLISINA-A, PURIFICADA DO
VENENO DE *Bothrops leucurus*.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Bioquímica e Imunologia do Instituto de
Ciências Biológicas da Universidade Federal de
Minas Gerais como requisito para obtenção do
título de Doutor em Ciências com ênfase em
Bioquímica e Imunologia.

Orientador: Prof. Dr. Adriano Monteiro de Castro Pimenta

Co-orientador: Dr. Eládio Oswaldo Flores Sanchez

Co-orientador: Prof. Dr. Ronaldo Alves Pinto Nagem

Universidade Federal de Minas Gerais

Belo Horizonte

2009

Trabalho realizado no Laboratório de Venenos e Toxinas Animais (ICB/UFMG), no Laboratório de Biologia Estrutural (ICB/UFMG) e no Laboratório de Química de Proteínas no Centro de Pesquisa Carlos Ribeiro Diniz da Fundação Ezequiel Dias (FUNED), com o auxílio das seguintes Agências e Centros de apoio à Pesquisa:

- FAPEMIG - Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais.
- CNPq - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico.
- MCT-FINEP - Ministério de Ciência e Tecnologia/Financiadora de Estudos e Projetos.
- LNLS - Laboratório Nacional de Luz Síncrotron.

“Devemos julgar um homem mais pelas suas perguntas que pelas suas respostas”.

Voltaire.

Agradecimentos

Agradeço aos meus pais que com muita luta, amor e carinho guiaram-me no caminho do bem.

Agradeço a minha amada esposa Melissa, Manu e Tunico (meus melhores trabalhos) pelo carinho, paciência e compreensão nesta jornada.

Agradeço à Professora Dra. Maria Elena de Lima Perez, pela oportunidade dada em seu laboratório.

Agradeço aos Professores Dr. Adriano Monteiro de Castro Pimenta e Dr. Ronaldo Alves Pinto Nagem, pela paciência e os bons momentos vividos nestes anos.

Agradeço ao Departamento de Bioquímica e Imunologia (ICB/UFMG) pelo suporte e apoio para a realização desse trabalho.

Agradeço aos meus companheiros do LVTA: Thiago Verano, Marcela, Paula Ciscotto, Flávia, Filipe, Vitor, Fernanda, Julinho, Rates, Agenor, Joacir, Gisele, Lela e Ana Paula, que tornaram essa jornada mais alegre, prazerosa e divertidíssima (com certeza).

Sumário

Resumo	8
Abstract.....	9
Lista de Figuras	10
Lista de Tabelas	12
Lista de Gráficos.....	13
1 - INTRODUÇÃO.	14
1.1 - Serpentes.	15
1.2 - Serpentes peçonhentas e não-peçonhentas.	15
1.3 - A glândula de veneno.	18
1.4 - Ofidismo: um caso de saúde pública.	19
1.5 - Distribuição dos acidentes entre os principais gêneros de serpentes brasileiras de importância médica.	22
1.6 - Distribuição geográfica e breve caracterização dos sintomas associados aos acidentes ofídicos envolvendo os principais gêneros de importância médica no Brasil.	24
1.7 - Componentes bioquímicos do veneno.	27
1.8 - Metaloproteinasas dos venenos de serpentes (SVMP).	28
1.9 - O mecanismo de catálise proposto para as SVMPs e formas de inibição.	30
1.10 - Possível utilização das SVMPs como fármacos trombolíticos.	32
2 - OBJETIVOS.	35
2.1 - Objetivo geral.....	36
2.2 - Objetivos específicos.	36
3.1 - Purificação da leucurolisina-a nativa.....	38
3.2 - Seqüenciamento da estrutura primária da leucurolisina-a nativa.	38
3.3 - Cristalização da leucurolisina-a nativa. (Rates et al., 2008)	39
3.4 - Aquisição de dados e determinação da estrutura tridimensional da leucurolisina-a.....	40
3.5 - Diálise da leucurolisina-a nativa.	41
3.6 - Síntese dos peptídeos sintéticos.....	41
3.7 - Ensaio de inibição da atividade proteolítica da leucurolisina-a sobre a dimetilcaseína.	42

3.8 - Análise de superfície molecular.	43
3.9 - SDS-PAGE da inibição da atividade proteolítica da leucurolisina-a sobre o fibrinogênio humano.	44
3.10 - Gráficos.	45
4.1 - Sequenciamento dos resíduos de aminoácidos da leucurolisina-a	47
4.2 - Cristalização e difração de raios-X da leucurolisina-a nativa.	49
4.3 - Descrição da estrutura do modelo cristalográfico da enzima livre (modelo com 1,8 Å de resolução).	53
4.4 - Ambiente de ligação do íon zinco.	57
4.5 - Ambiente de ligação do íon cálcio.	62
4.6 - Refinamento da estrutura da enzima em complexo e possível identificação da densidade eletrônica inesperada.	64
4.7 - Testes de inibição da leucurolisina-a com o peptídeo Gly-Ser.	70
4.8 - Possíveis interações entre o peptídeo Gly-Ser e o ambiente do sítio catalítico da metaloprotease leucurolisina-a.	72
4.9 - A interação entre inibidor e íon metálico seria importante para a inibição da atividade da leuc-a?	79
4.10 - Determinantes estruturais para o efeito hemorrágico/não-hemorrágico: um problema inquietante e de difícil resolução.	83
4.11 - A análise de estruturas primárias de SVMP de classe P-I poderia elucidar o problema?	83
4.12 - Comparações entre estruturas terciárias de SVMP de classe P-I: Seria esta uma abordagem mais apropriada para resolver o problema?	87
4.13 - Algumas metodologias que podem ajudar a solucionar o problema.	94
5 - CONCLUSÕES.	97
6 - PERSPECTIVAS.	99
7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.	101

Resumo

Leucurolisina-a (leuc-a) é uma metaloprotease de veneno de serpente (SVMP) de classe P-I presente no veneno de *Bothrops leucurus*. A leuc-a teve sua estrutura primária completamente seqüenciada, apresentando uma única cadeia polipeptídica com 202 resíduos de aminoácidos e alta similaridades com outras SVMPs de classe P-I já descritas. A leuc-a, mesmo em altas concentrações, não provoca hemorragia, apresentando apenas atividade proteolítica em proteínas de matriz extracelular. Essa enzima foi cristalizada, pelo método de difusão de vapor, e dois conjuntos de dados de difração de raios-x, um a 1,8 e outro a 1,6 Å, foram coletados. Os dados mostraram que os cristais pertencem ao grupo espacial $P2_12_12_1$, com parâmetros de célula unitária muito similares. A estrutura cristalográfica da leuc-a foi resolvida pelo método de substituição molecular usando o modelo da metaloproteinase BaP1 (PDB code 1ND1) purificada do veneno da serpente *Bothrops asper*. O modelo da leuc-a, a 1,8 Å de resolução, foi refinado até um $R_{\text{fator}} = 0,168$ e $R_{\text{livre}} = 0,235$. A estrutura apresenta o conservado motivo de ligação ao zinco $H_{142}E_{143}XXH_{146}XXG_{149}XXH_{152}$ assim como o motivo “*met turn*” $C_{164}I_{165}M_{166}$, característico da superfamília metzincina. Um átomo de zinco foi observado no sítio catalítico da enzima sendo estabilizado pelos $N\epsilon 2$ dos três anéis imidazólicos dos resíduos de histidinas $H_{142}H_{146}H_{152}$ e uma molécula de água entre o espaço do átomo de zinco e a cadeia lateral do resíduo E_{143} . Um íon cálcio também foi observado unido das extremidades N e C-terminais da estrutura. Esse átomo é estabilizado por duas moléculas de água e cinco átomos presentes nas cadeias laterais de resíduos conservados: o oxigênio da carbonila do resíduo Glu_9 ; os dois oxigênios do carboxilato do resíduo Asp_{93} , o oxigênio da carbonila do resíduo Cys_{197} e o oxigênio da carboxamida do resíduo Asn_{200} . A leuc-a possui seis resíduos de cisteína (Cys_{117} - Cys_{197} , Cys_{157} - Cys_{164} , and Cys_{159} - Cys_{181}) envolvidos na formação de pontes dissulfeto. A resolução de outro conjunto de dados, com 1,6 Å de resolução, apresentou uma densidade eletrônica desconhecida no sítio catalítico da enzima. Esse ligante foi identificado, sintetizado e utilizado com sucesso em ensaios de inibição da atividade proteolítica da leuc-a.

Abstract

Leucurolysin-a (leuc-a) is a P-I class snake venom metalloproteinase (SVMP) from the venom of *Bothrops leucurus*, a poisonous snake which is responsible for the majority of snakebites in the northeast of Brazil. It has been shown that leuc-a degrades fibrin clots directly *in vitro* without activating plasminogen (Pg), and does not elicit any hemorrhagic response. Leuc-a is a single chain zinc binding endopeptidase composed of 202 amino acids residues, which shows high similarity with other P-I SVMPs. In this work, leuc-a was crystallized using the hanging-drop vapour-diffusion method. Two data set were collected, one with 1.8 Å, and other with 1.6 Å. Data sets showed that the crystals belongs to the orthorhombic $P2_12_12_1$ space group, with unit-cell parameters very similar. The crystallographic structure of leuc-a was solved by Molecular Replacement technique using the *Bothrops asper* metalloproteinase (BaP1) structure (PDB code 1ND1) as template. Leuc-a model was refined to a final R_{factor} of 0.168 and R_{free} of 0.235 against diffraction data of 1.80 Å of resolution. The structure displayed the zinc binding motif $H_{142}E_{143}XXH_{146}XXG_{149}XXH_{152}$ as well as the $C_{164}I_{165}M_{166}$ motif (“Met-turn”), which characterize the metzincin superfamily of metalloproteinases. A Zn^{2+} ion was observed in the active site cleft of the enzyme and one structural Ca^{2+} ion was assigned on the molecular surface close to its C-terminal. The Zn^{2+} ion was tetra-coordinated by three imidazole $N^{\epsilon 2}$ atoms from H_{142} , H_{146} and H_{152} and one catalytic water molecule anchored to the side-chain carboxyl group of E_{143} . Leuc-a has six cysteine residues involved in three disulfide bridges (Cys_{117} - Cys_{197} , Cys_{157} - Cys_{164} , and Cys_{159} - Cys_{181}). The other data set, with 1.6 Å of resolution, was refined to a final R_{factor} of 0.178 and R_{free} of 0.231. This model showed a unknown electron density at active site. This ligand was identified, synthesized and tested with leuc-a. The results showed a inhibition of proteolytic activity leuc-a over dimethyl casein.

Lista de Figuras

- Figura 1** - Critérios de identificação entre serpentes peçonhentas e não-peçonhentas.
- Figura 2** - Tipos de dentição presentes em serpentes.
- Figura 3** - Localização da glândula de veneno em serpentes.
- Figura 4** - Mecanismo de catálise proposto para as metaloproteases.
- Figura 5** - Espectro de massa da leucurolisina-a nativa.
- Figura 6** - Alinhamento de seqüências e estrutura secundária da leucurolisina-a e outras SVMP de classe P-I da família Viperidae.
- Figura 7** - Cristais e espectro de massa dos cristais de leucurolisina-a.
- Figura 8** - Modelo cristalográfico da proteína não-hemorrágica leucurolisina-a a 1,8 Å de resolução.
- Figura 9** - Ambiente de ligação do íon zinco no sítio catalítico da leuc-a.
- Figura 10** - Resíduos de aminoácidos presentes no sítio catalítico da leuc-a.
- Figura 11** - Alinhamento dos resíduos de aminoácidos presentes nos sítios catalíticos dos modelos cristalográficos das SVMP de classe P-I disponíveis com a leuc-a.
- Figura 12** - Coordenação entre o íon cálcio e seus ligantes no modelo cristalográfico da enzima livre.
- Figura 13** - Modelo cristalográfico da enzima em complexo.
- Figura 14** - Sobreposição dos modelos da leuc-a (enzima livre e enzima em complexo).
- Figura 15** - Localização da densidade eletrônica desconhecida presente no sítio catalítico do modelo da enzima em complexo.
- Figura 16** - Interpretação da densidade eletrônica desconhecida presente no sítio catalítico do modelo da enzima em complexo.
- Figura 17** - localização do dipeptídeo GS no sítio catalítico da leuc-a.
- Figura 18** - Superfície molecular das enzimas TM-3 e F2 com seus inibidores endógenos.
- Figura 19** - Possíveis interações do dipeptídeo GS com o sítio catalítico da leuc-a.
- Figura 20** - Possíveis interações entre o tripeptídeo *p*EKW e o ambiente do sítio catalítico da enzima TM-3 (código PDB 1KUK - Huang *et al.* 2002).
- Figura 21** - Possíveis interações entre o tripeptídeo KNL e o ambiente do sítio catalítico da enzima F2 (código PDB 1YP1 - Lou *et al.* 2005).

Figura 22 - Ensaio de inibição da atividade proteolítica da leuc-a sobre o fibrinogênio humano usando o peptídeo GS-_{NH2}.

Figura 23 - Comparação entre os resultados obtidos por Gasmi e colaboradores (2000) e os resultados desse trabalho.

Figura 24 - Alinhamento dos modelos cristalográficos das SVMP de classe P-I disponíveis com a leuc-a.

Figura 25 - Representação da superfície acessível ao solvente, colorida por potencial eletrostático, das SVMP de classe P-I com estrutura cristalográfica resolvida.

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Procedência das notificações segundo as regiões fisiográficas do Brasil nos períodos de 1990–1993 e 2005.

Tabela 2 - Número de casos de acidentes ofídicos e letalidade por gênero de serpente no Brasil nos períodos de 1990–1993 e 2005.

Tabela 3 - Sumário estatístico dos dados de difração dos cristais de leucurolisina-a.

Tabela 4 - Sumário estatístico dos dados de refinamento do modelo da enzima livre.

Tabela 5 - Distâncias atômicas entre o íon zinco e seus ligantes, no modelo cristalográfico da enzima livre.

Tabela 6 - Distâncias atômicas entre o íon cálcio e seus ligantes, no modelo cristalográfico da enzima livre.

Tabela 7 - Sumário estatístico dos dados de refinamento do modelo da enzima em complexo.

Tabela 8 - Distâncias atômicas entre o átomo de zinco e cálcio e seus ligantes, no modelo cristalográfico da enzima em complexo.

Tabela 9 - Comparação de alguns parâmetros bioquímicos entre as SVMP de classe P-I usadas nesse trabalho.

Tabela 10 - Porcentagem de identidade entre as seqüências e RMSD* dos modelos cristalográficos de SVMP de classe P-I disponíveis.

Tabela 11 - Porcentagem de identidade de seqüência nas regiões 153 a 163 e 167 a 177* das SVMP de classe P-I usadas nesse trabalho.

Lista de Gráficos

Gráfico 1 - Distribuição das notificações de acidentes ofídicos confirmados no Brasil no período de 1987 a 2005.

Gráfico 2 - Distribuição mensal dos acidentes ofídicos por macro-região do Brasil, 2005.

Gráfico 3 - Ensaio de inibição da atividade proteolítica da metaloprotease leuc-a sobre o substrato DMC 0,2 % em pH 7,4.

Gráfico 4 - Ensaio de inibição da atividade proteolítica da leuc-a sobre o substrato DMC 0,2 % em pH 7,4 usando o peptídeo GS-NH₂.

Gráfico 5 - Comparação entre as curvas de inibição da atividade proteolítica da leuc-a sobre a DMC, utilizando os peptídeos GS e GS-NH₂.

Gráfico 6 e 7 - Área de superfície acessível (A.S.A) e superfície molecular acessível (S.M.A.) das SVMP de classe P-I com modelo cristalográfico disponível



Bothrops leucurus

1 - INTRODUÇÃO.

1.1 - Serpentes.

No mundo, existem aproximadamente 2.650 espécies de serpentes modernas e apenas 650 espécies são tradicionalmente consideradas peçonhentas (Fry, 2009). Atualmente as serpentes conhecidas estão espalhadas pelos cinco continentes, ilhas e mares, desde a linha do equador até próximo dos círculos polares, aumentando gradativamente o número de espécies nas regiões tropicais (Funasa, 2001). As várias espécies de serpentes possuem tamanhos variados que vão desde espécies escavadoras, que se alimentam de cupins e crescem até 10 centímetros, a grandes constritoras, com quase 10 metros de comprimento (Pough, 1996). Didaticamente, as serpentes podem ser segregadas em dois grupos básicos: as peçonhentas, isto é, aquelas que conseguem inocular seu veneno no corpo de uma presa ou vítima, e as não peçonhentas.

1.2 - Serpentes peçonhentas e não-peçonhentas.

Alguns critérios básicos, mas não definitivos, são utilizados para a identificação, a uma distância segura, de serpentes peçonhentas e não peçonhentas. O primeiro deles é a presença de um orifício entre o olho e a narina da serpente, denominado fosseta loreal (figura 1). É possível dizer que toda serpente que possui esse orifício é considerada peçonhenta. A fosseta loreal é utilizada para perceber a presença de calor (termorrecepção), o que permite à serpente caçar no escuro presas que emitam calor de seus corpos, tais como pequenos mamíferos e aves (Funasa, 2001). Uma exceção a essa regra seriam os Colubrídeos, que são peçonhentos mas não possuem fosseta loreal. Esse é o caso da coral verdadeira (gênero *Micrurus*). Outra característica importante na distinção das serpentes peçonhentas é o tipo de terminação de sua cauda.

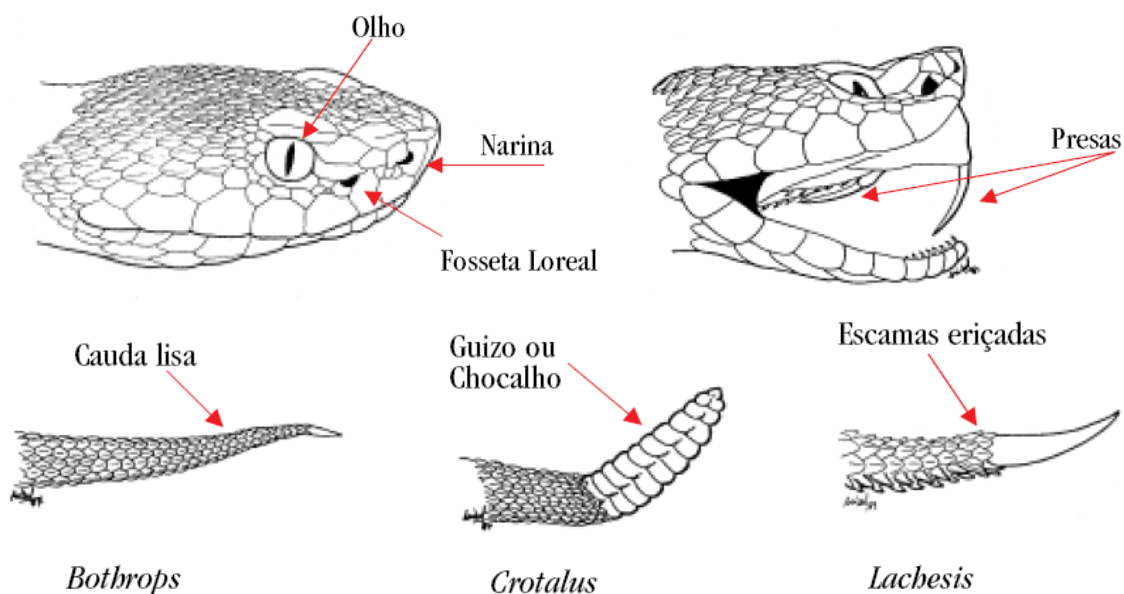


Figura 1 – Critérios de identificação entre serpentes peçonhentas e não-peçonhentas. Retirado e modificado de Funasa, 2001.

As cascavéis (gênero *Crotalus*) apresentam além da fosseta loreal, um chocalho na ponta da cauda que emite um som característico de alerta quando se sente ameaçada. Algumas serpentes apresentam a extremidade da cauda com as escamas eriçadas lembrando uma escova. Essas são as chamadas surucucus ou pico-de-jaca (gênero *Lachesis*), nome dado em virtude do aspecto da pele do animal se parecer muito com o aspecto da fruta. Outras serpentes possuem apenas como indicativo de ser peçonhenta a fosseta loreal. Isto se deve pelo fato da terminação de sua cauda ser toda lisa. Estas serpentes pertencem à família das jararacas (gênero *Bothrops*).

Um aspecto morfológico crucial utilizado para distinguir serpentes peçonhentas de não-peçonhentas é o tipo de dentição. Detalhes dos tipos de dentições apresentados pelas serpentes modernas (Famílias Elapidae, Viperidae e Lamprophiidae) podem ser observados na figura 2.

As serpentes modernas apresentam um sistema elaborado de injeção de veneno (Fry, 2009). O primeiro grupo, denominado *front-fanged* ou *com presas frontais*, apresenta espécies com um par de presas na parte anterior da maxila (Fry, 2009). Nesse grupo, o

ducto da glândula de veneno percorre toda bainha que recobre as presas e desemboca em um canal aberto formado na superfície lateral ou anterolateral das presas (Fry, 2009). Os canais formados nas presas são responsáveis pela condução do veneno para dentro da ferida causada pela mordida do animal (Fry, 2009). Na Família Viperidae há a predominância da denteção do tipo solenóglifa e na Família Elapidae há a predominância da denteção do tipo proteróglifa (Fry, 2009).

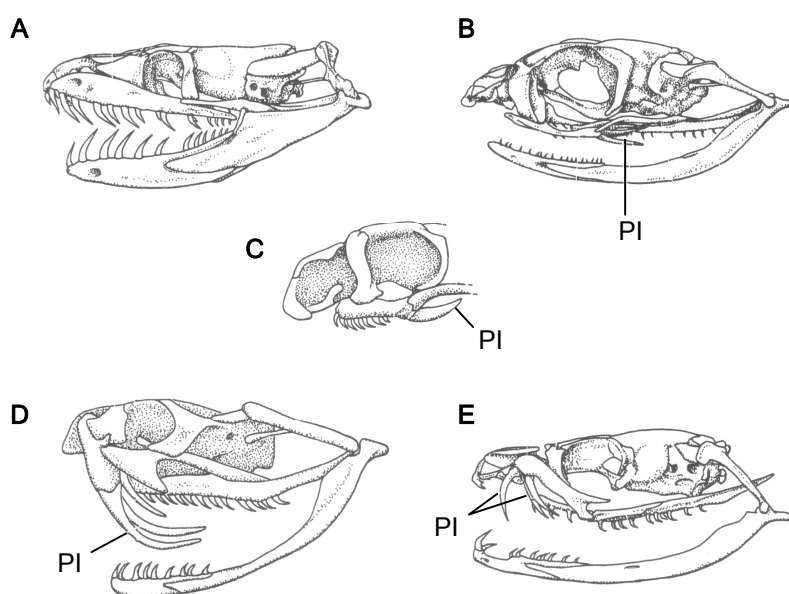


Figura 2 - Tipos de denteção presentes em serpentes. **(A) Áglifas** – denteção maxilar na qual as presas posteriores não são especializadas ou inexistentes; **(B, C) Opistóglifas** – presas na porção posterior do maxilar, sulcadas ou não, podendo apresentar variação de tamanho em relação aos dentes anteriores; **(D) Solenóglifas** – maxilar giratório reduzido apresentando somente as presas em sua porção anterior; **(E) Proteróglifas** – presas permanentemente eretas posicionadas na porção anterior da maxila. **PI** = presa inoculadora. Retirado e modificado de Pough, 1996.

No outro grupo, denominado *non-front-fanged* ou *com presas não frontais*, as presas se localizam na parte posterior da maxila (Fry, 2009). Normalmente esse grupo é caracterizado por não possuir espécies peçonhentas, por não apresentarem presas inoculadoras de veneno.

1.3 - A glândula de veneno.

As glândulas de veneno estão localizadas posteriores aos olhos da serpente, estendendo-se ao longo de toda maxila, ventralmente às glândulas mucosas supralabiais (figura 3) (Fry, 2009). A glândula de veneno, em viperídeos, apresenta uma complexa estrutura tubular, que pode ser dividida em vários lobos; o amplo lúmen da glândula permite o armazenamento de uma grande quantidade de veneno (Fry, 2009).

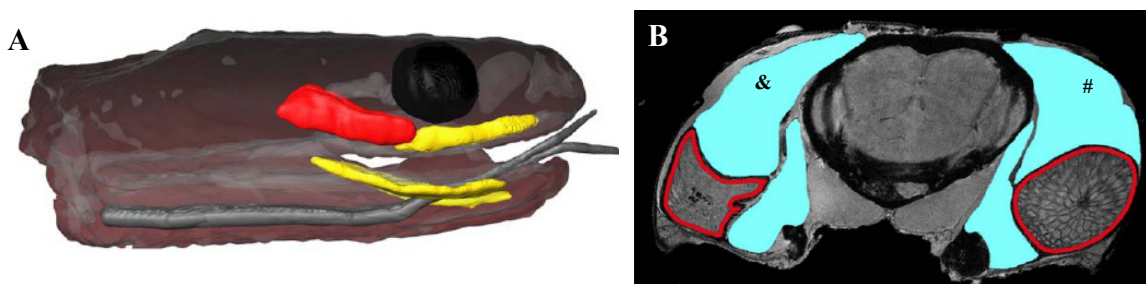


Figura 3 - Localização da glândula de veneno em serpentes. (A) detalhe em vermelho: glândula de veneno; detalhe em amarelo: glândulas mucosas; (B) crânio em corte transversal. Detalhe em ciano: músculos compressores; # musculatura em posição normal, & musculatura comprimida. Detalhe em vermelho: glândula de veneno. Retirado e modificado de Fry e colaboradores (2009).

O lúmen da glândula forma um ducto primário, que expele o seu conteúdo para dentro de uma glândula mucosa acessória, que se torna um ducto secundário e se conecta com a bainha das presas (Fry, 2009). A glândula de veneno dos elapídeos apresenta um lúmen reduzido e a secreção é armazenada dentro das células; todo ducto é cercado pela glândula mucosa acessória (Fry, 2009).

As serpentes das Famílias Viperidae e Elapidae inoculam o seu veneno através de compressão da glândula. Essa compressão é feita por uma forte musculatura que ajuda a impulsionar o veneno até as presas e, assim, envenenar a sua presa (figura 3).

1.4 - Ofidismo: um caso de saúde pública.

O envenenamento, resultante de mordidas de serpentes, é um importante problema de saúde em regiões rurais de países tropicais e subtropicais dos continentes Africano, Asiático, Oceania e Sul Americano (World Health Organization, 2007). Os acidentes ofídicos envolvendo estes animais têm importância médica em virtude de sua grande frequência e gravidade, tendo o ofidismo sido apontado como o maior causador de intoxicações exógenas por animais na América Latina (Campbell, 1989).

Um estudo recente da Organização Mundial de Saúde estima que, pelo menos, 1.841.000 envenenamentos e 94.000 mortes ocorram em todo mundo devido a acidentes ofídicos, sendo que grande parte desses acidentes ocorram no Sul e Sudeste Asiático e na África Subsaariana (World Health Organization, 2007). A falta ou subnotificação dos casos de acidentes nessas regiões ajudam a agravar esse problema. No Brasil, os dados são escassos e na maioria das vezes desatualizados.

Segundo dados notificados à Funasa, ocorreram no Brasil, no período de janeiro de 1990 a dezembro de 1993, 81.611 acidentes ofídicos, o que representa uma média de 20.000 casos/ano para o país. Dados mais recentes, fornecidos pela Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde (SVS/MS), mostram que, somente no ano de 2005, foram notificados 28.597 casos de acidentes ofídicos.

No período de 1990-1993, a maioria das notificações procedeu das regiões Sudeste e Sul, as mais populosas do país e que contam com melhor organização de serviços de saúde e sistema de informação (tabela 1). Já no ano de 2005, as notificações procedentes das regiões Norte e Nordeste aumentaram muito em comparação ao período anterior.

Tabela 1 - Procedência das notificações segundo as regiões fisiográficas do Brasil nos períodos de 1990–1993 e 2005. Retirado e modificado de Funasa (2001) e SVS/MS (2009).

Região Fisiográfica	Nº de casos		Letalidade	
	1990-1993	2005	1990-1993	2005
Norte	10.364	8.463	0,53	×
Nordeste	11.262	6.767	0,81	×
Sul	14.528	2.741	0,33	×
Sudeste	32.644	7.635	0,26	×
Centro-Oeste	12.813	2.991	0,63	×
Brasil	81.611	28.597	0,45	0,40

Dados da SVS/MS mostram que os números de notificações de acidentes ofídicos relatados em todo Brasil, vem aumentando nos últimos anos (gráfico 1). No período de 1996-2000, o número de casos comunicados aos serviços e postos de saúde foi de 89.365 notificações, com cerca de 17.800 casos/ano no país (Svs/Ms, 2009). De 2001-2005 foram registradas 127.522 notificações, com cerca de 25.500 casos/ano no país (Svs/Ms, 2009).

Ainda segundo a SVS/MS (2009), a queda no número de notificações, no período de 1996-2000, pode ser atribuída à implantação do novo sistema de notificação que, depois dos devidos ajustes, mostra-se eficiente na notificação dos acidentes. Esse fato pode ser evidenciado pelo aumento de cerca de 25% no número de notificações no período de 2001-2005, em relação ao período de 1996-2000 (Svs/Ms, 2009). Provavelmente essa também deve ser a explicação para o aumento no número de notificações no ano de 2005, nas regiões Norte e Nordeste (tabela 1).

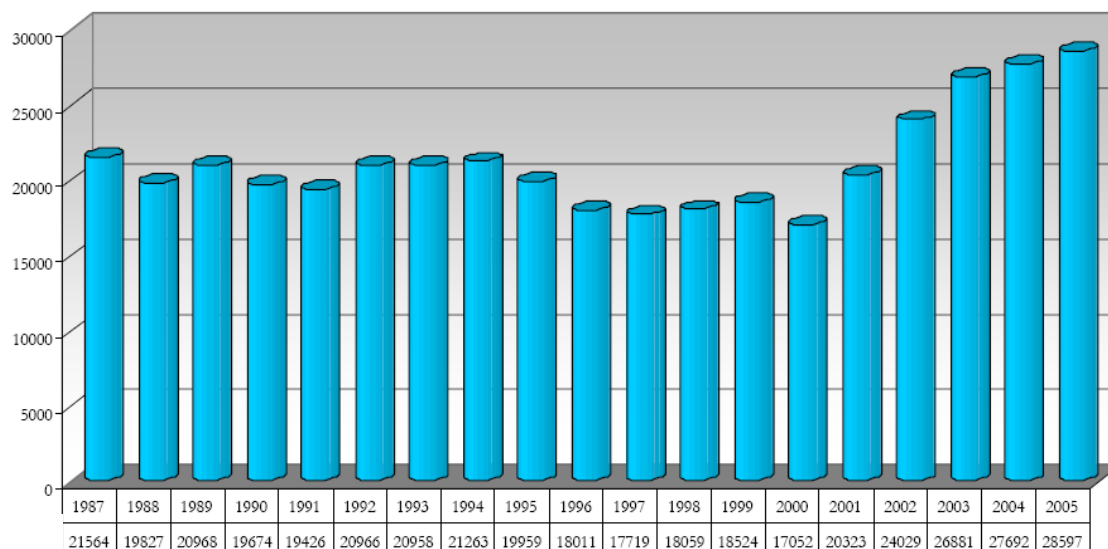


Gráfico 1 - Distribuição das notificações de acidentes ofídicos confirmados no Brasil no período de 1987 a 2005. Retirado de SVS/MS (2009).

A ocorrência do acidente ofídico está, em geral, ligada ao aumento da atividade humana nos trabalhos no campo, que está diretamente relacionada a fatores climáticos (Funasa, 2001), isto pode ser observado no gráfico 2. No ano de 2005, nas regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste, foi observado um decréscimo do número de acidentes no período de Abril a Agosto; na região Nordeste, os acidentes diminuíram de Maio a Dezembro; enquanto que, na região Norte, observou-se uma queda de Junho a Setembro. De uma forma geral, o período de Outono-Inverno é uma época de menor incidência de acidentes ofídicos, sendo o período de calor e chuvas o de maior incidência dos casos. Outro fator que colabora com a observação de que o índice de acidentes se eleva com o período de aumento no trabalho no campo é que o sexo masculino foi acometido em 70% dos acidentes enquanto o feminino em 20% (Funasa, 2001). Em 52,3% das notificações no período de 1990-1993, a faixa etária dos acidentados variou de 15 a 49 anos, onde se concentra a principal força de trabalho no campo do país (Funasa, 2001).

O conhecimento da sazonalidade dos acidentes e da herpetofauna local é de grande importância para o preparo estratégico das equipes de saúde. Esse preparo envolve não só o alerta aos profissionais especializados nesse tipo de acidente, mas também para estabelecer estratégias de distribuição e controle de estoque de soro antiofídico nos locais de

atendimento. Para que o tratamento do acidentado seja eficaz, é fundamental que o animal causador do acidente seja corretamente identificado e que o tratamento soroterápico se inicie o mais rápido possível.

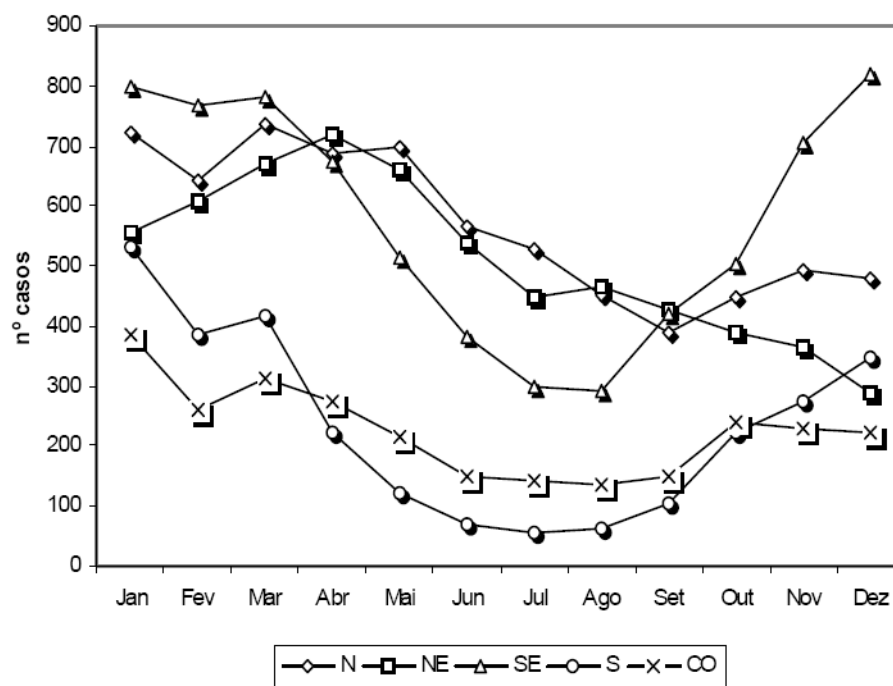


Gráfico 2 - Distribuição mensal dos acidentes ofídicos por macro-região do Brasil, 2005. Retirado e modificado de SVS/MS (2009).

1.5 - Distribuição dos acidentes entre os principais gêneros de serpentes brasileiras de importância médica.

Entre as serpentes atuais, os crotalíneos da Família Viperidae, Subfamília Crotalinae ("pitvipers", ou víboras com fosseta loreal) são considerados um grupo evolutivo recente (Seigel, 1987 *apud* Projeto Jararaca, 2006) e relativamente especializado em alguns aspectos biológicos (Campbell, 1989). Atualmente, os crotalíneos são divididos em cerca de 11-16 gêneros distribuídos nas Américas, Ásia e Sul da Europa (Campbell, 1989). No Brasil existem aproximadamente 321 espécies de serpentes distribuídas em todo território nacional, sendo que destas, 36 são peçonhentas (Pinho e Pereira, 2001).

As serpentes peçonhentas que habitam o território brasileiro são agrupadas na Sub-Família Crotalinae e na Família Elapidae. Independentemente do arranjo sistemático adotado, aproximadamente 30 espécies de crotalíneos ocorrem no Brasil (Campbell, 1989), sendo que uma espécie pertencente ao gênero *Crotalus*, uma do gênero *Lachesis* e, segundo Martins (2001), cerca de sete grupos monofiléticos específicos do gênero *Bothrops*. A Família Elapidae apresenta o gênero *Micrurus*, com cerca de 17 espécies (Campbell, 1989) e várias subespécies (Serafim, 2007). Outras seis famílias de serpentes ocorrem em território brasileiro, mas são não-peçonhentas (Campbell, 1989). Segundo Funasa (2001) e a SVS/MS (2009), a maioria dos acidentes ofídicos deve-se a serpentes pertencentes às Famílias Viperidae e Elapidae. A tabela 2 mostra um resumo dos casos notificados por gênero de serpente no período de 1990-1993 pela Funasa e no período de 2005 pela SVS/MS.

No período de 2005, 19,5% das notificações de acidentes registradas não continham a identificação da serpente. Esse elevado número não se justifica, já que há uma grande distinção dos sintomas apresentados nos acidentes ofídicos envolvendo os diferentes gêneros (Svs/Ms, 2009). Esse resultado revela que ainda há um despreparo dos funcionários do serviço de saúde ou a falta de pessoal especializado para o atendimento desse tipo de acidente.

Tabela 2 - Número de casos de acidentes ofídicos e letalidade por gênero de serpente no Brasil nos períodos de 1990–1993 e 2005. Retirado e modificado de Funasa (2001) e SVS/MS (2009).

Gênero	Nº de casos		Porcentagem		Nº de óbitos		Letalidade (%)	
	1990-1993	2005	1990-1993	2005	1990-1993	2005	1990-1993	2005
<i>Bothrops</i>	59.619	20.144	90,5	87,5	185	×	0,31	×
<i>Crotalus</i>	5.072	2.118	7,7	9,2	95	×	1,87	×
<i>Lachesis</i>	939	621	1,4	2,7	9	×	0,95	×
<i>Micrurus</i>	281	138	0,4	0,6	1	×	0,36	×
Não informado	13.339	5.576	16,8	19,5	69	×	0,52	×
Não peçonhento	2.361	×	3,0	×	×	×	×	×
Total	79.250²	23.021¹	100¹²	100¹	359	×	0,45	0,40

¹ O número de casos classificados como **não informado** não foi considerado.

² O número de casos classificados como **não peçonhento** não foi considerado.

³ Dados não fornecidos.

No período de 1990-1993, a letalidade do acidente ofídico não se mostrou uniforme nas regiões fisiográficas, como se observa na tabela 1. O maior índice foi registrado no Nordeste, apesar desta região apresentar o menor coeficiente de incidência do país naquele período. No período de 2005, a maioria dos acidentes foi classificada como leve e a letalidade geral foi baixa (0,4%) (Svs/Ms, 2009). O tempo decorrido entre o tipo de envenenamento e o atendimento pode elevar a letalidade em até oito vezes (Svs/Ms, 2009). Isso pode ser observado nos acidentes crotálicos. A frequência com que evolui para insuficiência renal aguda (Pinho e Pereira, 2001) somado ao retardo na busca por atendimento médico (uma média de oito horas) nesse tipo de acidente (Svs/Ms, 2009). Essa é a explicação para o alto índice de letalidade em relação ao número de casos notificados nesse tipo de acidente (tabela 2).

Já as seqüelas são mais frequentes nos acidentes botrópicos (em cerca de 10% dos casos) (Svs/Ms, 2009). Essa elevada taxa de morbidade se deve a fatores de risco como o uso de torniquetes, remédios caseiros e retardo na procura de tratamento adequado (Svs/Ms, 2009).

1.6 - Distribuição geográfica e breve caracterização dos sintomas associados aos acidentes ofídicos envolvendo os principais gêneros de importância médica no Brasil.

Família Viperidae.

Gênero: *Bothrops*.

Corresponde ao acidente ofídico de maior importância epidemiológica no país (tabela 2). Este gênero compreende cerca de 30 espécies, distribuídas desde o extremo Norte até o Sul, de regiões litorâneas e ilhas até as mais continentais do território nacional (Campbell, 1989). A grande diversidade de espécies se deve não só pela extensão territorial do país, mas também pela grande diversidade de ecossistemas (Campbell, 1989).

São conhecidas popularmente por jararaca, jararacuçu, urutu-cruzeira, jararaca-do-rabo-branco, malha-de-sapo, caiçara entre outras denominações. As jararacas podem ser encontradas, em sua grande maioria, em áreas mais limitadas de matas, apesar de alguns tipos habitarem também zonas de caatinga e cerrado (Campbell, 1989). Estas serpentes podem ser encontradas em zonas rurais e periferias de grandes cidades, preferindo ambientes úmidos como matas e áreas cultivadas e locais onde haja facilidade para proliferação de roedores (paióis, celeiros, depósitos de lenha) (Funasa, 2001). Têm hábitos predominantemente noturnos ou crepusculares. Apresentam cabeça triangular, fosseta loreal e cauda lisa. Podem apresentar comportamento agressivo quando se sentem ameaçadas, desferindo botes sem produzir ruído.

Seu veneno tem ação proteolítica, coagulante e hemorrágica. Os sintomas são caracterizados pela dor e edema endurecido no local da mordida, de intensidade variável e, em geral, de instalação precoce e caráter progressivo. Equimoses e sangramentos no ponto da mordida são freqüentes (Pinho e Pereira, 2001). Infarto ganglionar e bolhas podem aparecer na evolução, acompanhados ou não de necrose (Pinho e Pereira, 2001).

A espécie *Bothrops leucurus*, conhecida popularmente como jararaca do rabo branco, é comum na faixa atlântica (Zona da Mata) do Nordeste, desde a Paraíba até o norte do Espírito Santo (Grego et al., 2006). Ela habita tanto as áreas urbanas como as rurais, causando acidentes com maior incidência principalmente nos meses mais chuvosos (março-agosto) e com menor incidência nos meses mais secos (setembro-fevereiro) (Mise et al., 2007). Essa espécie pode medir até 1,70 metros de comprimento (Projeto Jararaca, 2006) e alimenta-se de roedores, lagartos, anfíbios, serpentes e aves (Martins et al., 2002).

Segundo Mise e colaboradores (2007), essa espécie, no ano de 2001, provocou o maior número de acidentes (5/100.000 habitantes e letalidade de 1 %) no estado da Bahia. A grande maioria das vítimas era de trabalhadores rurais do sexo masculino. A alta letalidade, o aparecimento de sintomas neurológicos e a necessidade do uso, acima do recomendado, de ampolas de antiveneno botrópico, tornam os acidentes com essa espécie um importante caso de saúde pública no estado da Bahia.

Gênero: *Crotalus*.

É o gênero responsável por cerca de 7,7% dos acidentes ofídicos registrados no Brasil, podendo representar até 30% dos acidentes em algumas regiões (Funasa, 2001). O gênero agrupa várias subespécies, pertencentes à espécie *Crotalus durissus*.

Popularmente são conhecidas por cascavel, cascavel-quatro-ventas, boicininga, maracambóia, maracá e outras denominações. São encontradas desde o Paraná até o Piauí em campos abertos, áreas secas, arenosas e pedregosas e raramente na faixa litorânea, não ocorrendo na Floresta Amazônica e no Pantanal (Campbell, 1989). As cascavéis são facilmente encontradas em áreas abertas e secas; nas áreas de cultivo agrícola em grande parte do Brasil, excetuando-se as áreas de vegetação mais densa. Quando excitadas ou se sentindo ameaçadas denunciam sua presença pelo ruído característico produzido pelo chocalho.

O veneno da cascavel tem ação neurotóxica, miotóxica e coagulante (Pinho e Pereira, 2001). As manifestações clínicas são pouco importantes no acidente crotálico (Funasa, 2001). O acidentado apresenta um quadro local pouco expressivo ou sem dor. Há parestesia local ou regional que pode persistir por tempo variável, podendo ser acompanhada de edema discreto ou eritema no ponto da mordida (Funasa, 2001). Pode ocorrer também mialgia generalizada, podendo haver evolução para insuficiência renal aguda, causa maior de óbito neste grupo (Funasa, 2001).

Gênero: *Lachesis*.

Por se tratar de serpentes encontradas no interior da Floresta Amazônica, onde a densidade populacional é baixa, o sistema de notificação não é tão eficiente e as informações disponíveis sobre esse tipo de acidente são escassas e raras (Funasa, 2001). Estas são encontradas apenas em áreas de floresta tropical densa, como na Floresta Amazônica e no pouco que resta da Mata Atlântica (Campbell, 1989).

O envenenamento humano pelas subespécies *L. muta muta* e *L.m. rhombeata*, embora infreqüentes, são sempre severos devido ao tamanho da serpente (que pode atingir até 3,5 metros de comprimento) e à quantidade de veneno injetada em uma única mordida. Estes acidentes têm por característica um pronunciado dano tecidual local e alterações sistêmicas como hemorragia, hipotensão, coagulopatias insuficiência renal e choque

cardiovascular (Funasa, 2001). Outros sintomas como bradicardia, diarreia e vômito também foram descritos (Pinho e Pereira, 2001). Pouco se sabe sobre a patogênese das alterações locais e sistêmicas produzidas por este veneno (Rucavado et al., 1999).

Família Elapidae.

Gênero: *Micrurus*.

Corresponde a 0,4% dos acidentes com serpentes peçonhentas registrados no Brasil (Funasa, 2001). Mais conhecida como cobra coral, tem hábito subterrâneo vivendo sob o folheto, troncos em decomposição, entre raízes e pedras (Funasa, 2001). Esta serpente está presente desde o sul da Bahia, Região Central até o Sul do Brasil (Campbell, 1989).

Esse gênero não é agressivo, não dá bote e só oferece perigo quando manuseada. Sua presa de veneno é fixa e pequena localizada na parte anterior da boca, por isso ela morde e trava a mandíbula ao invés de dar uma mordida rápida (Funasa, 2001).

O seu veneno tem como principal característica a ação neurotóxica. Os constituintes tóxicos do veneno são denominados neurotoxinas (NTXs) de ação pré-sináptica e pós-sináptica (Funasa, 2001).

1.7 - Componentes bioquímicos do veneno.

Os venenos das serpentes contêm componentes que servem não só para imobilizar a presa, mas também para facilitar a digestão (Bjarnason e Fox, 1994). O veneno é uma complexa mistura de substâncias orgânicas e inorgânicas com mais de 90% do peso seco do veneno sendo composto de polipeptídeos e pequenos peptídeos (Bjarnason e Fox, 1994). Os outros compostos incluem carboidratos, glicoproteínas, lipídeos (primariamente fosfolipídios), aminas biogênicas (particularmente abundante nos venenos de Viperídeos), nucleotídeos e aminoácidos (Bjarnason e Fox, 1994).

Os constituintes inorgânicos dos venenos incluem os elementos: Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, P, Co, e Zn (Bjarnason e Fox, 1994). O papel biológico de cada um ainda não está claro, entretanto, alguns deles, como o Ca, Mg e Mn, são importantes para a estabilização

de certas proteínas do veneno (Bjarnason e Fox, 1994). Outros átomos, em particular Zn, Cu, Fe e Co, participam dos mecanismos catalíticos de certos componentes enzimáticos do veneno, como de metaloproteínas (Bjarnason e Fox, 1994).

Outra molécula orgânica importante no veneno é o citrato. Essa molécula foi identificada como o principal ácido orgânico livre em veneno de serpentes (Freitas et al., 1992). O citrato seria responsável por quelar íons divalentes, como o Ca^{2+} e o Zn^{2+} , sendo um mecanismo de proteção importante para a glândula de veneno (Francis et al., 1992).

1.8 - Metaloproteínas dos venenos de serpentes (SVMP).

Metaloproteínas de venenos de serpentes (SVMP) e as proteínas ADAM (família de desintegrinas e metaloproteínas) formam o grupo das “*reprolisinas*”, metaloproteínas zinco-dependentes, que, juntamente com as astacinas e as serralisinas, compõem a superfamília das “*metzincinas*” (Bode et al., 1993; Stöcker et al., 1995). As SVMPs compartilham grande similaridade estrutural e funcional com os domínios de outras metaloproteínas (Bode et al., 1993). Muitas destas enzimas têm um alto grau de conservação dos resíduos envolvidos na ligação do átomo de zinco, apresentando o motivo (HEXXH) ou este mesmo motivo de forma mais complexa ($\text{H}_{142}\text{E}_{143}\text{XXH}_{146}\text{XXGXXH}_{152}$) (Bode et al., 1993). Deste modo, o nome “*metzincinas*” foi sugerido para estas enzimas, fazendo uma alusão ao motivo conservado com um átomo de zinco e um resíduo de metionina, localizado no assoalho do sítio catalítico que forma uma “*met-turn*” (Stöcker et al., 1993).

As SVMP são componentes importantes e estão presentes em altas concentrações nos venenos de serpentes da família Viperidae (Bjarnason e Fox, 1994). As SVMPs são responsáveis pela visível hemorragia associada aos acidentes com serpentes da família Viperidae. Esses fatores hemorrágicos apresentam ação em diversos componentes do sistema hemostático e fibrinolítico. Todas as SVMPs são sintetizadas como zimogênios e são proteoliticamente processadas antes de se tornarem ativas (Bjarnason e Fox, 1994). Dependendo da composição dos domínios, as SVMPs podem ser classificadas como pertencendo a uma de quatro classes: (1) P-I, que inclui enzimas que apresentam somente o

domínio metaloproteinase; (2) P-II, enzimas que possuem o domínio metaloproteinase e o domínio semelhante à desintegrina; (3) P-III, enzimas que possuem os dois primeiros domínios e um terceiro denominado “*cys-rich*”; e (4) P-IV, enzimas que possuem os três domínios citados ligados, por uma ponte dissulfeto, a um domínio lectina (Bjarnason e Fox, 1994). Com o avanço dos estudos, as SVMPs foram categorizadas nas classes P-I, P-IIa e P-IIb, P-IIIa e P-IIIb e P-IV (Hite et al., 1994). Em uma recente revisão sobre SVMPs, Fox e Serrano (2008), propõe uma nova categorização: P-Ia, P-IIa,b,c,d,e, P-IIIa,b,c,d. A classe P-IV seria adicionada à classe P-III pois, até o presente momento, nenhum estudo envolvendo a descrição de transcritos de RNAm que codificam as proteínas de classe P-IV foi publicado (Fox e Serrano, 2008). As proteínas que haviam sido classificadas como P-IV seriam apenas modificações pós-traducionais de proteínas de classe P-III (Fox e Serrano, 2008).

Dois principais efeitos podem ser observados como resultado da ação dessas proteínas *in vivo*: a indução de hemorragia local e proteólise. O mecanismo de hemorragia induzida por SVMPs não parece depender da degradação disseminada de componentes da matriz extracelular, mas provavelmente da hidrólise de sítios altamente específicos e ainda indefinidos na lâmina basal dos capilares que é responsável pela sua integridade (Bjarnason e Fox, 1994). A clivagem de proteínas da membrana basal com conseqüente desarranjo da estrutura dos capilares constitui o principal mecanismo pelo qual estas enzimas provocam hemorragia (Gutierrez e Rucavado, 2000). A potência da atividade hemorrágica nos venenos de serpente parece estar relacionada com a capacidade das SVMPs digerir certas proteínas da MB (Sanchez e Swenson, 2007). Vários trabalhos descrevem diferenças na potência hemorrágica entre SVMP de baixa (~ 22 kDa - classe P-I) e alta (~ 55 kDa - classe P-III) massa molecular. A alta atividade hemorrágica, apresentada pelas enzimas de classe P-III, é resultado da ação em sinergia dos domínios desintegrina e *cistein-rich*, com o domínio metaloprotease, que direcionam a enzima para locais específicos na microvasculatura (Jia et al., 1997; Ramos e Selistre-De-Araújo, 2006; Sanchez e Swenson, 2007; Serrano et al., 2007; Takeda et al., 2007). O direcionamento, também, posicionaria o sítio catalítico em um local estratégico para romper a microvasculatura (Jia et al., 1997) induzindo não somente hemorragia local, mas

também, hemorragia sistêmica (Kamiguti et al., 1991). Algumas enzimas de classe P-I também são capazes de provocar o efeito hemorrágico, mas com uma potência menor. Essa observação indica que o domínio metaloprotease e características estruturais desse domínio desempenham um papel importante na gênese desse efeito (Watanabe et al., 2003).

Na maioria dos venenos de viperídeos (*pit vipers* e víboras verdadeiras) estudados, é relatada a presença de enzimas fibrinogenolíticas, a saber: serino e metaloproteases. Essas enzimas apresentam uma especificidade diferente sobre as cadeias α e β do fibrinogênio (Markland, 1991). As zinco-metaloproteases, especialmente as de classe P-I, exibem uma atividade predominante sobre a cadeia A α do fibrinogênio e, após um longo período de incubação, começam a degradar a cadeia B β (Swenson e Markland, 2005). Além de degradar o fibrinogênio, essas enzimas são capazes de digerir coágulos ricos em fibrina e prevenir a formação de novos coágulos (Swenson e Markland, 2005). Algumas dessas enzimas, também conhecidas como α -fibrinogenases, não provocam o efeito hemorrágico, mesmo em altas concentrações (Sanchez et al., 1991; Bello et al., 2006).

1.9 - O mecanismo de catálise proposto para as SVMs e formas de inibição.

Stöcker e Bode (1995) sugerem o mecanismo de catálise das metaloproteases apresentado na figura 4: uma molécula de água ficaria presa entre o grupo carboxílico, da cadeia lateral de um resíduo de Glu, e o átomo de zinco. Com a entrada do substrato no sítio catalítico, ocorreria a transferência de um átomo de hidrogênio, da molécula de água, para o resíduo de ácido glutâmico. O grupo carboxílico do resíduo de ácido glutâmico se tornaria um nucleófilo, que atacaria uma ligação peptídica acessível do substrato. Esse ataque faria o átomo de zinco adotar um estado de transição tetra-coordenado. O grupo carboxílico transferiria o átomo de hidrogênio, obtido da molécula de água, ao átomo de nitrogênio da ligação peptídica do substrato, dessa forma, a ligação seria rompida e os produtos seriam liberados. A atividade da enzima seria regenerada com a entrada de uma

nova molécula de água entre o resíduo de ácido glutâmico e o átomo de zinco.

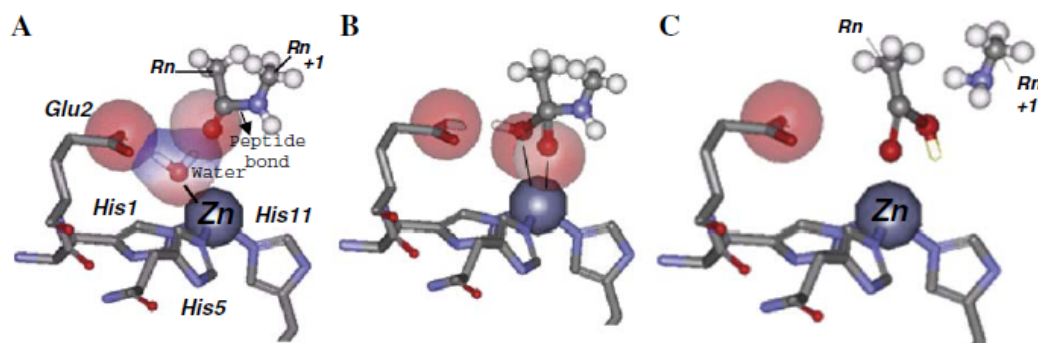


Figura 4 - Mecanismo de catálise proposto para as metaloproteases. Os números dos resíduos correspondem à sua posição na seqüência (HEXXHXXGXXH). Rn e Rn⁺¹ correspondem, respectivamente, N-terminal e C-terminal do substrato. **(A)** aumento da polarização da molécula de água presa entre o resíduo de Glu e o átomo de Zn. **(B)** transferência de um próton do Glu para quebrar a ligação peptídica e a formação do estado de transição do Zn. **(C)** saída dos produtos de clivagem do sítio catalítico. Figura retirada e modificada de Ramos e Selistre-De-Araújo, 2006 .

A distância de contato entre a molécula de água e o grupo carboxílico da cadeia lateral do ácido glutâmico parece ser crucial para a atividade da enzima (Gomis-Rüth et al., 1993; Gong et al., 1998; Ramos e Selistre-De-Araújo, 2006). Grandes distâncias (maiores do que 4 Å), como consequência da variação do pH, poderiam afetar a capacidade de polarização do ácido glutâmico sobre a molécula de água, podendo ser essa a explicação estrutural da baixa atividade ou inatividade dessas enzimas em pH ácido (Gong *et al.*, 1998). A dependência da atividade proteolítica dessas enzimas com o pH, estaria relacionada com o pKa do grupo carboxilato da cadeia lateral do ácido glutâmico, que é 4,3 (Gomis-Rüth *et al.*, 1993; Gong *et al.*, 1998; Ramos e Selistre-De-Araújo, 2006). Sob condições ácidas, o grupo carboxilato pode ter uma pequena capacidade de polarizar a molécula de água catalítica, aumentando as distâncias interatômicas (maior que 4 Å), diminuindo a atividade proteolítica; de modo oposto, o aumento do valor de pH para uma faixa alcalina, diminuiria as distâncias entre o grupo carboxilato do ácido glutâmico e a molécula de água, favorecendo o ataque nucleofílico (Zhu et al., 1999). Essas observações estruturais estão de acordo com as observações de Francis e colaboradores (1992), que

observaram uma grande concentração de citrato no veneno. Esse citrato seria responsável não só por quelar íons divalentes, mas também por manter o pH do veneno uma faixa ácida, impedindo a ativação enzimática.

Outro mecanismo de proteção utilizado pelas serpentes para protegerem o veneno de hidrólise são peptídeos inibitórios endógenos. Quando o veneno é inoculado na presa, o citrato e os peptídeos inibitórios se dissociam das proteinases permitindo sua ação (Lou *et al.*, 2005). Esse mecanismo mostra que os peptídeos possuem baixa afinidade pela enzima e podem se ligar e desligar da enzima (Lou *et al.*, 2005). Vários peptídeos inibitórios de SVMP já foram isolados e caracterizados (Huang *et al.*, 2002; Lou *et al.*, 2005; Wagstaff *et al.*, 2008). Uma característica importante desses peptídeos é que eles normalmente são descritos como tripeptídeos, com um piroglutâmico no N-terminal e um triptofano na sequência. Uma versão diferente desses peptídeos inibitórios foi descrita por Lou e colaboradores (2005), um tripeptídeo apresentava a sequência KNL e estava localizado no sítio ativo da enzima F2 (purificada do veneno da serpente *Agkistrodon acutus*) que foi cristalizada. Outra enzima, TM-3 (purificada do veneno da serpente *Trimeresurus mucrosquamatus*), também foi cristalizada com três diferentes tipos de peptídeos inibidores endógenos (pEKW, pEQW e pENW) purificados do veneno (Huang *et al.*, 2002), mas esses não diferiam do padrão normal já descrito.

1.10 - Possível utilização das SVMPs como fármacos trombolíticos.

A ação de enzimas fibrinolíticas presentes nos venenos de serpentes vem sendo alvo de estudos há muitos anos. O efeito destas enzimas é prevenir que o sangue se coagule, nas presas ou em pessoas acidentadas, pela remoção de fibrina e fibrinogênio. Este estado de incoagulabilidade do sangue facilita o rápido espalhamento das outras toxinas presentes no veneno. A maioria das enzimas fibrinogenolíticas são metaloproteinases de classe P-I, embora várias outras sejam serinoproteinases.

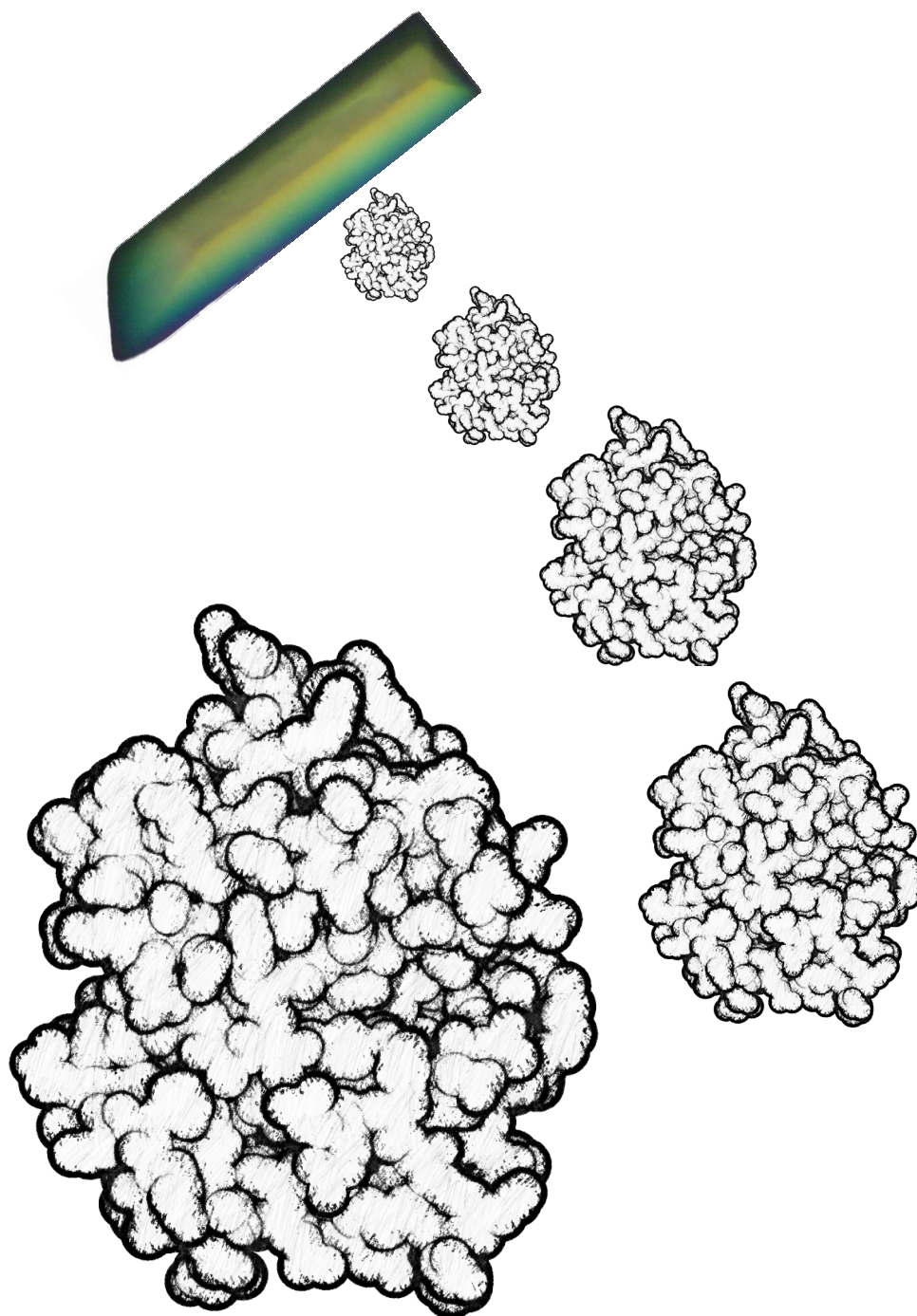
Um exemplo de desenvolvimento de fármacos trombolíticos a partir de uma SVMP de classe P-I é o *alfimeprase*. Este fármaco foi desenvolvido pela tecnologia do DNA-recombinante a partir de uma enzima fibrinolítica (SVMP de classe P-I não-hemorrágica)

purificada do veneno de *Agkistrodon contortrix contortrix*, chamada fibrolase (Adis International Limited, 2008). O fármaco é introduzido diretamente no trombo, degradando-o diretamente, e liberando as células sanguíneas nele enredadas (Adis International Limited, 2008). O excesso do fármaco é prontamente inativado pela α_2 -macroglobulina (Adis International Limited, 2008). Este medicamento foi desenvolvido para o tratamento de oclusões arteriais periféricas, derrames e, em uma segunda indicação, na oclusão de cateteres (Hong et al., 2006). Outras patologias, como síndromes coronárias agudas, enfartos e doenças trombóticas venosas são potenciais alvos para este medicamento (Hong et al., 2006).

Este fármaco chegou até a fase III de testes, mas foi descontinuado no primeiro semestre de 2007 por um baixo desempenho obtido nos testes NAPA-2 (*Novel Arterial Perfusion with Alfimeprase-2*) e SONOMA-2 (*Speedy Opening of Non-functional and Occluded catheters with Mini-dose Alfimeprase-2*) (Adis International Limited, 2008). No segundo semestre de 2007, os testes na fase III foram retomados, mas com outros objetivos (Adis International Limited, 2008).

Tendo em vista uma possível aplicação clínica de enzimas fibrinogenolíticas não-hemorrágicas, a metaloproteinase leuc-a, purificada do veneno da serpente *Bothrops leucurus*, apresenta-se como uma opção interessante de estudo. A leuc-a apresentou especificidade seletiva *in vitro* pelas cadeias α da fibrina, cadeias A α do fibrinogênio e fibronectina plasmática (Gremski et al., 2007). Estudos de digestão usando a leuc-a sobre a laminina, o principal componente de membrana plasmática, em uma taxa enzima/substrato de 1:30, não apresentaram efeito proteolítico, mesmo em tempos de incubação superior a 18 horas (Gremski et al., 2007). O mesmo ensaio, utilizando colágeno do tipo I, também apresentou resultados semelhantes (Gremski et al., 2007). Em outro ensaio, a leuc-a apresentou inibição dose dependente da agregação plaquetária induzida por ADP. Esta enzima se distingue de outros agentes trombolíticos clinicamente utilizados (t-PA, u-PA e estreptocinase) por não ativar o plasminogênio para degradar a fibrina. O mais importante a salientar é que a leuc-a não possui atividade hemorrágica, mesmo quando 100 μ g são injetados subcutaneamente em camundongos e 50 μ g intradermicamente em coelhos (Agero et al., 2007).

O estudo da estrutura cristalográfica dessa enzima seria de fundamental importância para o entendimento do seu mecanismo de funcionamento e interações com diferentes substratos. Um possível aperfeiçoamento de sua estrutura, por técnicas de biologia molecular, possibilitaria a criação de uma nova droga de alta afinidade e especificidade para auxiliar no tratamento de patologias trombóticas. Outra área de importância seria o estudo estrutural da inibição dessas enzimas, que estão envolvidas na gênese de várias patologias associadas aos acidentes ofídicos, como a hemorragia e o edema.



2 - OBJETIVOS.

2.1 - *Objetivo geral.*

- Cristalização e posterior resolução do modelo cristalográfico da metaloprotease não-hemorrágica leucurolisina-a, purificada do veneno de *Bothrops leucurus*, com o objetivo de melhor entender as relações de estrutura e função dessa proteína.

2.2 - *Objetivos específicos.*

- Determinar a estrutura primária completa da leuc-a.
- Realizar testes de cristalização (em condições variadas) com a leuc-a purificada.
- Selecionar e refinar as melhores condições de cristalização obtidas preliminarmente.
- Realizar os experimentos de difração de raios-x visando a coleta de conjuntos de dados de alta resolução.
- Interpretar os dados de difração e determinar a estrutura tridimensional da leuc-a.
- Comparar a estrutura da leuc-a com outras estruturas de SVMP de classe P-I para tentar apontar evidências estruturais que ajudem a elucidar as diferenças de efeito farmacológico provocado por essas enzimas.



3 - MATERIAIS E MÉTODOS.

3.1 - Purificação da leucurolisina-a nativa.

O veneno de *Bothrops leucurus* foi extraído de espécimes capturados no Sul do Estado da Bahia e criados no serpentário da Fundação Ezequiel Dias (FUNED) em Belo Horizonte, Minas Gerais. A metaloprotease leuc-a foi purificada como descrito previamente por Bello e colaboradores (2006), e gentilmente cedida pelo Doutor Eládio Flores Sanchez do Centro de Pesquisa e Desenvolvimento Carlos Ribeiro Diniz - FUNED para esse estudo.

3.2 - Sequenciamento da estrutura primária da leucurolisina-a nativa.

Uma amostra da proteína purificada, aproximadamente (~) 3 miligramas (mg) foi reduzida e alquilada usando 4-vinilpiridina, como descrito em (Wilson, 1989). A proteína, reduzida e alquilada, foi dissolvida em 200 microlitros (μL) de uma solução $8 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ de uréia (Sigma-Aldrich) e, em seguida, diluída em 2 mililitros (mL) de uma solução $0,1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ de bicarbonato de amônio (NH_4HCO_3) em pH 8,1.

Dois tipos de digestão, enzimática e química, foram utilizados para a fragmentação peptídica da leuc-a. A digestão enzimática foi realizada utilizando-se individualmente tripsina ($2\% \text{ }^{\text{p/p}}$ enzima/proteína durante 4 horas a 37°C), quimiotripsina ($2\% \text{ }^{\text{p/p}}$ enzima/proteína durante 3 horas a 37°C) e protease Glu-C de *Streptococcus aureus* V8 ($2\% \text{ }^{\text{p/p}}$ enzima/proteína durante 24 horas a 37°C). Na digestão química foi utilizado brometo de cianogênio em $70\% \text{ }^{\text{v/v}}$ de ácido trifluoracético (TFA) por 24 horas a 20°C no escuro.

Os fragmentos peptídicos resultantes das digestões enzimáticas e química foram purificados por cromatografia líquida de alta performance (HPLC) de fase reversa em uma coluna Vydac *C₁₈ small pore column* (250 mm x 4.6 mm; 201SP54) utilizando-se um gradiente linear estendido (3 horas) 0 - 50 % de acetonitrila em 0,1 % de TFA aquoso.

Os peptídeos purificados foram sequenciados em um sequenciador de proteínas modelo Shimadzu PPSQ-21A. A proteína nativa e alguns fragmentos peptídicos, gerados no processo de digestão, se mostraram resistentes ao sequenciamento automático da porção N-terminal. Esses peptídeos foram submetidos à fragmentação por espectrometria de

massas em um espectrômetro de massas do tipo MALDI-TOF/TOF AutoFlex III equipado com *smartbeam* (Bruker Daltonics, Billerica, USA) e posterior seqüenciamento manual, como descrito por Rates e colaboradores (2008).

Usando o programa CLUSTAL W (Higgins et al., 1996) foi feito o alinhamento da seqüência de resíduos de aminoácidos da leucurolisina-a com outras seqüências de SVMP de classe P-I.

O assinalamento de elementos de estrutura secundária das enzimas utilizadas neste trabalho foram realizadas usando *STRIDE web server* (Heinig e Frishman, 2004), para as proteínas com coordenadas atômicas conhecidas, e *Jpred 3 web server* (Cole et al., 2008), para macromoléculas que apresentam apenas informações de estrutura primária disponível.

Os parâmetros: ponto isoelétrico e *GRAVY* (*Grand average of hydropathicity index*), índice que indica a solubilidade de uma proteína, foram obtidos utilizando o *ProtParam tool* (Gasteiger et al., 2005).

3.3 - Cristalização da leucurolisina-a nativa.

Uma amostra liofilizada (~ 1,0 mg) de leucurolisina-a nativa foi dissolvida em 100 µL de água Milli-Q® para uma concentração final de ~ 10,0 mg · mL⁻¹. Os testes com as condições de cristalização foram realizados utilizando-se do método de difusão de vapor a 18° C (291 K).

As placas de cristalização em gota depositada, com as condições iniciais de cristalização, foram automaticamente preparadas utilizando-se o robô de cristalização HoneyBee 963 (Digilab Genomic Solutions, USA), no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS). Para cada condição de cristalização, uma gota teste foi adicionada ao reservatório para entrar em equilíbrio, por difusão de vapor, contra 80 µL de uma condição teste na placa de cristalização. Cada gota teste foi formada por 0,3 µL de solução de proteína e 0,3 µL da solução presente no reservatório da condição teste. Um total de 594 condições de cristalização diferentes foram utilizadas para os testes iniciais.

Após o período de 1 mês, cristais foram observados em 37 condições de cristalização diferentes. Dentro dessas 37 condições de cristalização, foram selecionadas

condições nas quais os cristais apresentavam faces planas e uniformes para serem otimizadas e amplificadas em uma gota de cristalização de volume final 1,0 μL . Um total de 192 condições otimizadas e amplificadas foram produzidas e, os testes de cristalização com essas condições, foram realizados em placas de cristalização de gota suspensa. Para averiguar se os cristais eram realmente de proteína e não de sal, alguns foram colhidos e dissolvidos em 1,0 μL de água Milli-Q[®] com 0,1 % de TFA. A solução resultante foi submetida a análise por espectrometria de massas.

Os cristais, utilizados para os ensaios de difração de raios-X neste trabalho, foram obtidos em gotas teste formadas por 0,5 μL de solução de proteína com igual volume de solução presente no reservatório da condição de cristalização. Cada gota teste foi equilibrada contra 1,0 mL de uma solução 100 mmol $\cdot$ L⁻¹ MIB/MIB (pH 5,0), 15-20 % p/v PEG 6.000/1.500 e 100 mmol $\cdot$ L⁻¹ de acetato de amônio.

3.4 - Aquisição de dados e determinação da estrutura tridimensional da leucurolisina-a.

Após o crescimento dos cristais nos meios de cristalização otimizados, alguns cristais foram colhidos, com o auxílio de loops de nylon (Hampton Research), e transferidos da gota de cristalização para uma gota (10 μL) de solução crioprotetora (solução de cristalização e 10% v/v de etilenoglicol) por alguns segundos. O cristal usado para a coleta do conjunto de dados foi resfriado a -173° C (100 K), utilizando-se fluxo de vapor de nitrogênio.

Dois conjuntos de dados, com resolução de 1,8 e 1,6 Å, foram coletados. Em cada conjunto, cada imagem de difração foi coletada em um intervalo de 1,0° com tempo de exposição de 90 e 35 segundos. Os dados foram coletados em um detector MAR CCD *image-plate* utilizando a linha D03B-MX1 no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (Polikarpov et al., 1998). Ao todo, 295 (240) imagens foram coletadas a uma distância cristal-detector de 75 [50] milímetros. Os conjuntos de dados foram indexados, integrados e escalonados utilizando o pacote de programas HKL-2000 (Otwinowski e Minor, 1997).

O problema das fases foi resolvido por Substituição Molecular utilizando o pacote AMoRe (Navaza, 2001), parte integrante da suíte de programas CCP4 v.6.1.1 (Bailey, 1994). O modelo utilizado para a Substituição Molecular foi a SVMP de classe P-I BaP1 (código PDB 1ND1;(Watanabe *et al.*, 2003). Em cada um dos conjuntos de dados, uma única molécula de leuc-a por unidade assimétrica foi obtida como solução durante a Substituição Molecular.

Vários ciclos de refinamento, com inserções de moléculas de água, intercalados com a reconstrução manual do modelo, foram realizados utilizando os softwares REFMAC v5.2.0019 (Murshudov *et al.*, 1997) e Coot v.0.5.2 (Emsley e Cowtan, 2004). As coordenadas atômicas e fatores de estrutura do modelo refinado serão depositados no Protein Data Bank. As figuras, utilizadas para mostrar características de estruturas tridimensionais do modelo da leuc-a (e outros), foram preparadas utilizando-se o software PyMol (Delano, 2002).

3.5 - Diálise da leucurolisina-a nativa.

Uma amostra de ~ 5,0 mg de leuc-a foi dissolvida em 400 µL de água Milli-Q® e transferida para um tubo de diálise *Ultrafree®-MC Centrifugal Filter* - filter code: Biomax-5 NMWL 5,000 (Millipore Corporation, USA). A solução foi centrifugada por 20 minutos a 5.000 rpm. Após esse tempo, o tubo era novamente preenchido com água Milli-Q®. Esse procedimento foi repetido 5 vezes para assegurar de que somente a leuc-a permaneceria na amostra.

3.6 - Síntese dos peptídeos sintéticos.

Os peptídeos Gly-Ser-OH e Gly-Ser-CO_{NH2} foram sintetizados utilizando a estratégia cloreto de fluorenil-metiloxycarbonil (Fmoc) / ter-butila de síntese manual em suporte sólido (Chan e White, 2000). A síntese teve início com a desproteção do grupo Fmoc acoplado à resina. A desproteção foi realizada utilizando-se uma solução 20% piperidina em dimetilformamida (DMF). Após a desproteção, foram feitos os acoplamentos

dos resíduos de aminoácidos. As etapas de acoplamento foram realizadas através da incubação da resina / Fmoc-aminoácido (4 Eq.) em uma solução de O-benzotriazol-*N,N,N',N'*-tetrametil-uronium-hexafluor-fosfato (HBTU) 4 equivalentes (eq.), *N,N*-diisopropil-etilamine (DIPEA) 9 eq.. Cada etapa de acoplamento durou 45 minutos sob agitação à temperatura ambiente. Após cada etapa, as resinas eram lavadas com DMF e metanol, alternadamente, por três vezes para a retirada dos restos do acoplamento / desproteção. O teste de Kaiser (teste da ninidrina) foi utilizado para detectar a presença de aminas livres na cadeia peptídica. As duas etapas (acoplamento / desproteção) foram, então, repetidas sucessivamente até a adição e posterior desproteção do último resíduo de aminoácido.

Após a última desproteção do grupo Fmoc, os peptídeos foram clivados da resina, utilizando uma solução de ácido trifluoracético (TFA) / triisopropil-silano (TIS) / água Milli-Q[®] (95:2,5:2,5%). Depois de clivados, os peptídeos foram precipitados, utilizando éter diisopropílico gelado, e liofilizados. O TFA da solução de clivagem foi extinto borbulhando-se nitrogênio (N₂) na solução e o resquício deste ácido foi neutralizado com hidróxido de amônio (NH₄OH) pH 9,5. Os peptídeos clivados foram liofilizados e armazenados a 4° C.

Os peptídeos foram suspensos em água Milli-Q[®] e purificados em sistema de cromatografia líquida de alta performance (HPLC), utilizando uma coluna semi-preparativa Supelcosil[™] C-18 (Supelco, Bellefonte, USA). As frações obtidas foram analisadas por espectrometria de massas do tipo MALDI-TOF/TOF.

3.7 - Ensaio de inibição da atividade proteolítica da leucurolisina-a sobre a dimetilcaseína.

Os peptídeos GS-OH e GS-NH₂ foram comparados em sua habilidade de inibir a atividade proteolítica da leuc-a sobre substrato dimetilcaseína (DMC). Quantidades crescentes do peptídeo GS-OH (5, 10, 20, 30 e 40 µg) e GS-NH₂ (5, 10, 20 e 40 µg) foram pré-incubadas com uma concentração fixa de 4 µg da enzima por 30 minutos à 37° C, em 250 µL do tampão ácido 4-2-hidroxietil-1-piperazina-etanosulfônico (HEPES) 50 mmol ·

L^{-1} contendo $0,154 \text{ mol} \cdot L^{-1}$ cloreto de sódio (NaCl), $25 \text{ mol} \cdot L^{-1}$ cloreto de cálcio ($CaCl_2$) pH 7,4.

Os tubos de reação foram preparados com 250 μL de uma solução de DMC 0,2% em tampão HEPES $50 \text{ mmol} \cdot L^{-1}$ contendo $0,154 \text{ mol} \cdot L^{-1}$ NaCl, $25,0 \text{ mol} \cdot L^{-1}$ $CaCl_2$ pH 7,4. A mistura de leuc-a e peptídeos pré-incubados foram adicionados aos tubos com DMC, em um volume final de 500 μL , e novamente incubados por 30 minutos à $37^\circ C$. A reação foi interrompida com a imersão dos tubos em água fervendo ($98^\circ C$) por 5 minutos. Aos tubos foram adicionados 250 μL de ácido 2,4,6-trinitrobenzenesulfônico (TNBS) e 250 μL de tampão 4 % de bicarbonato de sódio ($NaHCO_3$) pH 8,3. Os tubos foram novamente incubados por 30 minutos à $50^\circ C$. Ao final desse tempo de incubação, foram adicionados 250 μL de dodecil sulfato de sódio (SDS) a 10 % e 125 μL de uma solução de ácido clorídrico (HCl) 1 normal (N) a cada tubo. A absorbância da solução resultante da reação foi medida em um espectrofotômetro no comprimento de onda de 340 nanômetros (nm) relativo ao branco (todos os componentes do ensaio exceto a enzima).

3.8 - *Análise de superfície molecular.*

As estruturas da leucurolisina-a e das outras SVMP de classe P-I disponíveis foram submetidas à análise de superfície molecular utilizando o software *Surface Racer* v 5.0 (Tsodikov et al., 2002). O software transforma a macromolécula em uma coleção de esferas de Van der Waals rígidas e usa uma sonda esférica e sólida, simulando uma molécula de solvente, que rola sobre a superfície dessas esferas. A superfície esférica da sonda, em contato com os vários átomos na superfície da molécula, descreve segmentos, concavidades e reentrâncias que compõe toda superfície gerada.

A área de superfície acessível (A.S.A.) é definida como todas as posições adotadas pelo centro da sonda em contato com os átomos da macromolécula. A área de superfície molecular (A.S.M.) é definida como a superfície traçada pela superfície da sonda ao rolar sobre a macromolécula. A sonda percorre toda macromolécula unindo todos os seguimentos, concavidades e reentrâncias para formar a superfície molecular. Depois de definidas as áreas, o programa calcula as seguintes A.S.A. e A.S.M: total, polar, não polar,

cadeia carbônica total, cadeia carbônica polar, cadeia carbônica não polar, cadeia lateral polar, cadeia lateral não polar, carga positiva, carga negativa e número de cavidades.

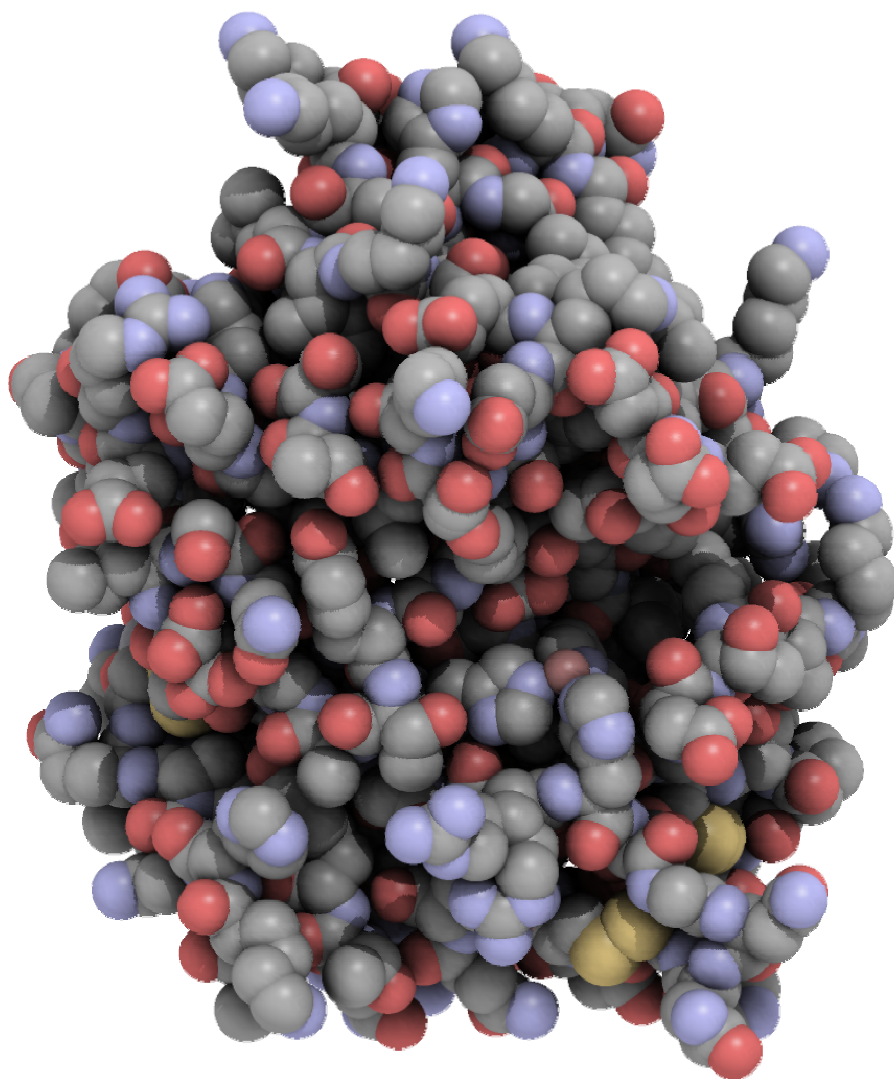
As figuras com as representações das superfícies eletrostáticas das SVMP de classe P-I foram geradas pelo software *APBS: Adaptive Poisson-Boltzmann Solver* (Baker et al., 2001).

3.9 - SDS-PAGE da inibição da atividade proteolítica da leucurolisina-a sobre o fibrinogênio humano.

Uma concentração fixa de 4 μg de leuc-a com diferentes quantidades de peptídeo GS-NH₂ (40 e 80 μg), foram pré-incubados por 15 minutos à 37° C em um volume final de 100 μL do tampão HEPES 50 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ contendo 0,154 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl, 25 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ CaCl₂, pH 7,4. Após o período de incubação, uma alíquota de 20 μL dos incubados (enzima + inibidor) foi adicionada a um tubo contendo 100 μL de uma solução 3 mg / mL de fibrinogênio humano (Fb) (Sigma-Aldrich, USA). Essa solução foi novamente incubada por 15 minutos à 37° C. Depois deste novo período de incubação, foram tomados 50 μL e misturados com 50 μL de solução desnaturante (10 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ de uréia, 4 % β -mercapto-etanol, 4 % SDS) e mantidos “*over night*” à temperatura ambiente. As amostras foram aplicadas em um dodecil sulfato de sódio - gel eletroforético de poliacrilamida (SDS-PAGE) com 4 % (gel de concentração) e 12 % (gel de separação) conforme descrito por Laemmli (1970). Ao final da eletroforese, o gel foi corado com o corante *coomassie brilliant blue* R-250 (Sigma-Aldrich, USA) 0,25% em etanol / ácido acético / água (1 : 2 : 6) e descorado com a mesma solução sem a adição do corante. O padrão de massa molecular usado: fosforilase-b = 97 quilo Daltons (kDa); albumina sérica bovina = 66 kDa; ovoalbumina = 45 kDa; anidrase carbônica = 30 kDa; inibidor da tripsina = 20,1 kDa; e α -lactoalbumina = 14,4 kDa (Sigma-Aldrich, USA). Um incubado com leuc-a e ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) 1 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ foi utilizado como controle no experimento.

3.10 - Gráficos.

Os gráficos e análises estatísticas apresentados como resultado desse trabalho, foram gerados utilizando o software *GraphPad Prism 5* (San Diego, USA).



4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO.

4.1 - Sequenciamento dos resíduos de aminoácidos da leucurolisina-a

Aproximadamente 95% da estrutura primária da leuc-a foi descrita anteriormente por Bello (2006). Naquela ocasião, alguns resíduos, principalmente na região N-terminal e em uma região anterior ao sítio ativo, não haviam sido identificados. Como o lote de veneno e a enzima purificada por Bello em 2006 não estavam disponíveis para esse trabalho, uma nova purificação foi realizada. Após o processo de purificação, a leuc-a foi analisada por espectrometria de massas a fim de avaliar sua homogeneidade e sua massa molecular (figura 5).

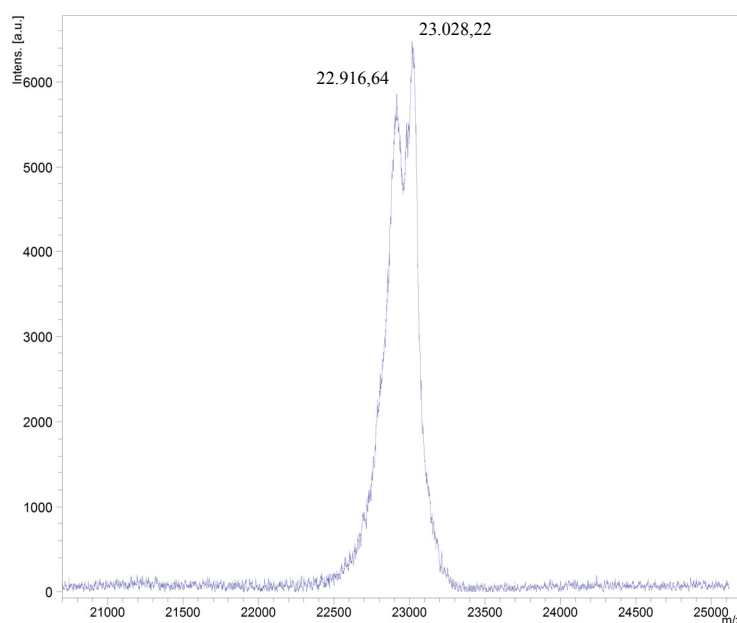


Figura 5 - Espectro de massa da leucurolisina-a nativa. Duas isoformas, com sinais em 22.916,64 e 23.028,22 m/z , podem ser observadas no espectro.

O processo de sequenciamento dos resíduos de aminoácidos da leuc-a foi realizado, de modo complementar, por três métodos diferentes: degradação automática de Edman, MALDI-TOF-TOF MS/MS e interpretação de mapas de densidade eletrônica (2Fo-Fc, σ c).

O espectro de massa da leuc-a nativa mostrou a presença de duas isoformas

principais, com sinais em 22.916,64 e 23.028,22 $\frac{\text{massa}}{\text{carga}}$ (m/z). A diferença de m/z entre as duas isoformas corresponde a uma massa de ~ 111 Da. Essa diferença pode ser explicada pela presença de um resíduo de ácido piroglutâmico (<E) no início da porção N-terminal, que pôde ser comprovado pelo seqüenciamento MS/MS de dois fragmentos peptídicos resistentes a degradação automatizada de Edman. Ambos os fragmentos foram gerados por digestão enzimática, o primeiro utilizando quimiotripsina e o segundo utilizando V8. O fragmento, cuja seqüência é <E-Q-F-S-P-R-Y-I-E-L-V-V-V-A-D, apresenta m/z de 1630,87 e, o outro fragmento, apresenta a seqüência Q-Q-F-S-P-R-Y-I-E com m/z de 1167,57. Os dois fragmentos pertencem à porção N-terminal, que pode, portanto, apresentar uma glutamina ou um ácido piroglutâmico como primeiro resíduo da seqüência. A diferença entre um ácido piroglutâmico e uma glutamina é de 17 Da, que ocorre devido à perda de um NH₃, após ciclização espontânea da amina primária exposta da glutamina, formando um lactam em meio ácido. Essa mudança torna o fragmento resistente ao seqüenciamento do N-terminal pela degradação de Edman.

A massa média calculada para a leuc-a, com a presença de um resíduo de glutamina (seqüência iniciando em Q-Q-F-S-P...) ou um ácido piroglutâmico (seqüência iniciando em <E-Q-F-S-P...) no N-terminal, é de 22.984,28 e 22.967,28 Da, respectivamente. Esse valor é muito próximo à massa observada de 23.028,22 Da (figura 1), com uma diferença entre as massas calculadas e observada de ~ 44 e 61 Da, respectivamente. Se a mesma análise for feita para a seqüência da leuc-a, iniciando sem um resíduo de glutamina (Q-F-S-P-R... ou <E-F-S-P-R...), teremos os valores de massas médias calculadas de 22.856,15 e 22.839,15 Da, respectivamente. Esses valores de massa calculados também estão próximos ao sinal de 22.916,64 m/z observado, com uma diferença de ~ 61 e 77 Da, respectivamente.

A região de peptídeo sinal e pró-domínio são compostas por 190 resíduos de aminoácidos altamente conservados e o processamento sofrido para a retirada do pró-domínio ocorre em uma região de junção com o domínio metaloprotease, de seqüência N-L-N-P-D/E/Q-Q-Q-R/K/F [a área marcada pertence ao pró-domínio] (Ramos e Selistre-De-Araújo, 2006). A clivagem para a retirada do pró-domínio ocorre nas ligações entre glutaminas. Em algumas enzimas, esse processamento pode ocorrer

retirando alguns resíduos de aminoácidos do domínio metaloprotease. Essa variabilidade na área de corte do processamento pode explicar o aparecimento de duas isoformas da leuc-a, uma com N-terminal iniciando com <E/Q-Q-F-S-P... e outra iniciando com Q-F-S-P....

A figura 6 mostra a sequência completa dos resíduos de aminoácidos, com correções àquela previamente publicada por Bello e colaboradores (2006), alinhada às outras SVMP de classe P-I da Família Viperidae já conhecidas. No alinhamento, composto de sequências de SVMP de classe P-I não hemorrágicas e hemorrágicas, sobressai uma alta identidade entre as sequências e muitos resíduos conservados. Essa alta identidade se reflete em estruturas secundárias em regiões idênticas.

A leucurolisina-a é composta por 202 resíduos de aminoácidos e exibe a sequência H₁₄₂E₁₄₃XXH₁₄₆XXG₁₄₉XXH₁₅₂ em seu sítio ativo associado a um “*met-turn*” (C₁₆₄I₁₆₅M₁₆₆). Essas duas regiões consenso, altamente conservadas, são motivos característicos das SVMP (Stöcker *et al.*, 1995). A leuc-a apresenta seis resíduos de cisteína conservados, nas posições 117, 157, 159, 164, 181 e 197, indicando que essa enzima pertence ao grupo das SVMP com três pontes dissulfeto. A sequência apresenta os resíduos conservados Asp₉₃, Cys₁₉₇, e Asn₂₀₀, que são descritos por estarem envolvidos na estabilização de um átomo de cálcio (Gomis-Rüth *et al.*, 1993; Zhang *et al.*, 1994; Gong *et al.*, 1998). A leuc-a não apresenta sítios de glicosilação (N-X-S/T), conforme reportado por Bello (2006) e para várias outras sequências de SVMP de classe P-I publicadas (Watanabe *et al.*, 2003).

4.2 - Cristalização e difração de raios-X da leucurolisina-a nativa.

Os testes de cristalização e os experimentos de difração de raios-X foram realizados nas condições descritas em Materiais e Métodos. Algumas das condições iniciais de cristalização onde se produziram cristais foram selecionadas para otimização e amplificação. A partir das condições iniciais de cristalização uma matriz de otimização foi elaborada a partir das condições iniciais onde os melhores cristais cresceram.

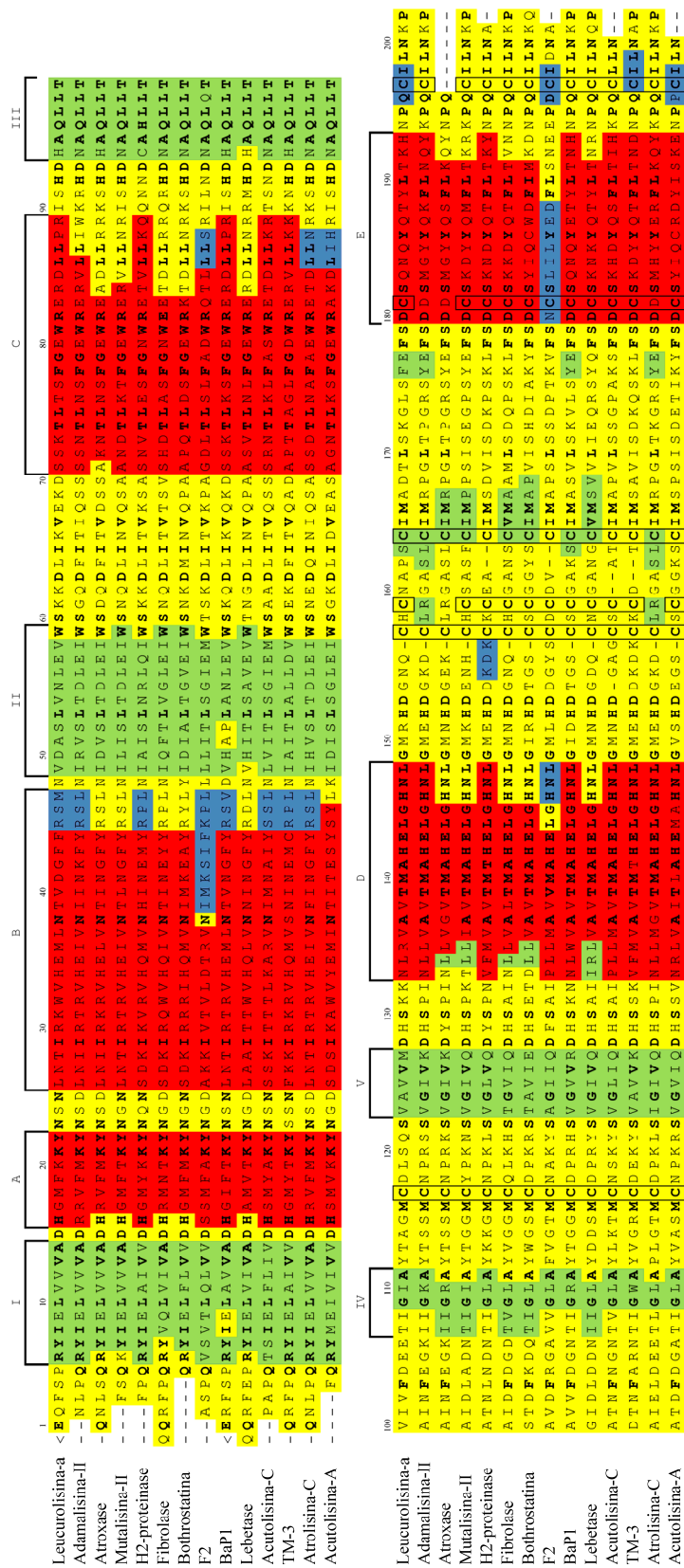


Figura 6 - Alinhamento de seqüências e estrutura secundária da leucorolisina-a e outras SVMP de classe P-I da família Viperidae. Os números se referem à seqüência de resíduos de aminoácidos da leuc-a. As cisteínas envolvidas em pontes dissulfeto estão delimitadas por caixas. As letras em negrito indicam resíduos conservados. *Gaps* foram inseridos na seqüência para maximizar o alinhamento. As cores representam regiões de estrutura secundária: **amarelo** representa regiões de loops; **verde** representa regiões de fitas; **vermelho** representa regiões de hélices; **azul** representa regiões de hélices 3_{10} . **Proteínas não-hemorrágicas:** leucorolisina-a da *Bothrops leucurus*; (P34179) adamalisina-II da *Crotalus adamanteus*; (Q91401) atroxase da *Crotalus atrox*; (P22796) fator hemorrágico-II (LHF-II ou mutalisina-II) da *Lachesis muta muta*; (P20165) H2-proteinase da *Trimeresurus flavoviridis*; (P28891) fibrolase da *Agkistrodon contortrix contortrix*; (Q98SP2) bothrostatina da *Bothrops jararaca*; e (PDB 1YP1) enzima fibrinogenolítica (F2) da *Agkistrodon (Deinakistrodon) acutus*. **Proteínas hemorrágicas:** (PDB 1ND1) *Bothrops asper* metaloproteinase (BaP1); (Q98995) lebetase da *Vipera lebetina*; (PDB 1QUA) acutolisina-C da *Agkistrodon (Deinakistrodon) acutus*; (PDB 1KUF) metaloproteinase da *Trimeresurus mucrosquamatus* (TM-3); (PDB 1HTD) atrolisina-C da *Crotalus atrox*; e (PDB 1BUD) acutolisina-A da *Agkistrodon (Deinakistrodon) acutus*.

Usando a nova matriz, 192 novas condições de cristalização foram testadas. Alguns dos cristais (crescidos na condição $100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ MIB/MIB pH 5,0 | 20 % P/v PEG 6000 | $100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ de acetato de amônio) foram dissolvidos em água Milli-Q®/TFA 0,1% e submetidos à espectrometria de massas. A figura 7 mostra o espectro de massas desses cristais dissolvidos, com um sinal principal de 23.004,50 m/z , que corresponde à massa de uma das isoformas observadas da leucurolisina-a nativa purificada, cuja sequência se inicia com <E/Q-Q-F-S-P-R....

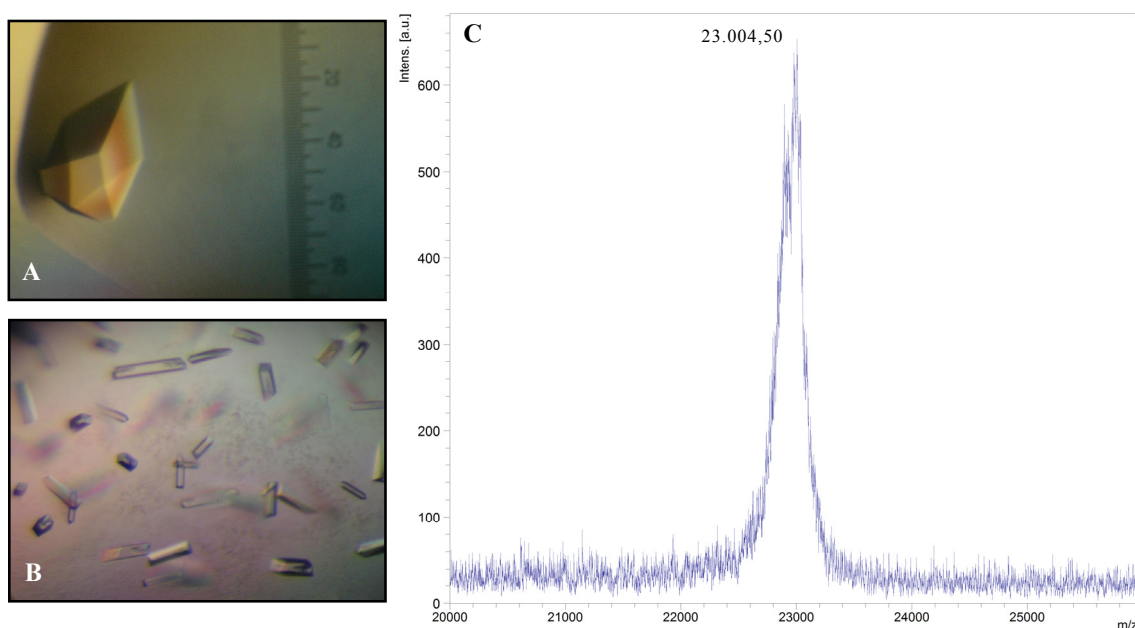


Figura 7 - Cristais e espectro de massa dos cristais de leucurolisina-a. **(A)** cristal crescido em uma das condições iniciais; **(B)** cristais crescidos na condição otimizada e amplificada $100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ MIB / MIB pH 5,0 | 20 % P/v PEG 6.000 | $100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ de acetato de amônio; **(C)** espectro de massa de cristais dissolvidos em água Milli-Q / TFA 0,1 %.

Duas condições de cristalização otimizadas ($100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ MIB/MIB pH 5,0 | 20 % P/v PEG 6.000 | $100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ de acetato de amônio e $100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ MIB/MIB pH 4,0 | 15 % P/v PEG 1.500 | $100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ de acetato de amônio) tiveram cristais colhidos para os experimentos de difração de raios-X. A tabela 3 mostra a estatística dos dados de difração dos conjuntos de dados a 1,8 e 1,6 Å utilizados nesse trabalho.

Para a etapa de Substituição Molecular, utilizada para os dois conjuntos de dados, a estrutura cristalográfica da metaloprotease BaP1, purificada do veneno de *Bothrops asper*

(PDB 1ND1), foi usada como modelo de busca. As soluções obtidas em ambos os casos apresentaram, após o último ciclo de refinamento de corpo rígido, um valor de R_{fator} de 0,43. Ciclos posteriores de refinamento com vínculos, inserções de moléculas de água, recorrentes inspeções dos mapas de densidade eletrônica e alterações manuais dos modelos cristalográficos nos permitiram determinar as estruturas tridimensionais da leucurolisina-a nos cristais coletados. É importante ressaltar que no conjunto de dados com 1,6 Å de resolução, uma densidade eletrônica não identificada, foi observada no sítio catalítico da proteína. O estudo desse conjunto de dados será abordado posteriormente.

Para evitar confusões na leitura do texto, os modelos cristalográficos serão identificados como: *enzima livre* - modelo com 1,8 Å de resolução e sítio catalítico livre; *enzima em complexo* - modelo com 1,6 Å de resolução e sítio catalítico com a presença de uma densidade eletrônica desconhecida.

Tabela 3 - Sumário estatístico dos dados de difração dos cristais de leucurolisina-a. Os valores estatísticos para as faixas de maior resolução, para cada conjunto de dados, estão entre parênteses.

	<i>Conjunto de dados 1</i>	<i>Conjunto de dados 2</i>
Comprimento de onda (Å)	1.425	
Grupo espacial	P 2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	
Parâmetros de célula unitária (Å)	a=44.0, b=56.2, c=76.3	a=44.0, b=58.6, c=76.3
Faixa de resolução (Å)	50.0 – 1.80 (1.84 – 1.80)	50.0 – 1.60 (1.64 – 1.60)
No. de observações	185231 (3294)	139715 (7294)
No. de reflexões únicas	17761 (914)	26476 (1722)
Plenitude dos dados (%)	98.1 (77.5)	99.0 (99.0)
$I / \sigma (I)$	38.7 (2.8)	11.1 (3.1)
Redundância	10.4 (3.6)	5.3 (4.2)
$R_{\text{merge}}^{\dagger}$	0.054 (0.365)	0.136 (0.412)
Valor de Matthews (Å³ Da⁻¹)	2.05	2.14
Conteúdo de solvente (%)	40.1	42.7

$\dagger R_{\text{merge}} = \sum_{\text{hkl}} \sum_i |I_i(\text{hkl}) - \langle I(\text{hkl}) \rangle| / \sum_{\text{hkl}} \sum_i I_i(\text{hkl})$, onde $I_i(\text{hkl})$ é a i^{th} de intensidade de medida da reflexão de hkl e $\langle I(\text{hkl}) \rangle$ é a sua média.

4.3 - Descrição da estrutura do modelo cristalográfico da enzima livre (modelo com 1,8 Å de resolução).

Os processos de refinamento da estrutura cristalográfica da leucurolisina-a até a obtenção do modelo tridimensional final foram realizados como descrito em Materiais e Métodos. A tabela 4 apresenta as estatísticas de refinamento do modelo cristalográfico da enzima livre. Apesar dos resultados do seqüenciamento indicarem a presença de um resíduo de ácido piroglutâmico como o primeiro resíduo da seqüência, não foi possível localizar esse resíduo nos mapas de densidade eletrônica da enzima livre nem da enzima em complexo. Esse fato pode ser explicado pela alta flexibilidade da região N-terminal que está localizada na superfície da estrutura, em contato direto com o solvente. A ausência desse primeiro resíduo, e de outros na região N-terminal, é uma observação que também pode ser feita em outros modelos cristalográficos de SVMP de classe P-I já descritos. O único modelo de SVMP de classe P-I descrito, que apresenta esse resíduo iniciando a seqüência na estrutura, é a BaP1 (PDB 1ND1; Watanabe *et al.*, 2003).

Tabela 4 - Sumário estatístico dos dados de refinamento do modelo da enzima livre.

Programa	Refmac 5.2.0019
R-fator	0,168
R-fator livre	0,235
Subconjunto para R-fator livre (%)	10,2
Coeficiente de correlação	0,963
Valor médio para B-fator ($\text{\AA}^2$)	24,7
RMSD dos valores ideais	
Comprimento de ligação de átomos refinados ($\text{\AA}$)	0,025
Ângulos de ligação de átomos refinados (graus)	2,134
Nº de resíduos de aminoácidos	201
Nº de átomos na proteína (não hidrogênios)	1656
Nº de íons metálicos	1 Zn e 1 Ca
Nº de moléculas de etileno-glicol	3
Nº de moléculas de água	239

A estrutura da *enzima livre* segue o mesmo arranjo tridimensional de outras SVMP de classe P-I já descritas (Gomis-Rüth *et al.*, 1993; Zhang *et al.*, 1994; Kumasaka *et al.*, 1996; Gong *et al.*, 1998; Zhu *et al.*, 1999; Huang, 2002; Watanabe *et al.*, 2003; Lou *et al.*, 2005). A figura 8 apresenta o modelo cristalográfico da enzima livre. A leuc-a é uma molécula elipsoidal, com dois domínios estruturais distintos divididos pela fenda do sítio ativo. O subdomínio maior, compreendendo os resíduos 1 a 152 apresentam elementos de estrutura secundária característicos de uma proteína α/β . Esse domínio consiste de uma folha- β torcida, posicionada no centro da molécula, composta de cinco fitas (I a V) cercada por quatro α -hélices (A a D).

A fita-I (resíduos 6 a 14), a fita-II (resíduos 49 a 58), a fita-III (resíduos 94 a 99) e a fita-V (resíduos 123 a 127) são paralelas, enquanto a fita-IV (resíduos 109 a 111) é antiparalela. As fitas I e II se conectam pela curta hélice A (resíduos 16 a 22) e a longa hélice B (resíduos 26 a 44) que termina em uma curta hélice 3_{10} (resíduos 45 a 47). Uma região de alça (resíduos 59 a 70) conecta a fita-II à hélice C (resíduos 71 a 89), que corre pelo lado oposto aos das hélices A e B. O domínio principal prossegue com uma sucessão

de regiões de alças e de fitas- β (fitas III, IV e V) que ligam a hélice C à hélice D (resíduos 133 a 148). A hélice D, que ajuda a formar o sítio ativo, atravessa a molécula, passando por debaixo das fitas III, IV e V.

O subdomínio menor (resíduos 153 a 202) é formado por um complexo de várias alças (resíduos 153 a 179), a longa hélice E (resíduos 180 a 193) e uma discreta hélice 3_{10} (resíduos 196 a 198) na porção C-terminal. Esse subdomínio abriga a “*met turn*” (M₁₆₆) e, juntamente com a hélice D do domínio principal, formam o sítio catalítico da enzima. A leuc-a apresenta três pontes dissulfeto conservadas; Cys₁₁₇-Cys₁₉₇ que liga o subdomínio principal ao subdomínio menor, Cys₁₅₇-Cys₁₆₄ e Cys₁₅₉-Cys₁₈₁ que estabilizam do complexo de várias alças no domínio menor.

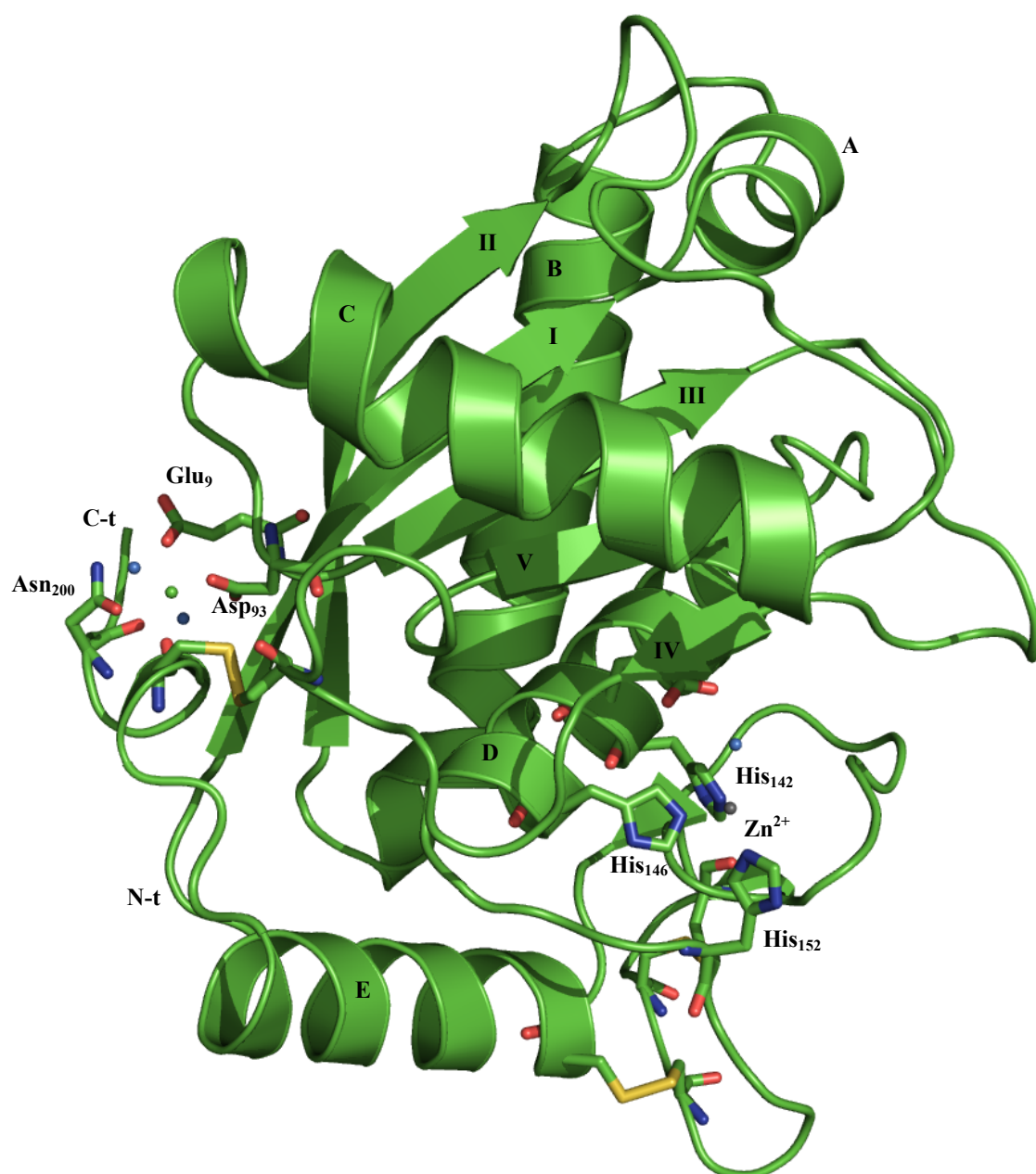


Figura 8 - Modelo cristalográfico da proteína não-hemorrágica leucorolisina-a a 1,8 Å de resolução. **N-t** e **C-t**, correspondem a N-terminal e C-terminal. As letras e algarismos romanos correspondem às estruturas secundárias. As ligações em amarelo representam as pontes dissulfeto. As esferas cinza, verde e azul correspondem, respectivamente: átomo de zinco, cálcio e moléculas de água.

4.4 - Ambiente de ligação do íon zinco.

A figura 9 e a tabela 5 mostram o ambiente de ligação e a geometria de ligação do íon zinco (Zn^{2+}). Todos os modelos cristalográficos de SVMP de classe P-I já descritos exibem em seu sítio catalítico um átomo de Zn^{2+} . Esse átomo é tetra-coordenado por átomos $\text{N}^{\text{E}2}$ dos anéis imidazólicos de três resíduos de histidina e por uma molécula de água. Os três resíduos de histidinas são os mesmos presentes na sequência consenso $\text{H}_{142}\text{E}_{143}\text{XXH}_{146}\text{XXG}_{149}\text{XXH}_{152}$, a molécula de água é polarizada pela cadeia lateral do resíduo E_{143} . Com exceção do resíduo H_{152} , que se localiza no complexo de alças, os outros três resíduos (H_{142} , E_{143} e H_{146}) se localizam na hélice D do subdomínio principal.

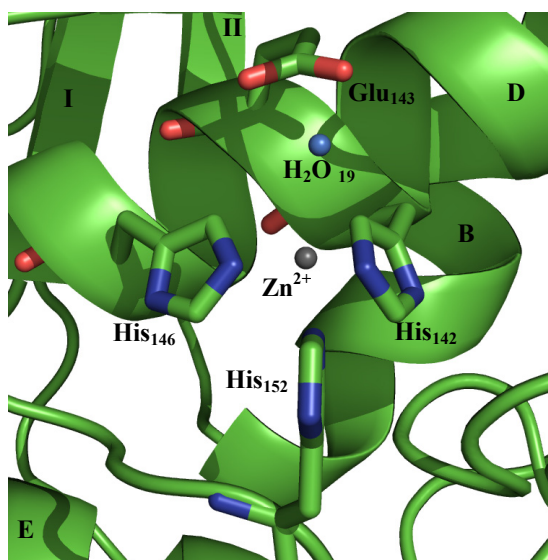


Figura 9 - Ambiente de ligação do íon zinco no sítio catalítico da leuc-a. A numeração dos resíduos refere-se ao modelo da enzima livre.

Tabela 5 - Distâncias atômicas entre o íon zinco e seus ligantes, no modelo cristalográfico da enzima livre. A numeração dos resíduos refere-se ao modelo da enzima livre.

<i>Geometria do ambiente de ligação do Zn^{2+} (Å)</i>	
<i>His₁₄₂ N ε2 - Zinco</i>	2.08
<i>His₁₄₆ N ε2 - Zinco</i>	2.00
<i>His₁₅₂ N ε2 - Zinco</i>	1.95
<i>Molécula de água₁₉ - Zinco</i>	2.51
<i>Molécula de água₁₉ - Glu₁₄₃ O ε1</i>	3.10
<i>Molécula de água₁₉ - Glu₁₄₃ O ε2</i>	2.49

Um quinto ligante do íon zinco foi descrito na astacina, uma zinco-endorpeptidase digestiva do “crayfish” *Astacus astacus* (Stöcker *et al.*, 1993). Esse quinto ligante, um resíduo de tirosina (Tyr₁₄₉), localiza-se no assoalho do sítio ativo, imediatamente após o “met turn” e, possivelmente, auxilia na fixação do substrato no sítio ativo (Stöcker *et al.*, 1995). Nas SVMP um resíduo conservado de glicina (G₁₄₉) ocupa a posição dessa tirosina (Tyr₁₄₉), não sendo descrito nenhum quinto ligante, ou outro qualquer, nessas enzimas.

O átomo de zinco localiza-se no fundo do sítio catalítico, na posição S1, da leuc-a. O sítio catalítico é formado pelos resíduos Ile₁₀₈, Gly₁₀₉, Ile₁₁₀, Ala₁₁₁, Val₁₃₈, Thr₁₃₉, Ala₁₄₁, His₁₄₂, Glu₁₄₃, His₁₄₆, His₁₅₂, Cys₁₆₄, Ile₁₆₅, Met₁₆₆, Ala₁₆₇, Asp₁₆₈ e Thr₁₆₉ (figura 10).

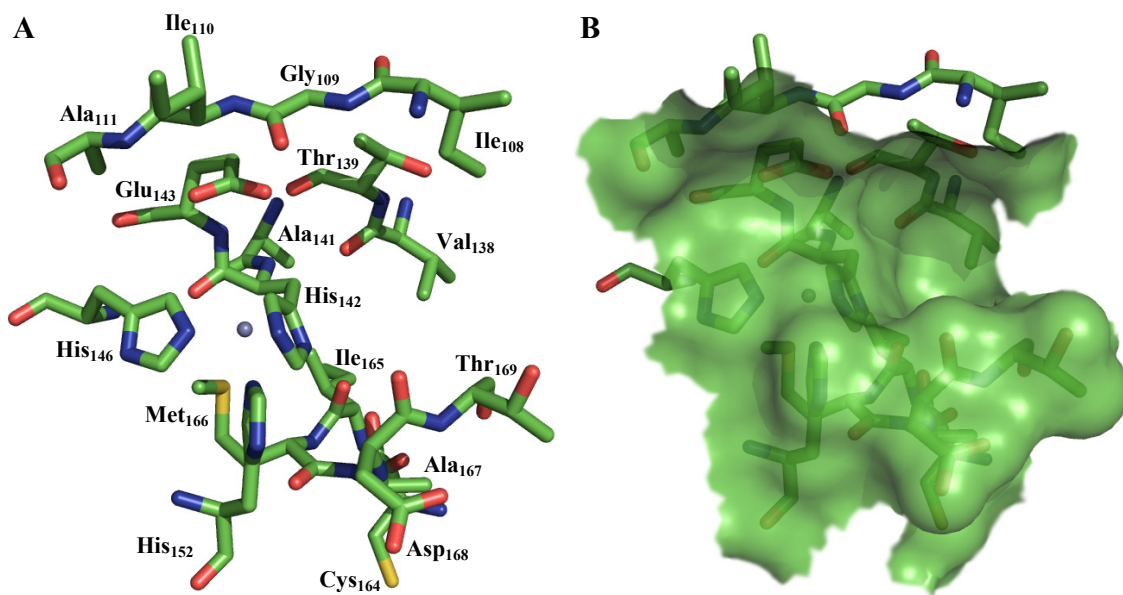


Figura 10 - Resíduos de aminoácidos presentes no sítio catalítico da leuc-a. **(A)** Disposição dos resíduos no sítio catalítico. **(B)** Visão da superfície do sítio catalítico. A numeração dos resíduos refere-se ao modelo da enzima livre.

Os resíduos Gly₁₀₉, Ala₁₁₁, Thr₁₃₉, His₁₄₂, Glu₁₄₃, His₁₄₆, His₁₅₂, Cys₁₆₄, Ile₁₆₅ e Met₁₆₆ (“*met turn*”) são resíduos conservados nas SVMP de classe P-I. A cadeia lateral do resíduo de metionina (Met₁₆₆) forma um assoalho hidrofóbico que parece ser importante para a correta conformação e estabilização do sítio catalítico (Gomis-Rüth *et al.*, 1993). Substituições em algumas dessas posições podem ser observadas em outras SVMPs (figura 5 e figura 11) a posição 108 pode ser substituída por outro resíduo hidrofóbico (L ou V); a posição 110 pode ser substituída por resíduos carregados (R ou K) ou resíduos hidrofóbicos (L ou W); a posição 138 pode ser substituída por outro resíduo hidrofóbico (L ou I); a posição 141 pode ser substituída por um resíduo polar (T); a posição 168 pode ser substituída por um resíduo polar (S) ou resíduos apolares (P, A e V); e a posição 169 pode ser substituída por um resíduo polar (S) ou por resíduos apolares (G, M ou V).

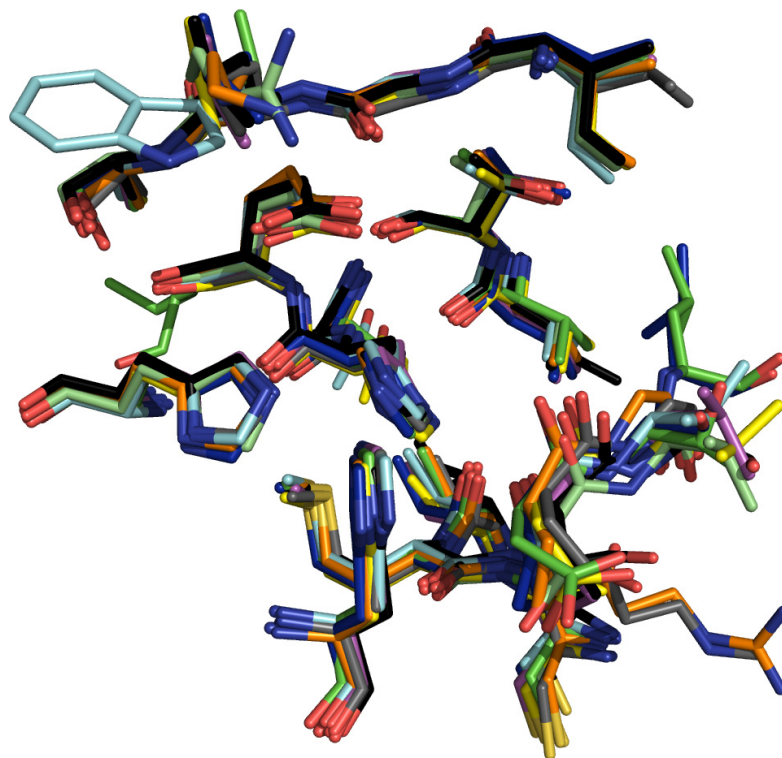


Figura 11 - Alinhamento dos resíduos de aminoácidos presentes nos sítios catalíticos dos modelos cristalográficos das SVMP de classe P-I disponíveis com a leuc-a. Cores: leuc-a em verde; adamalisina-II em laranja; H2 em amarelo; F2 em azul; BaP1 em lima; acutolisina-C em magenta; TM-3 em ciano; atrolisina-C em cinza; acutolisina-A em preto.

A molécula de água, além de ser o quarto ligante do íon zinco possui outro papel, sugerido em estudos do modelo cristalográfico da atrolisina-C (PDB 1DTH e 1HTD; Zhang *et al.*, 1994) com inibidores. Esses estudos mostraram que a molécula de água está envolvida no ataque nucleofílico e clivagem de uma ligação peptídica do substrato (Ramos e Selistre-De-Araújo, 2006), por esse motivo essa molécula de água é chamada de *água catalítica*. Gomis-Rüth *et al.* (1993), no trabalho de descrição da adamalisina-II (primeiro modelo cristalográfico de uma SVMP de classe P-I), propôs que a distância de contato, entre a molécula de água catalítica e o grupo carboxilato da cadeia lateral do resíduo E₁₄₃, parece crucial para a atividade proteolítica. Evidências estruturais sugeriam que distância de contato e a atividade proteolítica pareciam estar relacionadas ao *pKa* do grupo carboxilato da cadeia lateral desse resíduo, que é 4,3 (Gomis-Rüth *et al.*, 1993). Sob

condições ácidas, o grupo carboxilato do resíduo E₁₄₃ apresentaria pouca habilidade de polarizar a molécula de água catalítica, aumentando suas distâncias interatômicas e diminuindo a atividade proteolítica. De modo inverso, o aumento dos valores de pH, para uma faixa mais básica, diminuiriam suas distâncias interatômicas, favorecendo o ataque nucleofílico (Zhu *et al.*, 1999). Dessa forma, grandes distâncias interatômicas (maiores do que 4,0 Å), como consequência de uma mudança no valor do pH (para a faixa ácida), poderiam afetar a capacidade de polarização do E₁₄₃ sobre a molécula de água catalítica. Essa seria uma explicação estrutural para o fato de que algumas metaloproteases estarem inativas ou apresentarem baixa atividade em pH ácido (Gong *et al.*, 1998). Um fato que pode colaborar com essa observação é que no lúmen da glândula de veneno, altas concentrações de citrato já observadas geram um ambiente com pH ácido. O baixo pH, agindo em conjunto com inibidores peptídicos endógenos, limitariam a atividade das SVMP (Fox e Serrano, 2008).

A adamalisina-II (PDB 1IAG; Gomis-Rüth *et al.*, 1993) foi cristalizada em pH ácido (5,0), longe de sua faixa de pH ótimo (12,0) (Gong *et al.*, 1998). Na estrutura dessa enzima, a água catalítica está presente, embora esteja localizada a uma distância superior a 4,0 Å do grupo carboxilato do resíduo E₁₄₃, dessa forma, o modelo cristalográfico não seria um modelo de enzima ativa.

A acutolisina-A (PDB 1BUD e 1BSW; Gong *et al.*, 1998) foi cristalizada em dois valores distintos de pH, 5,0 e 7,5. Entretanto, nenhuma mudança significativa na conformação pode ser observada entre os dois modelos, exceto por alguns resíduos que apresentam cadeias laterais flexíveis em áreas acessíveis ao solvente e na superfície molecular (Gong *et al.*, 1998). As distâncias de contato entre a molécula de água catalítica e o grupo carboxilato do resíduo E₁₄₃ nos dois modelos estão abaixo de 4,0 Å, o que seria um indicativo de que a enzima estaria ativa.

Bello *et al.* (2006) definiu a faixa de pH ótimo para atividade proteolítica da leuc-a entre 6,0 e 7,0. Testes de hidrólise da DMC, em pH 5,0, mostraram que a leuc-a ainda mantém 71% de sua atividade proteolítica (dados não mostrados). Testes em faixas de pH inferiores a 5,0 não foram possíveis, pois a DMC não se solubiliza suficientemente para o teste. Os cristais de leuc-a utilizados para os experimentos de difração de raios-X cresceram em pH 5,0, não muito distante de seu pH ótimo. A distância entre a molécula de água

catalítica e o grupo carboxilato do resíduo E₁₄₃ tem um valor abaixo de 4,0 Å (tabela 5). A distância interatômica, observada no modelo da leuc-a, apresenta um valor próximo aos observados em outras SVMP de classe P-I cristalizadas em faixas de pH próximas às de pH ótimo para a atividade enzimática. Essa observação estrutural confirma os testes de hidrólise da DMC, que mostram que a leuc-a mantém a atividade mesmo em pH mais baixo.

4.5 - Ambiente de ligação do íon cálcio.

O sítio de ligação ao íon cálcio (Ca²⁺) fica localizado na superfície da proteína, do lado oposto ao sítio catalítico, ligando as regiões N e C-terminais. Esse sítio possui uma estrutura similar àquelas observadas nos modelos da adamalisina-II (PDB 1IAG; Gomis-Rüth *et al.*, 1993), atrolisina-C (PDB 1DTH e 1HTD; Zhang *et al.*, 1994) e acutolisina-A (PDB 1BUD e 1BSW; Gong *et al.*, 1998). O íon Ca²⁺ é hepta-coordenado por duas moléculas de água e cinco átomos presentes nas cadeias laterais de resíduos conservados: o oxigênio da carbonila do resíduo Glu₉; os dois oxigênios do carboxilato do resíduo Asp₉₃, o oxigênio da carbonila do resíduo Cys₁₉₇ e o oxigênio da carboxamida do resíduo Asn₂₀₀. A figura 12 mostra o ambiente de ligação e a tabela 6 mostra a geometria de ligação do íon cálcio (Ca²⁺).

Gomis-Rüth *et al.* (1993) propôs um papel de íon estabilizador para o Ca²⁺ em estruturas de SVMP de classe P-II, P-III e P-IV. Devido a sua localização, na porção C-terminal, esse íon não só manteria a rigidez e estabilidade da região, mas também desempenharia um papel de “fecho”, ou um “ferrolho”, que conectaria o domínio metaloprotease com o domínio desintegrina. Em modelos cristalográficos de SVMP de classe P-III, íons Ca²⁺ desempenham importante papel na estabilização do domínio desintegrina (Takeda *et al.*, 2006; Takeda *et al.*, 2007).

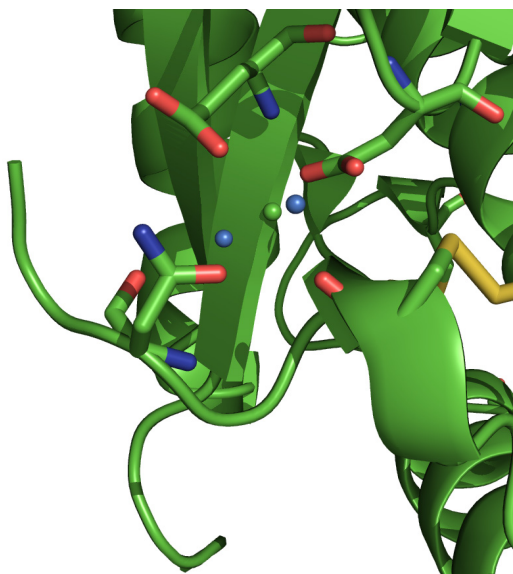


Tabela 6 - Distâncias atômicas entre o íon cálcio e seus ligantes, no modelo cristalográfico da enzima livre. A numeração dos resíduos refere-se ao modelo da enzima

<i>Geometria do ambiente de ligação do Ca^{2+} (Å)</i>	
<i>Glu₉ O ϵ1 - Cálcio</i>	2.24
<i>Asp₉₃ O δ1 - Cálcio</i>	2.49
<i>Asp₉₃ O δ2 -Cálcio</i>	2.51
<i>Cys₁₉₇ O - Cálcio</i>	2.30
<i>Asn₂₀₀ O δ1 - Cálcio</i>	2.40
<i>Molécula de água₂ - Cálcio</i>	2.36
<i>Molécula de água₁₀ - Cálcio</i>	2.38

Xu et al. (2006) demonstrou um acréscimo na resistência à desnaturação alcali-induzida pela acutolisina-A (código PDB 1BUD e 1BSW; Gong *et al.*, 1998) tratada com Ca^{2+} . Esse mesmo estudo mostra que o Ca^{2+} não é essencial para a atividade caseinolítica dessa enzima. Bello *et al.* (2006) relatou que a leuc-a, na presença de $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ de Ca^{2+} em pH 7,0, perde 20 % de sua atividade proteolítica, enquanto o veneno bruto de *B. leucurus* perde 25 % de sua atividade nas mesmas condições.

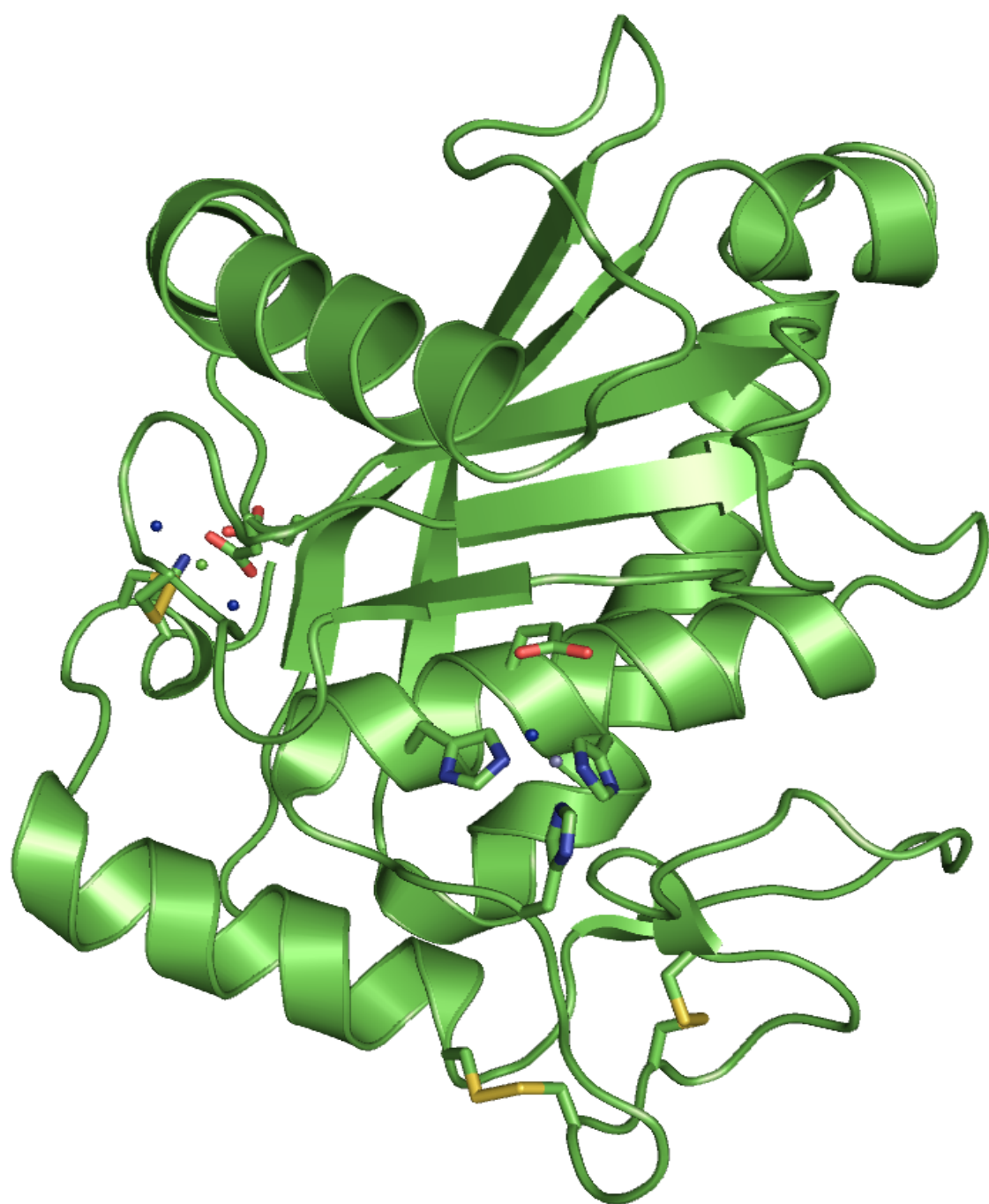
Uma maior concentração de Ca^{2+} induz uma completa inibição da atividade proteolítica da leuc-a (Dr. Eládio Sanchez, comunicação pessoal). O mecanismo por trás desses resultados ainda é desconhecido e uma maior investigação deve ser conduzida a fim de explicá-los.

4.6 - Refinamento da estrutura da enzima em complexo e possível identificação da densidade eletrônica inesperada.

A tabela 7 apresenta os dados estatísticos do refinamento e a figura 13 mostra o modelo cristalográfico da enzima em complexo.

Tabela 7 - Sumário estatístico dos dados de refinamento do modelo da enzima em complexo.

Programa	Refmac 5.2.0019
R-fator	0,175
R-fator livre	0,231
Subconjunto para R-fator livre (%)	5,0
Coeficiente de correlação	0,962
Valor médio para B-fator ($\text{\AA}^2$)	20,9
RMSD dos valores ideais	
Comprimento de ligação de átomos refinados ($\text{\AA}$)	0,025
Ângulos de ligação de átomos refinados (graus)	2,309
Nº de resíduos de aminoácidos	201
Nº de átomos na proteína (não hidrogênios)	1659
Nº de íons metálicos	1 Zn e 1 Ca
Nº de moléculas de etileno-glicol	0
Nº de moléculas de água	344
Presença de uma densidade eletrônica inesperada	



Os modelos cristalográficos da leuc-a (enzima livre e em complexo) são estruturalmente semelhantes, não apresentando mudanças conformacionais significantes. O valor de RMSD (*Root Square Mean Deviation*) entre suas coordenadas atômicas (parte protéica) é de 0,22 Å. Apenas algumas diferenças visuais sutis, nas fitas I, II, III, IV e V e a região de alças (resíduos 153 a 176 que cercam o sítio catalítico), podem ser observadas entre os modelos (figura 14A). Mesmo presença de uma densidade eletrônica inesperada não provocou alterações aparentes no sítio catalítico da leuc-a (figura 14 B). A tabela 8 apresenta a geometria do ambiente de ligação dos íons zinco e cálcio nesse complexo cristalográfico.

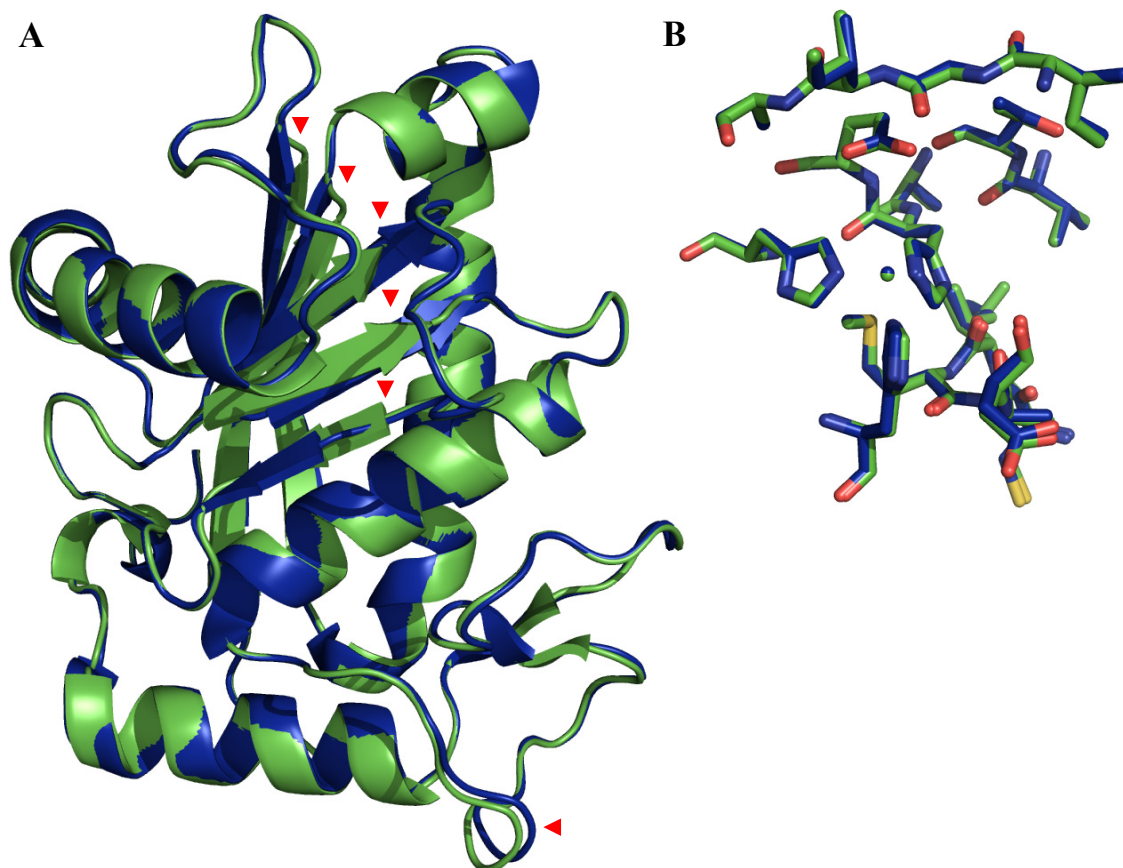


Figura 14 - Sobreposição dos modelos da leuc-a (enzima livre e enzima em complexo). **(A)** Sobreposição dos modelos. As setas vermelhas apontam para as regiões com diferenças visuais entre os modelos. **(B)** Sobreposição entre os sítios catalíticos. **Estrutura em verde:** enzima livre; **Estrutura em azul:** enzima em complexo.

Durante as inspeções iniciais dos mapas de densidade eletrônica, do modelo da enzima em complexo, verificou-se que na região do sítio catalítico havia uma densidade eletrônica desconhecida (figura 15). A densidade eletrônica desconhecida não foi observada nos mapas do modelo da enzima livre. A forma da densidade eletrônica e a sua localização nos levaram a supor, inicialmente, que essa densidade desconhecida poderia pertencer a um ligante que poderia ter sido adicionado no processo de purificação ou de cristalização da proteína. A comparação entre a forma da densidade desconhecida com a forma de compostos químicos, presentes na purificação e nos ensaios de cristalização, que poderiam se ligar à enzima, não revelou nenhuma congruência.

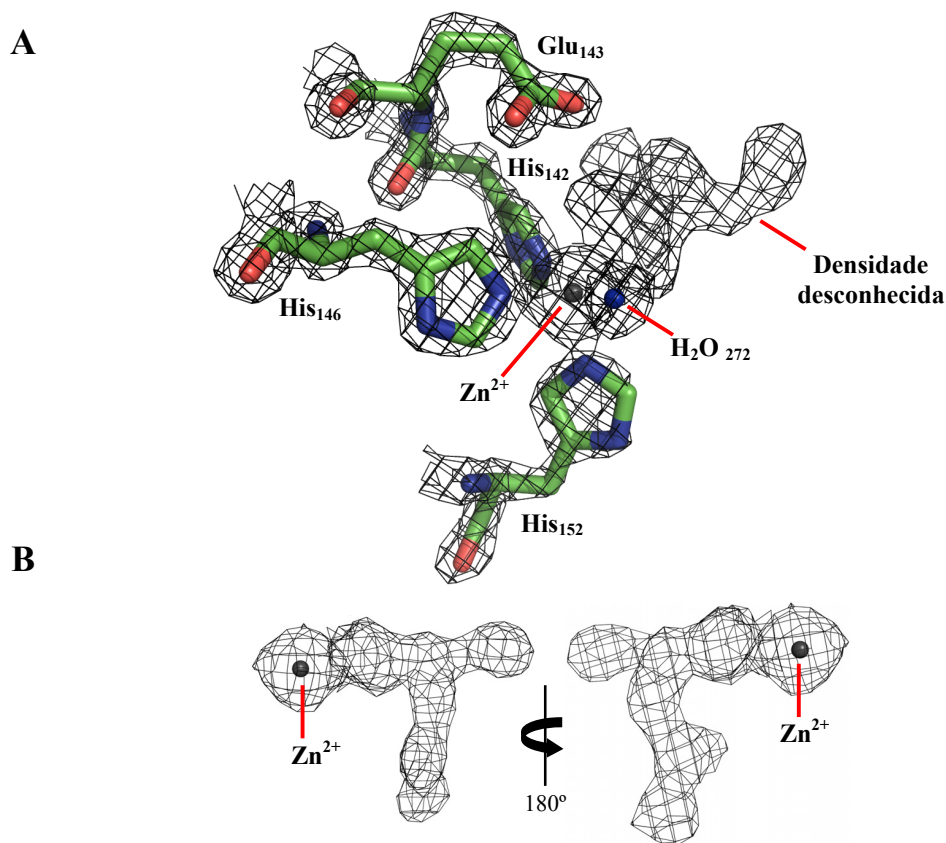


Figura 15 - Localização da densidade eletrônica desconhecida presente no sítio catalítico do modelo da enzima em complexo. **(A)** Representação do sítio catalítico juntamente com a densidade desconhecida. As numerações dos resíduos e da molécula de água são referentes ao modelo da enzima em complexo. **(B)** Giro de 180° da densidade eletrônica desconhecida. O íon zinco (esfera cinza) foi mantido para facilitar a localização. O contorno do mapa de densidade eletrônica ($2F_o - F_c, \sigma$) foi ajustado a 1σ .

Após essa primeira análise, levantamos a hipótese que a densidade eletrônica desconhecida poderia pertencer a um inibidor endógeno presente no veneno. Essa suposição é baseada nos estudos publicado por Huang *et al.* (2002) e Lou *et al.* (2005), que descrevem peptídeos endógenos em SVMP de classe P-I. Esses trabalhos relatam peptídeos que se localizam na mesma posição da densidade eletrônica desconhecida (próximo ao íon zinco) e com o deslocamento da molécula de água catalítica para fora do espaço entre o resíduo Glu₁₄₃ e o íon zinco. Os inibidores endógenos descritos em venenos de serpentes, até o momento, apresentam caráter protéico e são compostos por, no mínimo, três resíduos de aminoácidos. A densidade

eletrônica desconhecida não comporta um tripeptídeo como era de se esperar, mas sim uma molécula menor, como dipeptídeo.

Várias combinações de pares de resíduos de aminoácidos foram testadas, mas poucas apresentavam tamanho compatível com a densidade eletrônica. Apenas um par se mostrou congruente com a densidade eletrônica, o par GS (figura 16).

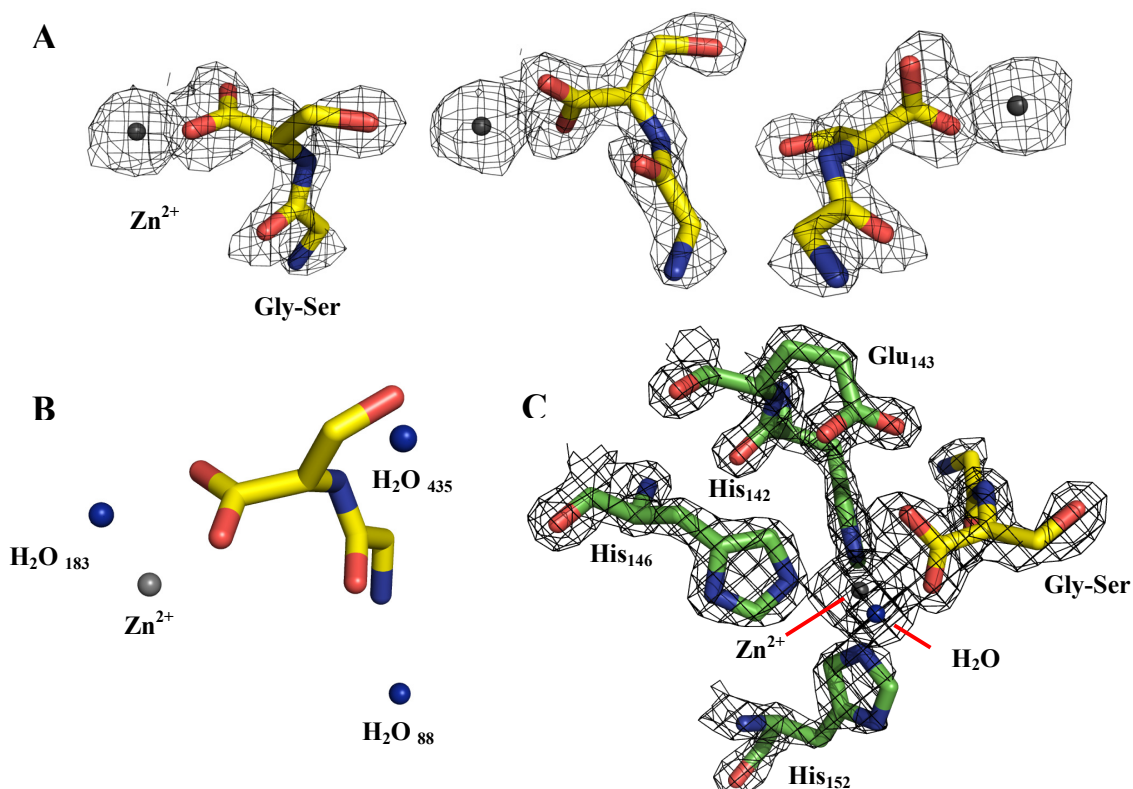


Figura 16 - Interpretação da densidade eletrônica desconhecida presente no sítio catalítico do modelo da enzima em complexo. **(A)** Diferentes ângulos do dipeptídeo GS (em amarelo) ajustado à densidade eletrônica. O íon zinco foi mantido para facilitar a localização. **(B)** Dipeptídeo GS e moléculas de água associadas a ele. **(C)** Representação do sítio catalítico juntamente com o ligante dipeptídico. Os números dos resíduos e das moléculas de água são referentes ao modelo da enzima em complexo. O contorno do mapa de densidade eletrônica ($2F_o - F_c, \varphi_c$) foi ajustado a 1σ .

4.7 - Testes de inibição da leucurolisina-a com o peptídeo Gly-Ser.

Para evitar possíveis interferências de ligantes endógenos presentes na enzima purificada, os testes foram realizados utilizando-se uma alíquota dialisada da leuc-a, como descrito nos Materiais e Métodos. Após a diálise, um teste de comparação da atividade proteolítica sobre a DMC, entre a alíquota dialisada e uma não dialisada, foi feito. A leuc-a dialisada apresentou atividade semelhante à alíquota não dialisada (dados não mostrados). Esse resultado pode sugerir uma perda de grande parte, mas não necessariamente total, desse inibidor no processo de purificação / cristalização. O dipeptídeo pode estar associado à enzima na glândula de veneno como um inibidor de baixa afinidade e, em determinadas condições como a mudança de pH, diluição ou alterações fisioquímicas, esse peptídeo se desligaria da enzima e esta passa a exercer sua atividade (Wagstaff *et al.*, 2008). Esse resultado difere dos resultados de Lou e colaboradores (2005) que mostraram que a enzima FII apresenta uma atividade três vezes maior quando a enzima dialisada é comparada a enzima não dialisada. Isso sugere que o tripeptídeo KNL, presente no sítio ativo da enzima FII, possa ter uma maior afinidade, permanecendo ligado durante os processos de purificação / cristalização.

Para testarmos se a densidade eletrônica desconhecida pertence a um novo inibidor endógeno da glândula de veneno, o dipeptídeo Gly-Ser (massa molecular de 162,1 Da) foi sintetizado como descrito nos Materiais e Métodos. Devido a pouca quantidade de amostra obtida na síntese desse peptídeo, foi possível realizar apenas um ensaio de inibição da hidrólise do substrato DCM 0,2% em pH 7,4, usando 4µg ($0,12 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) de leuc-a. O resultado desse ensaio está representado no gráfico 3. A atividade proteolítica apresenta uma curva dose-resposta, com um IC_{50} (concentração inibitória de 50% da atividade) calculado de 14,4 µg (equivalente a $65 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$). O resultado obtido com a hidrólise da DMC mostra que a densidade eletrônica desconhecida, de fato, pertence a um inibidor endógeno.

Wagstaff e colaboradores (2008) testaram a capacidade de dois peptídeos inibidores endógenos (*Ath.sq pHpG-1* - de sequência EDDHHHHHHHHHGVGGGGGGGGG - e pEKW - onde pE representa um piroglutâmico), identificados no veneno da serpente *Echis*

ocellatus, em inibir a atividade da metaloprotease EoVMP-2 presente nesse veneno.

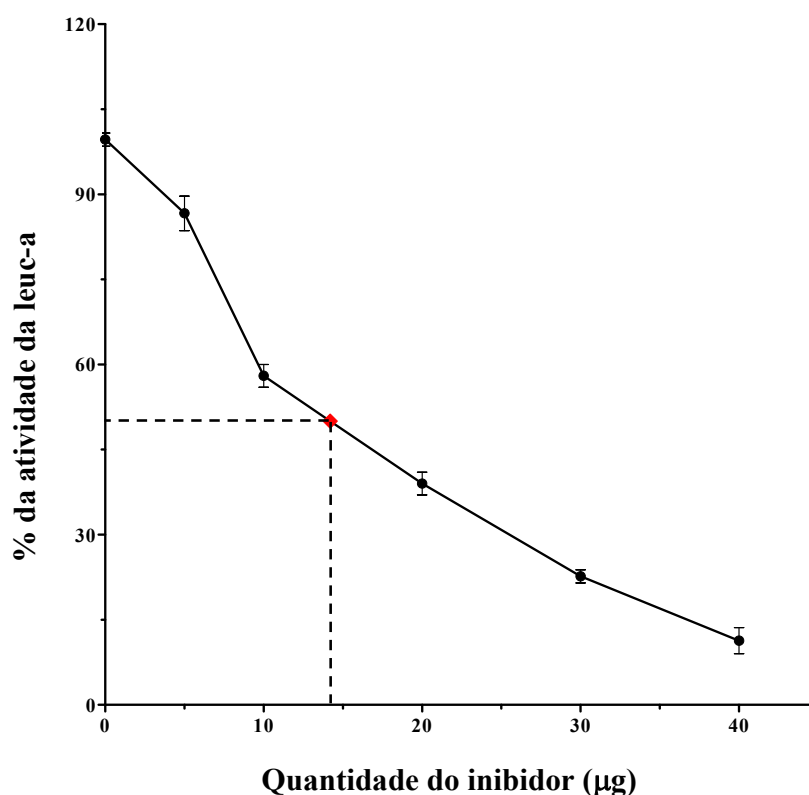
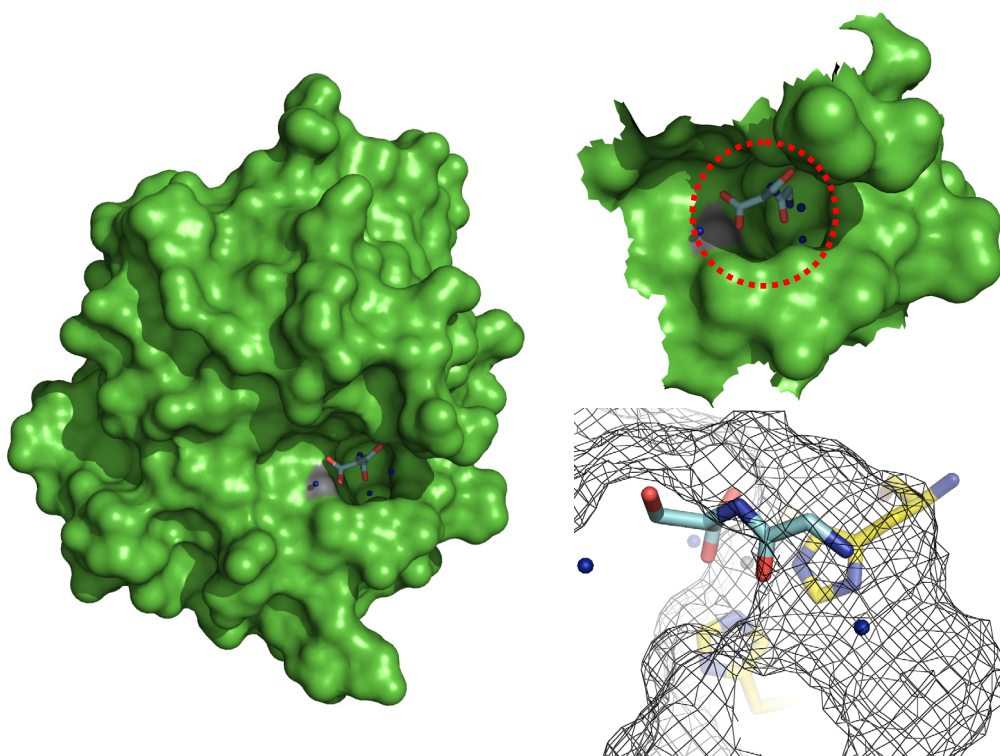


Gráfico 3 - Ensaio de inibição da atividade proteolítica da metaloprotease leuc-a sobre o substrato DMC 0,2 % em pH 7,4. A marca vermelha no gráfico corresponde ao IC₅₀, com valor calculado em quantidade (µg) e concentração (µmol · L⁻¹) de inibidor em 14,4 e 76, respectivamente. Os valores das concentrações correspondentes às quantidades de inibidor em µg são, respectivamente, 23, 45, 91, 136 e 181 µmol · L⁻¹. Os valores estão expressos como média da porcentagem da enzima sem inibidor contra a DMC (tomada como 100 %). Cada ponto foi representado como a média de triplicatas ± desvio padrão. Para cada ponto no gráfico foi feito um branco.

O primeiro inibidor foi testado quanto à capacidade de inibir a atividade hemorrágica e apresentou um IC₅₀ em torno de 50 µg. O tripeptídeo pEKW foi testado em um ensaio de inibição da proteólise da β-caseína pela EoVMP-2. Nesse ensaio o inibidor e a enzima foram incubados em diferentes intervalos de tempo, por um período de 24 horas em pH 6,5. O resultado mostra que o inibidor é capaz de inibir parcialmente a atividade e, depois de 24 horas, esse inibidor não foi capaz de continuar inibindo a hidrólise da β-caseína.

4.8 - Possíveis interações entre o peptídeo Gly-Ser e o ambiente do sítio catalítico da metaloprotease leucurolisina-a.

A figura 17 mostra a localização do dipeptídeo GS na superfície da leuc-a.



O dipeptídeo inibidor GS localiza-se dentro do sítio catalítico ocupando apenas a posição *S1* (figura 17B). O resíduo de glicina aparece no vestíbulo do bolso hidrofóbico *S'* com a presença de duas moléculas de água. Essas moléculas fazem ligações de hidrogênio com o N-terminal da glicina (H_2O_{88}) e com a cadeia lateral da serina (H_2O_{435}) (figura 17C). A molécula H_2O_{88} se localiza dentro do bolso hidrofóbico. Essa molécula de água, associada ao inibidor (figura 16B), é

aparentemente necessária para que este consiga se estabilizar dentro do sítio catalítico.

Na enzima TM-3, o sítio *SI* é ocupado por um resíduo de triptofano e sua cadeia lateral ocupa o bolso hidrofóbico *S'*. Na enzima F2, um resíduo de leucina ocupa a posição *SI*, permanecendo no vestíbulo do bolso hidrofóbico sem ocupá-lo (figura 18D). Se compararmos a forma dos bolsos hidrofóbicos, entre a leuc-a, TM-3 e F2, podemos perceber que eles não são idênticos. Uma mudança em sua forma pode ocorrer a fim de acomodar um resíduo diferente de um substrato.

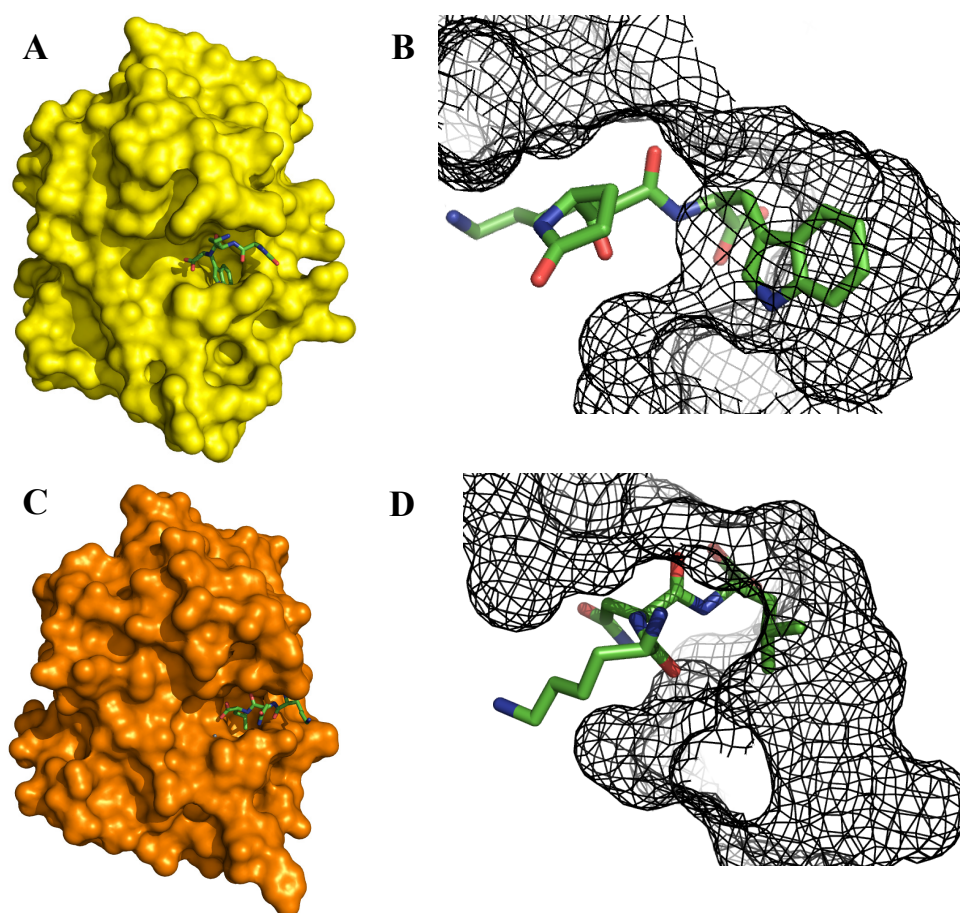


Figura 18 - Superfície molecular das enzimas TM-3 e F2 com seus inibidores endógenos. **(A)** superfície da enzima TM-3 (código PDB 1KUK - Huang *et al.* 2002) com o tripeptídeo pEKW. **(B)** cadeia lateral do resíduo triptofano dentro do bolso hidrofóbico da TM-3. **(C)** superfície da enzima F2 (código PDB 1YP1 - Lou *et al.* 2005) com o tripeptídeo KNL. **(D)** cadeia lateral da leucina ocupando a entrada do bolso hidrofóbico da F2.

No caso de um inibidor, o impedimento estérico do bolso hidrofóbico seria fundamental para evitar que componentes do veneno entrem no sítio catalítico e sejam clivados.

A figura 19 mostra as possíveis interações intermoleculares entre o dipeptídeo GS e o sítio catalítico da leuc-a.

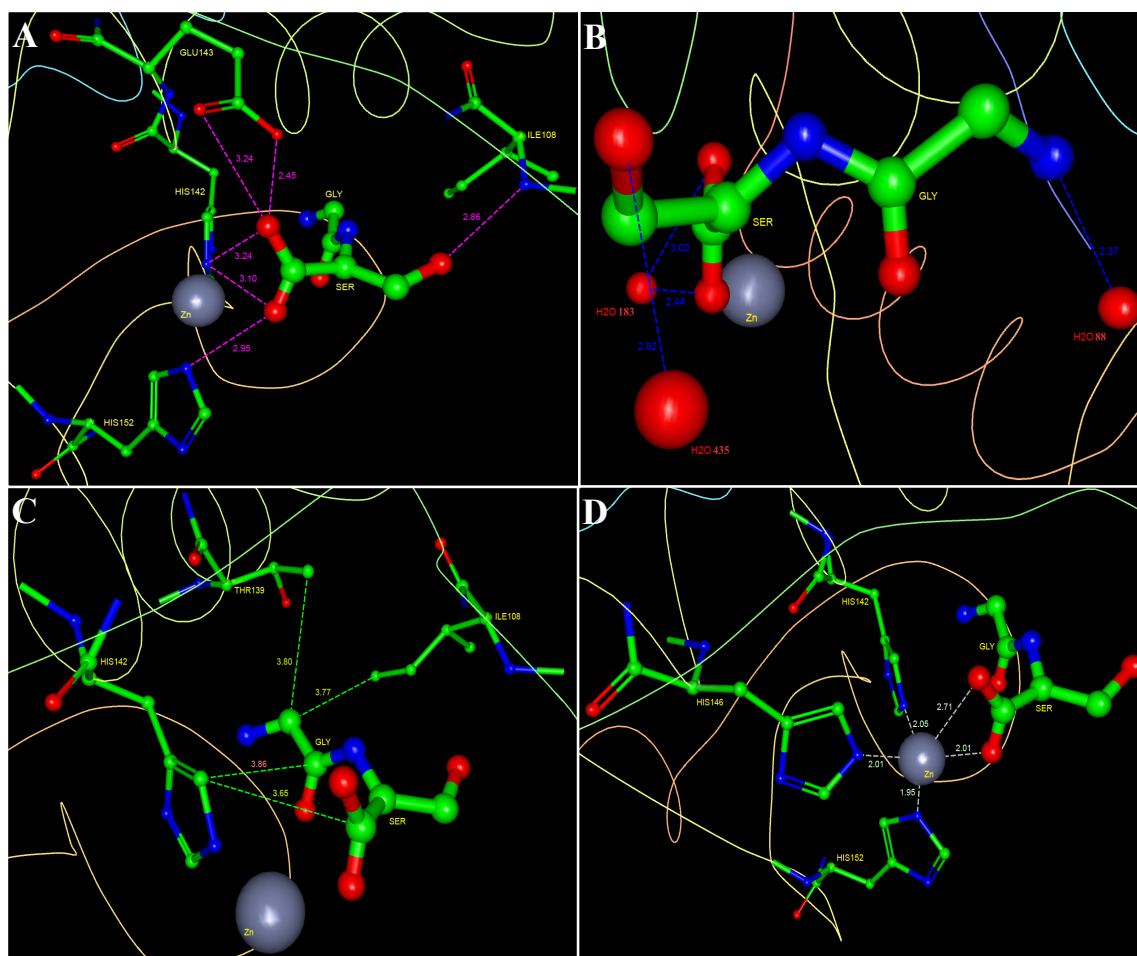


Figura 19 - Possíveis interações do dipeptídeo GS com o sítio catalítico da leuc-a. **(A)** ligações de hidrogênio entre o peptídeo e o sítio catalítico (linhas pontilhadas cor magenta). A esfera cinza representa o íon zinco; **(B)** ligações de hidrogênio mediadas por moléculas de água (linhas pontilhadas cor azul). As esferas vermelhas representam moléculas de água; **(C)** interações entre átomos não polares (linhas pontilhadas cor verde); **(D)** interações com o íon metálico (linhas pontilhadas cor cinza).

As possíveis interações identificadas foram: ligações de hidrogênio entre os átomos O e OXT, do C-terminal do resíduo de serina do inibidor, e os Ne2 dos anéis imidazólicos dos resíduos H₁₄₂ e H₁₅₂; o O γ da cadeia lateral da serina do inibidor com o N do resíduo de I₁₀₈; o átomo OXT, do resíduo de serina do inibidor, e os átomos O ϵ 1 e O ϵ 2 do resíduo E₁₄₃. (figura 19A); interações entre os átomos O e OXT do C-terminal do resíduo de serina do inibidor e o íon Zn²⁺ (figura 19D). Poucas interações entre átomos não polares foram identificadas entre o dipeptídeo GS e resíduos de aminoácidos do sítio catalítico.

Na figura 20, podemos ver as possíveis interações intermoleculares entre tripeptídeo pEKW e o sítio catalítico da enzima TM-3.

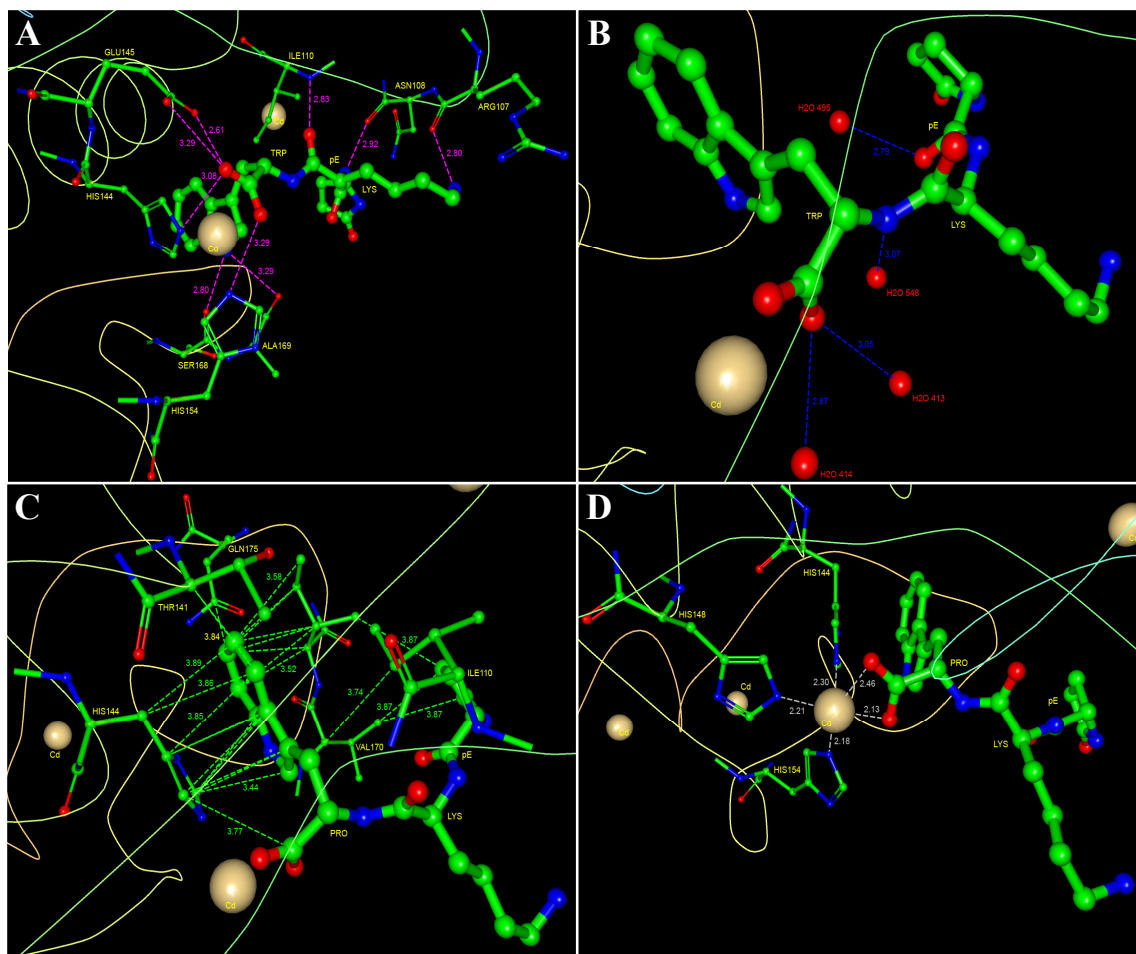


Figura 20 - Possíveis interações entre o tripeptídeo *pEKW* e o ambiente do sítio catalítico da enzima TM-3 (código PDB 1KUK - Huang *et al.* 2002). As possíveis interações entre o tripeptídeo e o sítio catalítico da TM-3 estão representadas em **(A)** ligações de hidrogênio (linhas pontilhadas cor magenta), **(B)** ligações de hidrogênio mediadas por moléculas de água (linhas pontilhadas cor azul), **(C)** interações entre átomos não polares (linhas pontilhadas cor verde) e **(D)** interações com o íon metálico (linhas pontilhadas cor cinza).

Pode-se observar que esse peptídeo é capaz de realizar várias ligações de hidrogênio ao longo de toda fenda do sítio catalítico (figura 20A) e muitas interações hidrofóbicas entre a cadeia lateral do resíduo triptofano e o anel imidazólico do resíduo de H₁₄₄ (figura 20C). Nessa última interação, as duas cadeias laterais assumem uma conformação em “*stack*” o que pode conferir uma grande estabilidade do inibidor no sítio catalítico. Outra interação importante ocorre entre o íon metálico e a extremidade C-terminal do resíduo triptofano (figura 20D). Pode-se

observar que apenas duas moléculas de água estão interagindo com o inibidor dentro do sítio catalítico. Huang e colaboradores (2002) realizam testes de cinética enzimática com três tripeptídeos endógenos (pEKW, pENW e pEQW) purificados do veneno da serpente *Trimeresurus mucrosquamatus* e construções peptídicas sintéticas. As construções sintéticas substituíam o resíduo de triptofano (C-terminal) por outro resíduo hidrofóbico, como por exemplo, um resíduo de fenilalanina ou leucina. O melhor resultado obtido foi com o peptídeo pEKW, nativo do veneno. Huang e colaboradores (2002), concluíram que a cadeia lateral do resíduo de triptofano, ocupando a posição *SI*, seria o resíduo “selecionado pela natureza” devido a sua capacidade de ocupar o bolso hidrofóbico *S'*. Essa alta especificidade apresentada pelo triptofano se deve ao “stacking” formado com a cadeia lateral do resíduo H₁₄₄ e a ligação de hidrogênio entre o átomo N ϵ 1, do anel indol, com o átomo de oxigênio da carbonila do resíduo S₁₆₇ (Huang *et al.*, 2002).

A figura 21 mostra as interações entre o tripeptídeo KNL e o sítio catalítico da enzima F2. Várias ligações de hidrogênio ocorrem entre o inibidor e o sítio catalítico (figura 21A) e uma interação similar entre a extremidade C-terminal, do inibidor, e o íon metálico (figura 21D). Várias interações entre os resíduos do sítio catalítico e o resíduo de leucina do inibidor, assim como ocorre com o triptofano no complexo TM-3-pE(K/N/Q)W, apontam para uma preferência por resíduos hidrofóbicos na posição *SI*. Três moléculas de água estão interagindo com esse inibidor (figura 21B), mas nenhuma delas está presente dentro do sítio catalítico.

Uma similaridade pôde ser observada entre os três inibidores: a interação do átomo OXT, da extremidade C-terminal dos inibidores, com a cadeia lateral do resíduo E₁₄₃ (figuras 19A, 20A e 21A). Essas interações podem explicar a expulsão da molécula de água catalítica, que no modelo da leuc-a livre, fica entre o átomo de Zn²⁺ e a cadeia lateral do resíduo E₁₄₃. Essa observação poderia significar um segundo mecanismo de inibição dessas enzimas na glândula de veneno, já que, a presença da molécula de água catalítica é fundamental para que a catálise ocorra.

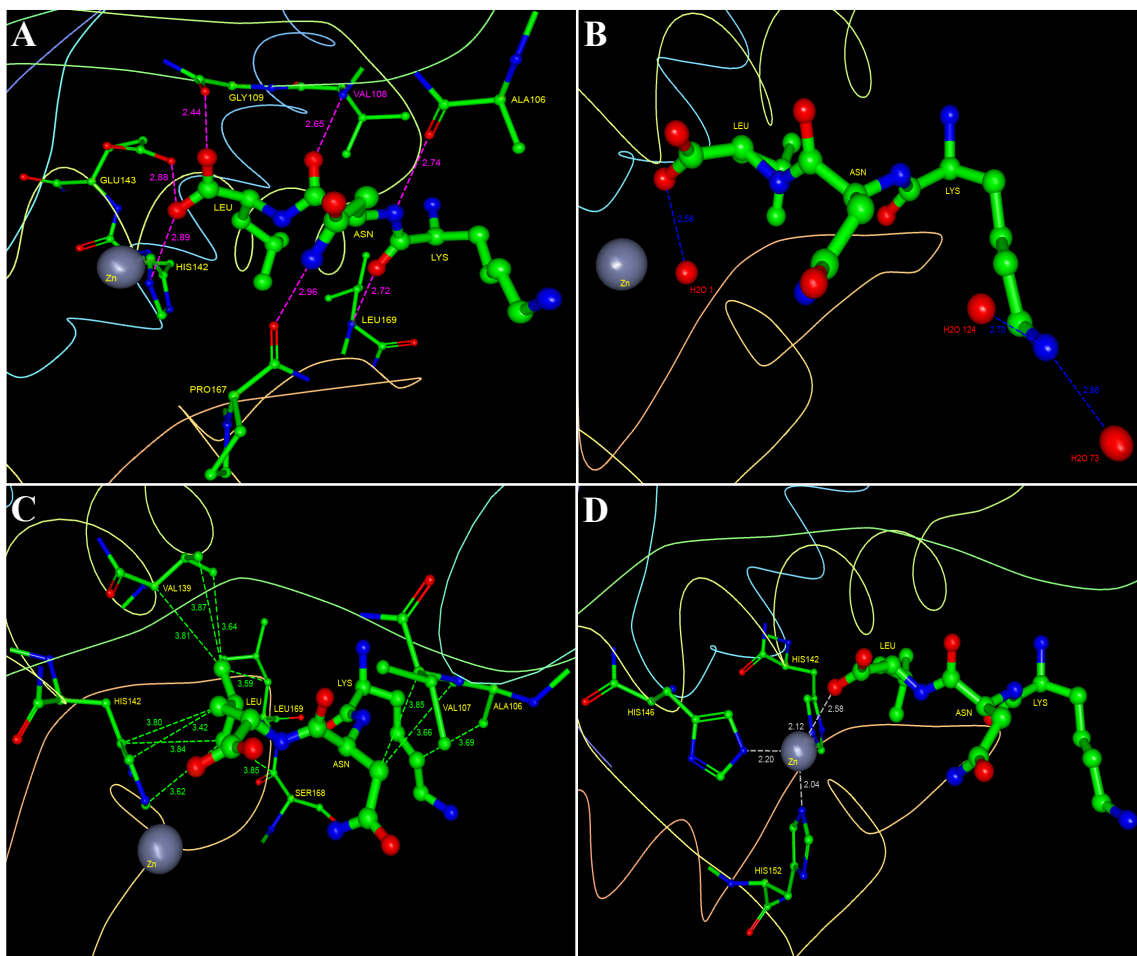


Figura 21 - Possíveis interações entre o tripeptídeo KNL e o ambiente do sítio catalítico da enzima F2 (código PDB 1YP1 - Lou *et al.* 2005). As possíveis interações entre o tripeptídeo e o sítio catalítico da F2 estão representadas em **(A)** ligações de hidrogênio (linhas pontilhadas cor magenta), **(B)** ligações de hidrogênio mediadas por moléculas de água (linhas pontilhadas cor azul), **(C)** interações entre átomos não polares (linhas pontilhadas cor verde) e **(D)** interações com o íon metálico (linhas pontilhadas cor cinza).

Os resultados apresentados nesse, e em outros trabalhos (Lou *et al.*, 2005; Wagstaff *et al.*, 2008), mostram que não somente o triptofano, na posição *S1*, seria eficiente em inibir a atividade das SVMs. Na realidade, outros resíduos poderiam desempenhar o papel de bloqueador do sítio *S1* e, assim, servirem como inibidores. Testes de cinética enzimática e obtenção de novos cristais, da leuc-a com diferentes inibidores peptídicos, serão realizados a fim de verificar essa hipótese.

4.9 - A interação entre inibidor e íon metálico seria importante para a inibição da atividade da leuc-a?

A interação dos átomos O e OXT, da região C-terminal do inibidor protéico que ocupa a posição *S1*, com o íon metálico aparenta ser importante para a ligação do inibidor com o sítio catalítico. Para testarmos essa hipótese, uma variante do dipeptídeo GS foi construída. Esse novo dipeptídeo apresenta uma amidação no C-terminal (GS-NH₂). Essa amidação trocaria um átomo de oxigênio, no C-terminal, por um átomo de nitrogênio. Um teste de atividade proteolítica sobre a DMC (0,2% pH 7,4) foi realizado como descrito nos Materiais e Métodos. O resultado desse teste pode ser visto no gráfico 4.

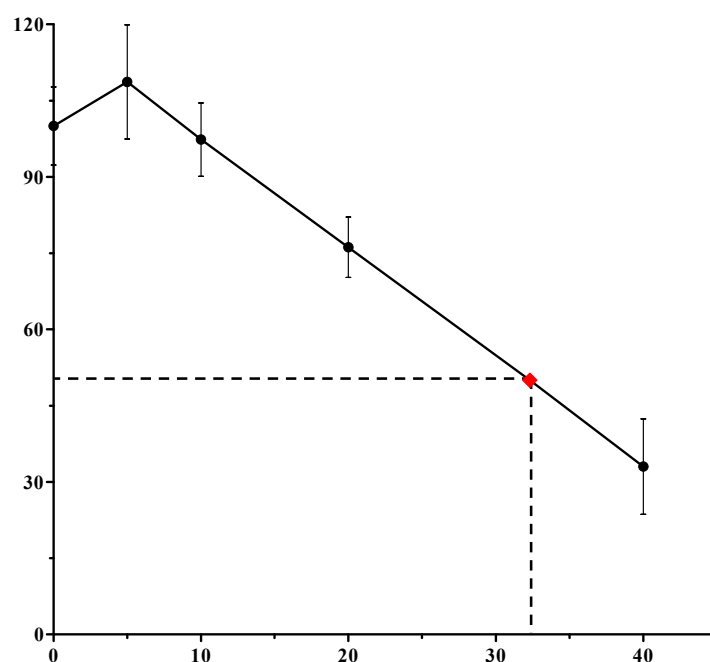


Gráfico 4 - Ensaio de inibição da atividade proteolítica da leuc-a sobre o substrato DMC 0,2 % em pH 7,4 usando o peptídeo GS-NH₂. A marca vermelha no gráfico corresponde ao IC₅₀, com valor calculado em quantidade (µg) e concentração (µmol · L⁻¹) de inibidor em 32,2 e 147, respectivamente. Os valores das concentrações correspondentes às quantidades de inibidor em µg são, respectivamente, 23, 45, 91, 136 e 181 µmol · L⁻¹. Os valores estão expressos como média da porcentagem da enzima sem inibidor contra a DMC (tomada como 100%). Cada ponto foi representado como a média de triplicatas de três experimentos ± desvio padrão. Para cada ponto no gráfico foi feito um branco.

O inibidor GS-NH₂ também foi capaz de inibir a atividade proteolítica da leuc-a, porém, uma maior quantidade de inibidor teve de ser utilizada. O gráfico 4 apresenta uma curva dose-resposta, com um IC₅₀ calculado de 32,3 µg (equivalente a 147 µmol · L⁻¹). Um fato nos chamou a atenção durante a análise do experimento: a adição de 5 µg (23 µmol · L⁻¹) provocou um aumento de cerca de 10 % na atividade da leuc-a. Esse fato não foi considerado como erro experimental, já que, três experimentos diferentes apresentaram o mesmo resultado. Concentrações menores (dados não mostrados), ou maiores, não provocam o aumento da atividade observado. Maiores estudos serão conduzidos a fim de tentar entender esse fenômeno.

O gráfico 5 mostra a comparação das curvas de inibição da leuc-a, usando os peptídeos GS e GS-NH₂. Pode-se observar que o peptídeo GS possui uma capacidade de inibição maior do que o peptídeo GS-NH₂. Isso pode ser um indício de que a interação eletrostática dos átomos O e OXT, da região C-terminal do peptídeo inibidor, também seria importante para o processo de inibição.

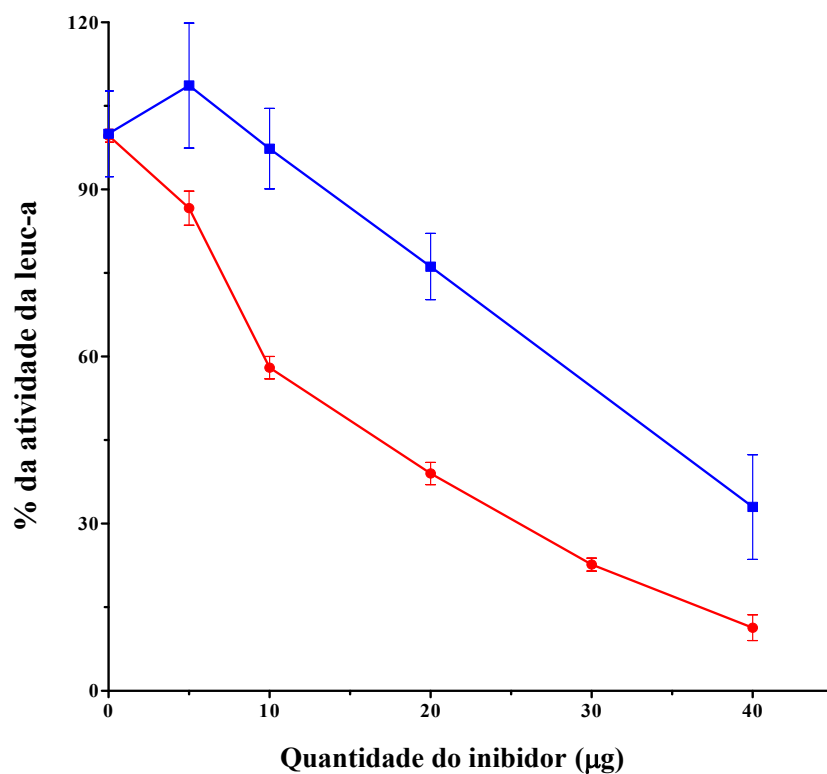


Gráfico 5 - Comparação entre as curvas de inibição da atividade proteolítica da leuc-a sobre a DMC, utilizando os peptídeos GS e GS-NH₂. A curva em azul representa o teste com o peptídeo GS-NH₂. A curva em vermelho representa o teste com o peptídeo GS.

Outro ensaio, de inibição da atividade proteolítica da leuc-a sobre o fibrinogênio humano foi feito, utilizando o peptídeo GS-NH₂, como descrito nos Materiais e Métodos. O resultado desse ensaio pode ser visto na figura 22.

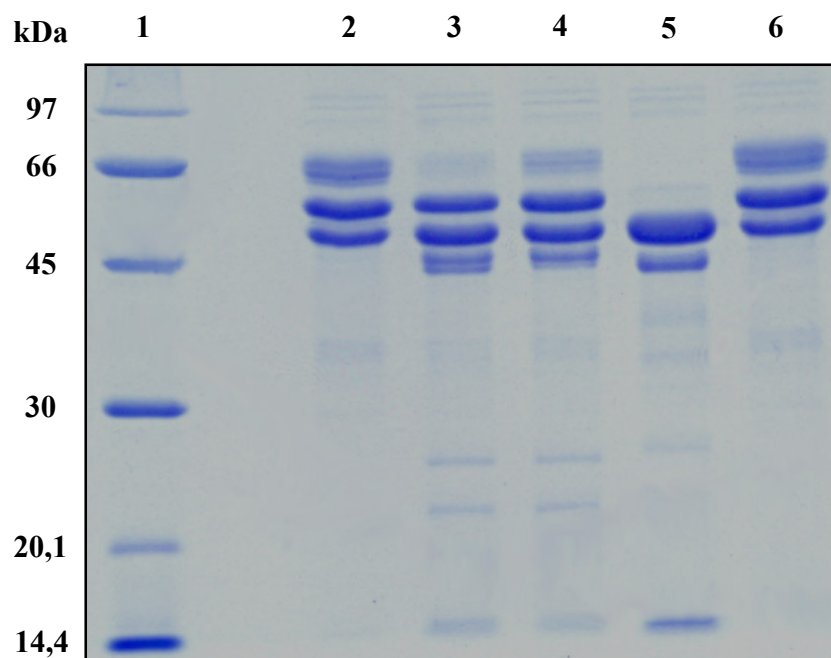


Figura 22 - Ensaio de inibição da atividade proteolítica da leuc-a sobre o fibrinogênio humano usando o peptídeo GS- NH₂. Canais: **(1)** padrão de massa molecular. **(2)** fibrinogênio humano (Fb) + leuc-a + EDTA. **(3)** Fb + leuc-a + 40 µg (181 µmol · L⁻¹) peptídeo GS- NH₂. **(4)** Fb + leuc-a + 80 µg (364 µmol · L⁻¹) peptídeo GS- NH₂. **(5)** Fb + leuc-a. **(6)** Fb.

A leuc-a apresenta uma atividade proteolítica preferencialmente sobre a cadeia A α do fibrinogênio (figura 22 - canal 5) Mesmo após um longo tempo de incubação, as cadeia B β e γ do fibrinogênio humano não são digeridas (Bello *et al.*, 2006). A inibição completa da atividade proteolítica da leuc-a foi obtida apenas com a adição de EDTA (figura 22 - canal 2). Comparado ao controle de fibrinogênio humano (figura 22 - canal 6), pode-se observar que a cadeia A α não sofreu proteólise. Nos canais 3 e 4, observa-se uma inibição dose-dependente da atividade proteolítica, com o canal 4 apresentando uma maior proteção da cadeia A α . Esse resultado mostra que mesmo alterando uma pequena região do inibidor, a capacidade de inibir a atividade da leuc-a permanece.

Os resultados de inibição, obtidos a partir de uma modificação de um peptídeo inibidor natural, abre caminho para o desenvolvimento racional de novos

inibidores para metaloproteases que possuem um sítio catalítico similar ao das SVMPS. Esse trabalho relata o primeiro inibidor dipeptídico de metaloproteases presentes no veneno de serpentes. Os inibidores sintéticos, derivados do hidroxamato ou peptidomiméticos, como o Batimastat ou SCH, possuem uma estrutura grande e, provavelmente, uma síntese complexa se comparados ao peptídeo GS. Novos estudos cristalográficos, ensaios com outros substratos e em diferentes faixas de pH, envolvendo essa e outras variantes do peptídeo GS, serão desenvolvidos no futuro com o objetivo de produzir um inibidor potente que possa ser utilizado no tratamento de vítimas de acidentes ofídicos e de outras patologias provocadas por metaloproteases.

4.10 - Determinantes estruturais para o efeito hemorrágico/não-hemorrágico: um problema inquietante e de difícil resolução.

O estudo de estruturas cristalográficas pode nos ajudar a entender a função de uma proteína e, no caso de enzimas, entender seu funcionamento e formas de inibição. Em particular, o estudo de estruturas de SVMP de classe P-I é muito intrigante. Essas moléculas apresentam um alto grau de identidade de sequência primária e, entre as estruturas descritas na literatura, um baixo RMSD.

As próximas subseções discutem os resultados de alguns trabalhos que tentam explicar o efeito hemorrágico/não-hemorrágico das SVMP de classe P-I. Os resultados dessa tese serão utilizados em comparação com os dados da Literatura, na tentativa de propor algumas soluções para o problema do efeito hemorrágico/não-hemorrágico.

4.11 - A análise de estruturas primárias de SVMP de classe P-I poderia elucidar o problema?

Uma grande coleção de estruturas primárias de SVMP de classe P-I, de várias

espécies de serpentes, está disponível em bancos de dados. Em alinhamentos, observa-se que enzimas que apresentam atividade hemorrágica possuem alta identidade com enzimas que não apresentam essa atividade. Nas SVMs de classe P-I, comparações entre estruturas primárias a procura de “*resíduos-chave*”, são as tentativas mais utilizadas, e as mais óbvias, de tentar explicar as divergências farmacológicas observadas. A figura 6 mostra o alinhamento da leuc-a e outras 13 enzimas de classe P-I. A tentativa de localizar nessas seqüências algum padrão ou resíduos comuns, somente a enzimas hemorrágicas ou a não-hemorrágicas, não foi bem sucedida. Outras tentativas, usando essa abordagem, já foram relatadas na Literatura.

Gasmi e colaboradores (2000), após a análise de algumas seqüências, sugeriram que os resíduos Asp/Glu₁₈₃ e Asn₁₉₂ eram compartilhados pelas enzimas não-hemorrágicas e foram substituídos pelos resíduos Tyr₁₈₃ e Lys₁₉₂ nas enzimas hemorrágicas. Esses resíduos, expostos ao solvente na superfície da molécula (hélice E, próximo à porção C-terminal), poderiam estar envolvidos nos diferentes modos de ação dessas enzimas. A mesma comparação, com a mesma região, foi feita com as seqüências usadas nesse trabalho (figura 23).

Nenhuma correlação substancial entre aminoácidos, ou “*resíduos-chave*”, que possam explicar o efeito hemorrágico/não-hemorrágico pôde ser observada. Uma observação feita no trabalho de Gasmi e colaboradores (2000) é que eles alinharam as enzimas adamalisina-II e mutalisina-II juntamente com as enzimas hemorrágicas. A ausência da atividade hemorrágica na adamalisina-II e na mutalisina-II é um fato conhecido e disponível na Literatura. O uso dessas seqüências agrupadas como enzimas hemorrágicas não foi explicado em seu trabalho. Essa observação mostra um erro no conjunto de dados usados para análise e, portanto, um resultado que parece não condizer com a realidade.

		180		190		200
A	V1F	S D C	S K D	E Y Q R Y L T N H	N P Q	C I L N Q P
	Fibrolase	S D C	S K K	D Y Q T F L T V N	N P Q	C I L N K P
	H2-proteinase	S D C	S K N	D Y Q T F L T K Y	N P Q	C I L N A -
	Ht-d	S D D S M H	Y Y E R F L K Q Y	K P Q	C I L N K P	
	Ht-2	S D A S M R	Y Y Q K F L D Q Y	K P Q	C I L N K P	
	HR2a	S D C	S K D	Y Y Q T F L T N S	K P Q	C I I N A P
	Adamalisina-II	S D D S M G	Y Y Q K F L N Q Y	K P Q	C I L N K P	
	Mutalisina-II	S D C	S K D	Y Y Q M F L T K R	K P Q	C I L N K P
B	Leucurolisina-a	S D C	S Q N	Q Y Q T Y L T K H	N P Q	C I L N K P
	Adamalisina-II	S D D S M G	Y Y Q K F L N Q Y	K P Q	C I L N K P	
	Atroxase	S D D S M G	Y Y Q S F L K Q Y	N P Q	- - - - -	
	Mutalisina-II	S D C	S K D	Y Y Q M F L T K R	K P Q	C I L N K P
	H2-proteinase	S D C	S K N	D Y Q T F L T K Y	N P Q	C I L N A -
	Fibrolase	S D C	S K K	D Y Q T F L T V N	N P Q	C I L N K P
	Bothrostatina	S D C	S Y I	Q C W D F I M K D	N P Q	C I L N K Q
	F2	S N C	S L I	L Y E D F L S N E	E P D	C I D N A -
	BaP1	S D C	S Q N	Q Y E T Y L T N H	N P Q	C I L N K P
	Lebetase	S D C	S K N	K Y Q T Y L T N R	N P Q	C I L N Q P
	Acutolisina-C	S D C	S K H	D Y Q S F L T I H	K P Q	C L L N - -
	TM-3	S D C	S K D	Y Y Q T F L T N D	N P Q	C I L N A P
	Atrolisina-C	S D D	S M H	Y Y E R F L K Q Y	K P Q	C I L N K P
	Acutolisina-A	S D C	S Y I	Q C R D Y I S K E	N P P	C I L N - -

Figura 23 - Comparação entre os resultados obtidos por Gasmi e colaboradores (2000) e os resultados desse trabalho. **(A)** Sequências alinhadas por Gasmi. As sequências com marcações em verde são de proteínas não-hemorrágicas, as sequências com marcação em amarelo são de proteínas hemorrágicas. Numeração usada refere-se à sequência da V1F. **(B)** Sequências alinhadas nesse trabalho. As marcações em roxo mostram as posições 183 e 192. Os espaços entre as sequências separam as proteínas não-hemorrágicas, fracamente e altamente hemorrágicas. Numeração usada refere-se à sequência da leuc-a.

Em outro artigo, Tsai e colaboradores (2000) analisaram 30 sequências de SVMMP de classe P-I que exibiam atividade hemorrágica forte, fraca ou nenhuma. Baseando-se em construções de árvores filogenéticas, usando toda sequência dessas proteínas, uma clara separação entre enzimas com forte, fraca e nenhuma atividade hemorrágica, pôde ser observada. Além dessa separação, uma nova divisão das enzimas de classe P-I é sugerida: o subtipo AH, enzimas com forte atividade hemorrágica e de caráter ácido - ponto isoelétrico (pI) entre 4 e 5; o subtipo BH, enzimas com atividade hemorrágica moderada ou fraca e de caráter básico - pI entre

7 e 10; e o subtipo F, enzimas com forte atividade proteolítica e baixa atividade hemorrágica. Algumas fibrinogenases não-hemorrágicas bem conhecidas foram agrupadas juntamente com o subgrupo BH, enquanto algumas enzimas com forte atividade hemorrágica também foram colocadas nesse subgrupo (Ramos e Selistre-De-Araujo, 2004).

A tabela 9 apresenta algumas características bioquímicas das enzimas hemorrágicas e não-hemorrágicas usadas nesse trabalho. Não foi possível visualizar a mesma diferenciação entre proteínas hemorrágicas e não-hemorrágicas, baseado-se apenas nos valores de pI. A enzima F2 e adamalisina-II, por exemplo, possuem pI igual a 4,58 e 9,06. Ambas são proteínas não-hemorrágicas e não se encaixam na classificação sugerida por Tsai.

Ramos e Selistre-de-Araújo (2004), usando ferramentas de bioinformática, compararam várias seqüências de resíduos de aminoácidos de sítios catalíticos de enzimas de classe P-I, com o objetivo de encontrar alguns motivos estruturais, ou elementos, que os ajudasse a compreender o efeito hemorrágico/não-hemorrágico.

Esse estudo também não foi capaz de identificar determinantes estruturais relevantes que possam ser responsáveis pela diferença no efeito farmacológico das enzimas de classe P-I.

As tentativas de encontrar determinantes, regiões ou “*resíduos-chave*” através de análises de estruturas primárias não se mostraram muito produtivas devido a um fator principal: a alta identidade das seqüências das proteínas de classe P-I. Os membros da classe P-I apresentam não só um alto grau de identidade na seqüência primária, mas também de estrutura secundária, com algumas diferenças no tamanho de algumas hélices, fitas ou alças. A alta identidade das estruturas secundárias, nessas enzimas, indica que pequenas inserções, mutações e deleções de alguns aminoácidos podem modificar a função, ou especificidade, sem alterar a conformação dessas estruturas (Overall, 2001).

A grande coleção de estruturas primárias, depositadas em bancos de dados, não se mostra suficiente para explicar as bases estruturais da diferença do efeito hemorrágico/não-hemorrágico observado nas SVMP de classe P-I (Fox e Serrano, 2005). Devido à alta identidade, as abordagens que levam em conta somente

seqüências de aminoácidos para explicar a presença ou ausência do efeito hemorrágico são inconclusivas. Outro fator importante é que a análise de seqüências de aminoácidos não nos dá idéia de quais resíduos estão na superfície da molécula e disponíveis para uma possível interação com outras moléculas. Devido à alta identidade das seqüências e a incapacidade de visualizar os resíduos na molécula, a comparação entre modelos cristalográficos pode ser uma abordagem que pode nos ajudar a encontrar pistas que solucionem o problema.

Tabela 9 - Comparação de alguns parâmetros bioquímicos entre as SVMP de classe P-I usadas nesse trabalho.

<i>SVMP de classe P-I com com estrutura resolvida</i>	<i>pI teórico</i>	<i>Resíduos carregados</i>			<i>Números de cavidades presentes na estrutura #</i>	<i>GRAVY* GRAVY*</i>	<i>Atividade hemorrágica</i>
		<i>(Lys + Arg)</i>	<i>(Asp + Glu)</i>	<i>Total</i>			
<i>Leucurolisina-a</i>	6,37	21	24	45	4	- 0,336	Ausente
<i>Adamalisina-II</i>	9,06	24	19	43	6	- 0,263	Ausente
<i>Atroxase</i>	7,24	22	22	44	-	- 0,416	Ausente
<i>Mutalisina-II</i>	6,31	17	20	37	-	- 0,223	Ausente
<i>H2-proteinase</i>	8,42	23	20	43	2	- 0,390	Ausente
<i>Fibrolase</i>	6,36	16	19	35	-	- 0,312	Ausente
<i>Bothrostatina</i>	6,05	20	24	44	-	- 0,318	Ausente
<i>F2</i>	4,58	13	22	35	2	0,368	Ausente
<i>BaP1</i>	7,34	21	21	42	5	- 0,380	Presente
<i>Lebetase</i>	5,33	14	23	37	-	-0,218	Presente
<i>Acutolisina-C</i>	8,37	14	12	26	1	0,028	Presente
<i>TM-3</i>	8,16	26	24	50	4	- 0,379	Presente
<i>Atrolisina-C</i>	5,54	19	27	46	2	- 0,364	Presente
<i>Acutolisina-A</i>	5,28	17	25	42	3	- 0,127	Presente

#Cavidades calcula pelo software *surface racer* para os modelos cristalográficos de SVMP de classe P-I: leucurolisina-a; adamalisina-II (código PDB 1IAG); H2 (código PDB 1WN1); F2 (código PDB 1YP1); Bap1 (código PDB 1ND1); acutolisina-C (código PDB 1QUA); TM-3 (código PDB 1KUF); atrolisina-C (código PDB 1ATL); acutolisina-A (código PDB 1BSW). *GRAVY: *Grand average of hydropathicity index* indica a solubilidade da proteína: valores positivos de GRAVY indicam hidrofobicidade; valores negativos de indicam hidrofiliidade.

4.12 - Comparações entre estruturas terciárias de SVMP de classe P-I: Seria esta uma abordagem mais apropriada para resolver o problema?

Atualmente, somente oito modelos cristalográficos de SVMP de classe P-I foram resolvidos: adamalisina-II, do veneno da *Crotalus adamanteus* (PDB 1IAG; Gomis-Rüth *et al.*, 1993); atrolisina-C, do veneno da *C. atrox* (PDB

1HTD; Zhang *et al.*, 1994); H2-proteinase, do veneno da *Trimeresurus flavoviridis* (PDB 1WNI; Kumasaka *et al.*, 1996); acutolisinas A e C, do veneno da *Agkistrodon acutus* (PDB 1BSW e 1QUA; Gong *et al.*, 1998; Zhu *et al.*, 1999); TM-3, do veneno da *T. mucrosquamatus* (PDB 1KUF; Huang, 2002); F2, do veneno da *A. acutus* (PDB 1YP1; Lou *et al.*, 2005); e BaP1, do veneno da *Bothrops asper* (PDB 1ND1; Watanabe *et al.*, 2003). Embora os modelos compartilhem as mesmas características e motivos estruturais, observados para a superfamília das metzincinas (Bode *et al.*, 1993), algumas dessas enzimas foram caracterizadas como hemorrágicas e outras como não-hemorrágicas. A tabela 10 mostra a porcentagem de identidade e RMSD entre essas enzimas e a figura 24 apresenta a superposição dos modelos das SVMP de classe P-I disponíveis.

Tabela 10 - Porcentagem de identidade entre as seqüências e RMSD* dos modelos cristalográficos de SVMP de classe P-I disponíveis.

	<i>Leuc-a</i>	<i>Adam</i>	<i>H2</i>	<i>F2</i>	<i>BaP1</i>	<i>Acut-C</i>	<i>TM-3</i>	<i>Atro-C</i>	<i>Acut-A</i>	<i>Atrox</i>	<i>LHF-II</i>	<i>Fibro</i>	<i>Bothro</i>	<i>Lebet</i>
<i>Leuc-a</i>	-	56 (0.85)	51 (0.78)	38 (0.87)	78 (0.71)	47 (0.91)	53 (0.88)	57 (0.90)	50 (1.10)	57	64	58	52	58
<i>Adam</i>	56 (0.85)	-	53 (0.68)	41 (0.80)	59 (0.76)	51 (0.77)	51 (0.82)	78 (0.56)	47 (0.92)	82	66	57	50	56
<i>H2</i>	51 (0.78)	53 (0.68)	-	44 (0.63)	52 (0.68)	56 (0.59)	69 (0.65)	51 (0.70)	51 (0.93)	49	60	59	54	53
<i>F2</i>	38 (0.87)	41 (0.80)	44 (0.63)	-	40 (0.78)	60 (0.55)	42 (0.87)	43 (0.86)	45 (0.92)	38	44	50	48	43
<i>BaP1</i>	78 (0.71)	59 (0.76)	52 (0.68)	40 (0.78)	-	49 (0.79)	54 (0.90)	59 (0.86)	50 (0.88)	58	64	57	55	61
<i>Acut-C</i>	47 (0.91)	51 (0.77)	56 (0.59)	60 (0.55)	49 (0.79)	-	50 (0.83)	52 (0.73)	48 (0.93)	50	54	57	52	50
<i>TM-3</i>	53 (0.88)	51 (0.82)	69 (0.65)	42 (0.87)	54 (0.90)	50 (0.83)	-	48 (0.87)	45 (0.89)	49	55	56	53	55
<i>Atro-C</i>	57 (0.90)	78 (0.56)	51 (0.70)	43 (0.86)	59 (0.86)	52 (0.73)	48 (0.87)	-	44 (1.07)	73	68	58	52	58
<i>Acut-A</i>	50 (1.10)	47 (0.92)	51 (0.93)	45 (0.92)	50 (0.88)	48 (0.93)	45 (0.89)	44 (1.07)	-	48	52	54	62	49
<i>Atrox</i>	57	82	49	38	58	50	49	73	48	-	62	56	49	56
<i>LHF-II</i>	64	66	60	44	64	54	55	68	52	62	-	61	57	62
<i>Fibro</i>	58	57	59	50	57	57	56	58	54	56	61	-	56	62
<i>Bothro</i>	52	50	54	48	55	52	53	52	62	49	57	56	-	51
<i>Lebet</i>	58	56	53	43	61	50	55	58	49	56	62	62	51	-

*Os valores dos resíduos do RMSD, em angstroms, estão representados entre parênteses. **Legenda:** (**Leuc-a**) leucrolisina-a; (**Adam**) adamalisina-II; (**H2**) H2-proteinase; (**F2**) metaloproteinase fibrinogenolítica não-hemorrágica da *Agkistrodon acutus*; (**BaP1**) metaloproteinase hemorrágica da *Bothrops asper*; (**Acut-C**) acutolisina-C; (**TM-3**) metaloproteinase TM-3 da *Trimeresurus mucrosquamatus*; (**Atro-C**) atrolisina-C; (**Acut-A**) acutolisina-A; (**Atrox**) atroxase; (**LHF-II**) (ou mutalisina-II) fator hemorrágico-II da *Lachesis*; (**Fibro**) fibrolase; (**Bothro**) bothrostatina; (**Lebet**) lebetase.

A sobreposição das estruturas revela um alto grau de similaridade estrutural, com pequenas diferenças elas. As enzimas apresentam uma estrutura tridimensional geral muito conservada, com exceção da região de *loops* próxima ao sítio catalítico. Mesmo com algumas variações, as estruturas que apresentam três pontes dissulfeto conservadas (Cys₁₁₇-Cys₁₉₇, Cys₁₅₇-Cys₁₆₄, e Cys₁₅₉-Cys₁₈₁), ou duas pontes (Cys₁₁₇-Cys₁₉₇ e Cys₁₅₇-

Cys₁₆₄) nessa região, apresentam grande similaridade estrutural.

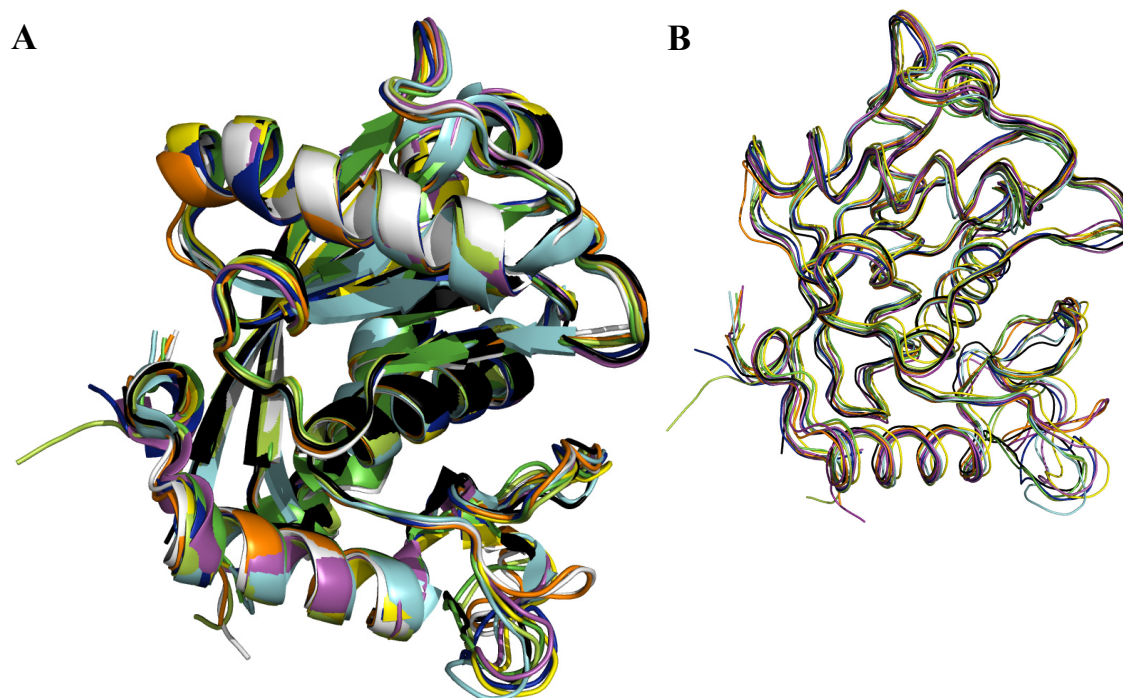


Figura 24 - Alinhamento dos modelos cristalográficos das SVMP de classe P-I disponíveis com a leuc-a. **(A)** estruturas representadas no estilo “cartoon” sobrepostas. **(B)** sobreposição das cadeias carbônicas. **Cores:** leuc-a em verde; adamalysina-II em laranja; H2 em amarelo; F2 em azul; BaP1 em lima; acutolisina-C em magenta; TM-3 em ciano; atrolisina-C em cinza; acutolisina-A em preto.

Por ser essa região de alças, próxima ao sítio catalítico, a que apresenta maior variação, é de se esperar que ela possa estar envolvida na ligação a diferentes pontos da MB e posterior hidrólise de seus componentes, o que pode provocar ou não efeito hemorrágico observado nessas enzimas.

Watanabe e colaboradores (2003) compararam essa região nas estruturas da BaP1, H2-proteinase e acutolisina-A. Comparando a BaP1 e acutolisina-A (consideradas fracamente e altamente hemorrágicas, respectivamente, de acordo com o critério de classificação sugerido por Tsai *et al.* 2000) foi observado que duas regiões, que abrangem os resíduos 153 a 163 e 167 a 177 (regiões anterior e posterior à sequência conservada C₁₆₄I₁₆₅M₁₆₆), possuíam 82 e 9 % de identidade, respectivamente. A sequência que abrange os resíduos 153 a 163 poderia ser apontada como a responsável pelo efeito hemorrágico. A

mesma comparação foi feita, utilizando as seqüências da figura 6, com o resultado sendo apresentado na tabela 11.

Tabela 11 - Porcentagem de identidade de seqüência nas regiões 153 a 163 e 167 a 177* das SVMP de classe P-I usadas nesse trabalho.

	<i>Leuc-a</i>	<i>Adam</i>	<i>H2</i>	<i>F2</i>	<i>BaP1</i>	<i>Acut-C</i>	<i>TM-3</i>	<i>Atro-C</i>	<i>Acut-A</i>	<i>Atrox</i>	<i>LHF-II</i>	<i>Fibro</i>	<i>Bothro</i>	<i>Lebet</i>
<i>Leuc-a</i>	-	36 (36)	33 (27)	33 (27)	45 (63)	36 (36)	25 (18)	36 (45)	36 (9)	36 (36)	54 (36)	81 (36)	36 (18)	54 (18)
<i>Adam</i>	36 (36)	-	27 (9)	25 (18)	36 (36)	27 (27)	27 (9)	100 (90)	27 (9)	81 (100)	36 (45)	45 (18)	27 (9)	45 (36)
<i>H2</i>	33 (27)	27 (9)	-	40 (27)	33 (27)	30 (36)	80 (81)	27 (9)	25 (45)	33 (9)	33 (36)	33 (54)	25 (36)	41 (27)
<i>F2</i>	33 (27)	25 (18)	40 (27)	-	33 (27)	40 (63)	50 (18)	27 (18)	41 (36)	25 (18)	25 (36)	33 (45)	33 (45)	33 (9)
<i>BaP1</i>	45 (63)	36 (36)	33 (27)	33 (27)	-	36 (36)	25 (27)	36 (45)	81 (9)	36 (36)	36 (36)	54 (36)	81 (27)	45 (36)
<i>Acut-C</i>	36 (36)	27 (27)	30 (36)	40 (63)	36 (36)	-	40 (27)	27 (27)	36 (27)	27 (27)	27 (36)	36 (45)	36 (54)	36 (18)
<i>TM-3</i>	25 (18)	27 (9)	80 (81)	50 (18)	25 (27)	40 (27)	-	27 (9)	25 (45)	25 (9)	25 (27)	25 (54)	25 (36)	33 (27)
<i>Atro-C</i>	36 (45)	100 (90)	27 (9)	27 (18)	36 (45)	27 (27)	27 (9)	-	27 (9)	81 (90)	36 (45)	45 (18)	27 (9)	45 (36)
<i>Acut-A</i>	36 (9)	27 (9)	25 (45)	41 (36)	81 (9)	36 (27)	25 (45)	27 (9)	-	27 (9)	36 (36)	45 (27)	81 (45)	36 (9)
<i>Atrox</i>	36 (36)	81 (100)	33 (9)	25 (18)	36 (36)	27 (27)	25 (9)	81 (90)	27 (9)	-	36 (45)	45 (18)	27 (9)	45 (36)
<i>LHF-II</i>	54 (36)	36 (45)	33 (36)	25 (36)	36 (36)	27 (36)	25 (27)	36 (45)	36 (36)	36 (45)	-	54 (27)	27 (27)	36 (27)
<i>Fibro</i>	81 (36)	45 (18)	33 (54)	33 (45)	54 (36)	36 (45)	25 (54)	45 (18)	45 (27)	45 (18)	54 (27)	-	45 (27)	72 (27)
<i>Bothro</i>	36 (18)	27 (9)	25 (36)	33 (45)	81 (27)	36 (54)	25 (36)	27 (9)	81 (45)	27 (9)	27 (27)	45 (27)	-	36 (9)
<i>Lebet</i>	54 (18)	45 (36)	41 (27)	33 (9)	45 (36)	36 (18)	33 (27)	45 (36)	36 (9)	45 (36)	36 (27)	72 (27)	36 (9)	-

*Os valores de porcentagem de identidade dos resíduos 167-177 estão entre parênteses. **Legenda:** (**Leuc-a**) leucurolisina-a; (**Adam**) adamalisina-II; (**H2**) H2-proteinase; (**F2**) metaloproteinase fibrinogenolítica não-hemorrágica da *Agkistrodon acutus*; (**BaP1**) metaloproteinase hemorrágica da *Bothrops asper*; (**Acut-C**) acutolisina-C; (**TM-3**) metaloproteinase TM-3 da *Trimeresurus mucrosquamatus*; (**Atro-C**) atrolisina-C; (**Acut-A**) acutolisina-A; (**Atrox**) atroxase; (**LHF-II**) (ou mutalisina-II) fator hemorrágico-II da *Lachesis*; (**Fibro**) fibrolase; (**Bothro**) bothrostatina; (**Lebet**) lebetase.

Podemos fazer algumas comparações entre a leuc-a e as outras enzimas: (1) leuc-a e as P-I hemorrágicas: a porcentagem de identidade entre os resíduos dessas regiões, entre a leuc-a e a BaP1, é de 45 % para a primeira região e 63 % para a segunda região. Se a comparação for feita entre leuc-a e acut-A, temos 36 % e 9 %, respectivamente, para as regiões; (2) leuc-a com as enzimas de classe P-I não-hemorrágicas: leuc-a com adam, temos, 36 % para ambas as regiões. Leuc-a com H2, temos, 32 % e 27 %. O que mais chama a atenção é a comparação entre adam (não-hemorrágica) e atro-C (hemorrágica): 100 %, para os resíduos 153 a 163, e 90 % para os resíduos 167 a 177.

Está claro que esses resultados são inconclusivos e não é possível apontar somente essas regiões como as responsáveis pela divergência no efeito farmacológico dessas proteínas. Apesar da análise possuir como ponto de partida uma comparação entre os modelos cristalográficos, mais uma vez ela só levou em consideração a seqüência de resíduos de aminoácidos dessas proteínas.

Ramos e Selistre-de-Araújo (2004) utilizaram outra metodologia para tentar

elucidar o problema. Foi feita a análise da superfície molecular dos modelos cristalográficos disponíveis, juntamente com outros modelos construídos por homologia, de proteínas hemorrágicas e não-hemorrágicas para tentar encontrar um padrão que as diferenciasse. A conclusão obtida por Ramos e Selistre-de-Araújo, em seu trabalho, foi que deve existir alguma relação não linear entre as proteínas hemorrágicas e a polaridade da área de superfície molecular. Outra observação feita por eles é que as enzimas não-hemorrágicas apresentam, na posição 151, resíduos polares salientes.

Repetimos o mesmo experimento, nas condições descritas nos Materiais e Métodos, e os resultados são apresentados nos gráficos 6 e 7 e figura 25. Não foi possível fazer nenhuma relação entre a área de superfície acessível polar ou superfície molecular acessível polar com o efeito hemorrágico. Nos gráficos 6 e 7, podemos observar que os resíduos de carga positiva e negativa e a área acessível desses resíduos na superfície da proteína, não é um critério que distinga as enzimas hemorrágicas. Os resultados de área superfície acessível podem não mostrar uma clara divisão entre hemorrágicas e não-hemorrágicas, mas pode nos dar uma pista de que elas podem ter diferentes substratos na MB. Podemos notar que, apesar do número total de resíduos carregados ser próximo, sua disposição em áreas de superfície acessível ao solvente na molécula é bem diferente (figura 25). Essa é uma evidência que corrobora com a hipótese de diferentes áreas na molécula estarem envolvidas na aproximação, interação e clivagem de diferentes substratos, gerando assim, o efeito hemorrágico.

Observando a figura 6, não conseguimos chegar à mesma conclusão de que na posição 151, as enzimas não-hemorrágicas apresentam resíduos com carga positiva. Tanto resíduos carregados, positivamente e negativamente, e resíduos polares aparecem nas enzimas hemorrágicas quanto nas não-hemorrágicas, nessa posição. A hidrofobicidade poderia ser utilizada para tentar distinguir o efeito nessas enzimas, mas, como os resultados mostram, esse é um parâmetro que também não pode ser utilizado. A grande maioria dessas enzimas é hidrofílica (ver os valores de GRAVY, tabela 9), com a exceção da F2 (não-hemorrágica), que possui um alto valor positivo de GRAVY e a atrolisina-C (hemorrágica), que possui um baixo valor de GRAVY.

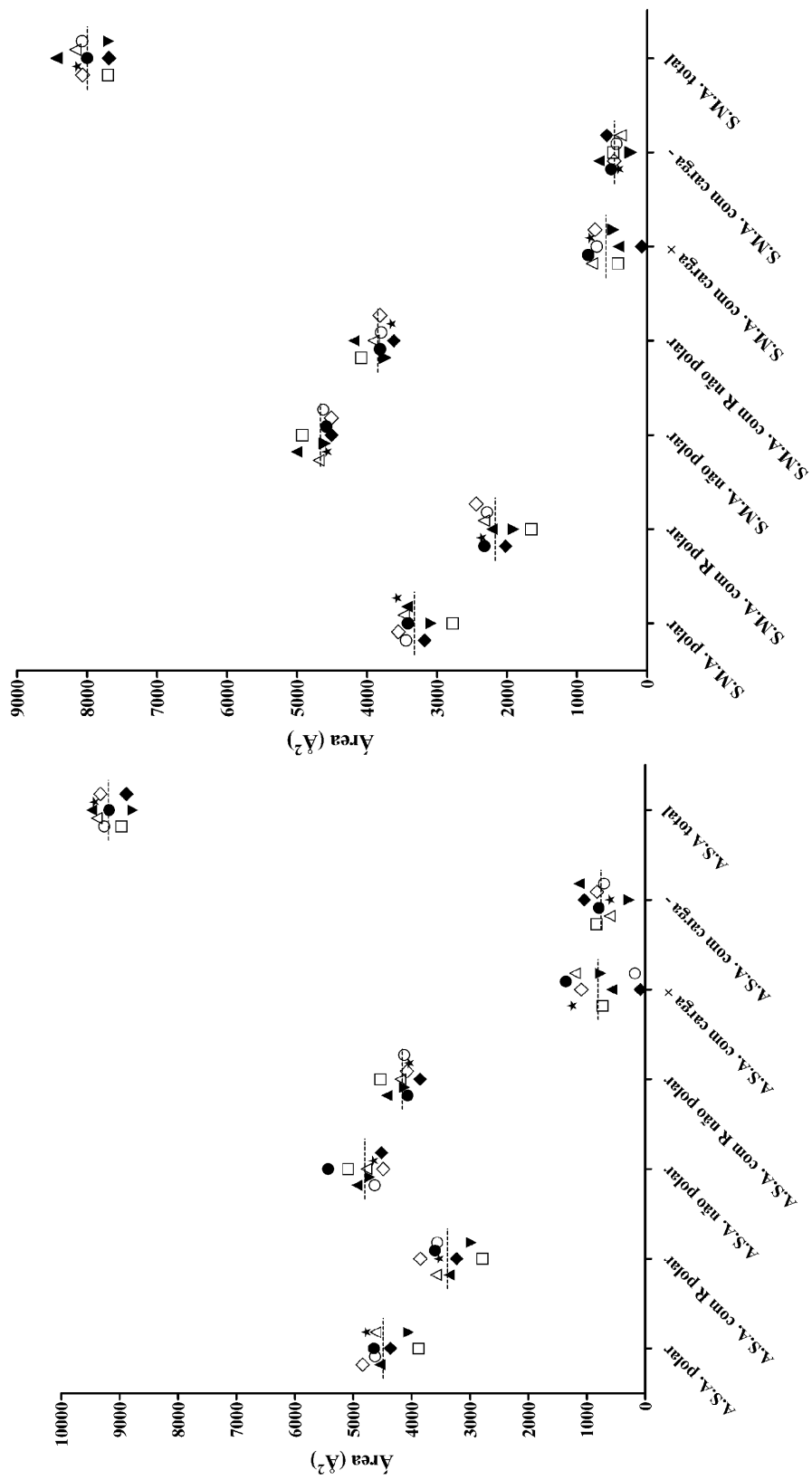


Gráfico 3 e 4 - Área de superfície acessível (A.S.A) e superfície molecular acessível (S.M.A.) das SVMP de classe P-I com modelo cristalográfico disponível. **Legenda:** não-hemorrágicas - (O) leucolisina-a; (Δ) adamalisina-II; (◇) H2-proteinase; (□) F2. Hemorrágicas - (★) BaP1; (▼) acutolisina-C; (●) TM-3; (▲) atrolisina-C; e (◆) acutolisina-A.

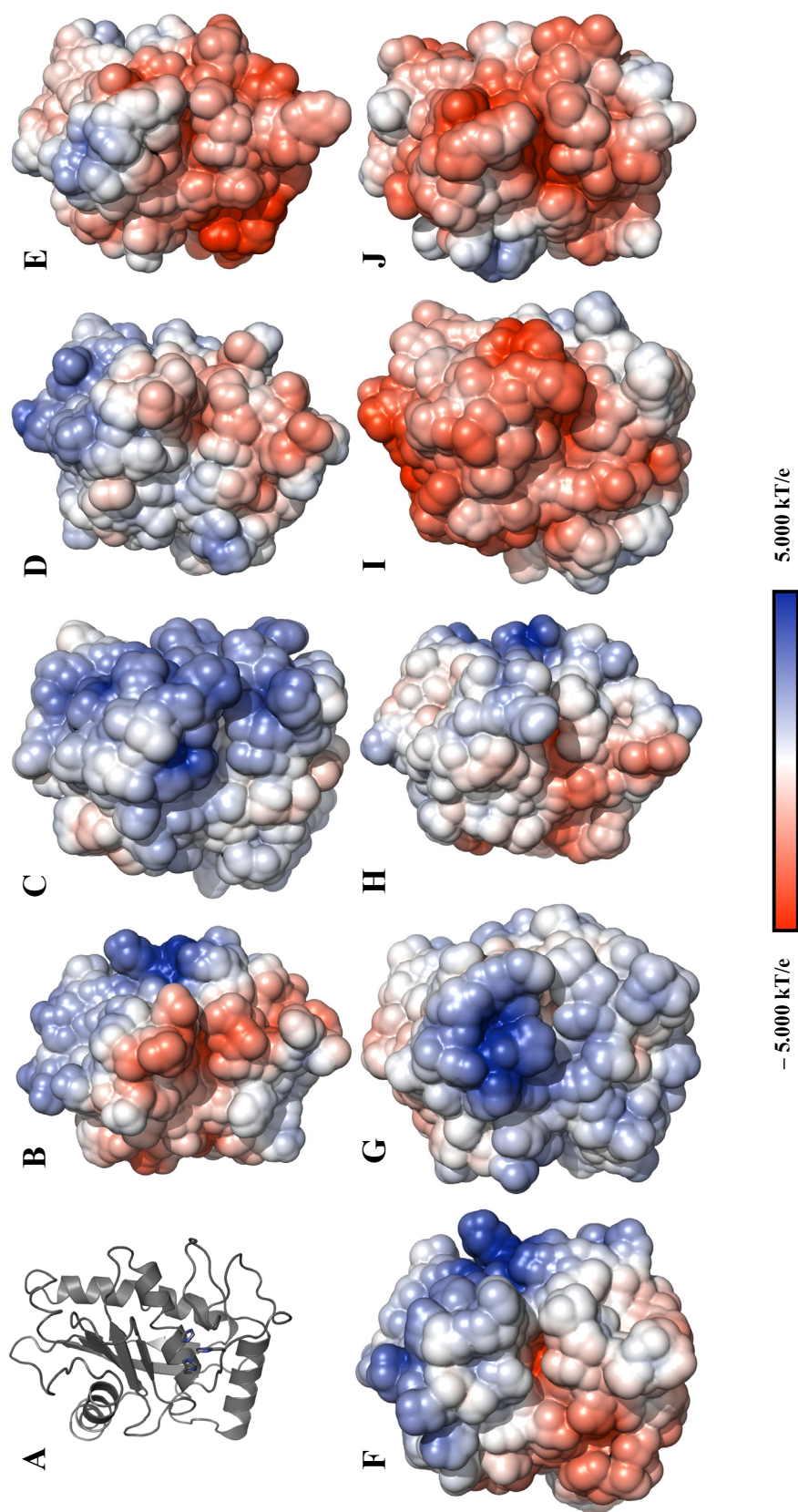


Figura 25 - Representação da superfície acessível ao solvente, colorida por potencial eletrostático, das SVMP de classe P-I com estrutura cristalográfica resolvida. (A) posicionamento espacial das estruturas; (B) leuc-a; (C) adamalislina-II (PDB 1IAG); (D) H2 (PDB 1WN1); (E) F2 (PDB 1YP1); (F) BapI (PDB 1ND1); (G) acutolisina-C (PDB 1QUA); (H) TM-3 (PDB 1KUF); (I) atrolislina-C (PDB 1ATL); (J) acutolisina-A (PDB 1BSW). Coloração em vermelho representa carga negativa. Coloração em branco representa carga neutra. Coloração em azul representa carga positiva.

A análise de superfície molecular também apresenta limitações. Ela se baseia em um modelo estático e as medições realizadas não levam em consideração a mobilidade de determinadas regiões da molécula, como a região de alças que circunda o sítio catalítico, por exemplo. A mobilidade de regiões flexíveis poderia expor ou aproximar outras regiões importantes para as interações com o substrato. Para identificarmos como essas regiões se movimentam e para quais direções elas se movimentam, seriam necessários vários modelos cristalográficos de uma mesma proteína em diferentes situações.

Todos os indícios mostram que esse problema não poderá ser resolvido usando apenas uma abordagem, já que se trata de um problema multifatorial (Ramos e Selistre-De-Araujo, 2004), então, qual seria a solução para esse problema?

4.13 - Algumas metodologias que podem ajudar a solucionar o problema.

A tentativa de se descobrir qual fator seria responsável pelo aparecimento do efeito hemorrágico, ou não-hemorrágico, deve iniciar com a caracterização bioquímica / farmacológica dessas enzimas. A correta identificação dos substratos e dos sítios de clivagem dessas enzimas na MB seria um passo fundamental para elucidar o problema. A metodologia comumente utilizada é a hidrólise da cadeia β da insulina oxidada e bradicinina. A partir dessas digestões são traçados os sítios de clivagem dessas enzimas. Até o presente momento, apenas as toxinas hemorrágicas da *Crotalus atrox* tiveram seus sítios de clivagem descritos em detalhes (Fox et al., 1986; Fox e Bjarnason, 1995) em comparação com as várias seqüências descritas. Essa informação é de fundamental importância, já que, diferentes enzimas podem clivar diferentes substratos, ou o mesmo substrato em diferentes posições, afetando a estabilidade da MB de diferentes formas (Gutierrez et al., 2005). Essa pode ser a evidência estrutural que apóia a hipótese de que a hidrólise de componentes da MB seria o evento chave para hemorragia induzida pelas SVMs (Gutierrez *et al.*, 2005).

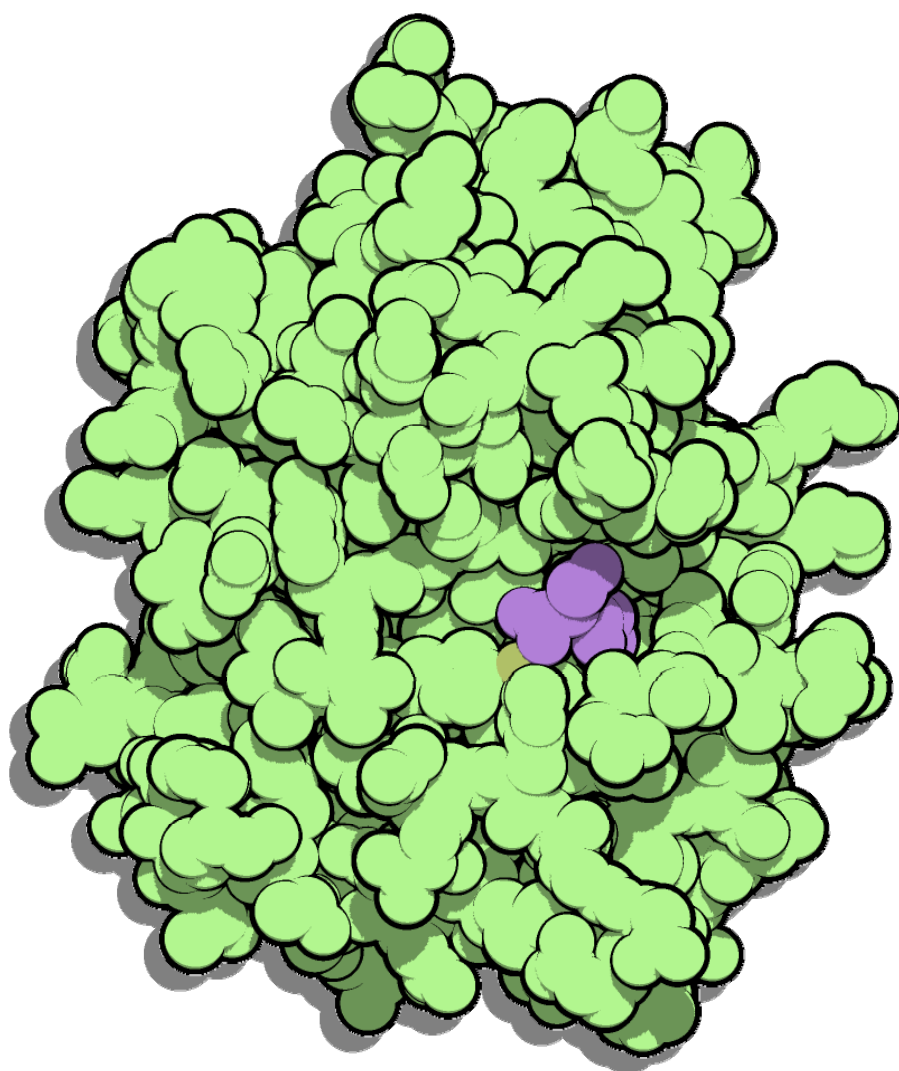
Outro ponto a ser observado é o teste de avaliação da atividade hemorrágica. O teste mais utilizado é o teste *in vivo* de Kondo (Kondo et al., 1960). Várias

modificações desse teste, baseando-se no original, foram adotadas ao longo do tempo. Entre essas modificações temos: (1) seleção do modelo animal (camundongo, rato, cobaia ou coelho); (2) concentrações e vias de administração; (3) tempo de incubação após a aplicação da toxina. Essas modificações produzem diferentes resultados na análise do efeito hemorrágico (Sanchez e Swenson, 2007). A falta de uma padronização nesse teste pode ser a responsável por caracterizações errôneas e uma conseqüente dificuldade de identificação do fator responsável pelo efeito hemorrágico. Sanchez e Swenson (2007) sugerem que o melhor modelo animal é o coelho, depois a cobaia, o rato e camundongo. Essas medidas seriam simples de serem adotadas e facilitariam muito a comparação entre essas enzimas.

Outra metodologia que deve ser tentada é a expressão de enzimas de classe P-I recombinantes funcionais em sistemas heterólogos. Algumas poucas tentativas bem sucedidas foram descritas para a jararagina (classe P-III) e a ACLF (classe P-I) (Paine et al., 1992; Ramos et al., 2003). A grande dificuldade dessa metodologia é a formação correta das pontes dissulfeto. Os sistemas de expressão em células de mamíferos são de elevado custo, difícil escalonamento, baixo rendimento e longo tempo de produção (Verma et al., 1998). Uma alternativa seria o uso de células de insetos, mas o risco de um enovelamento diferente da proteína nativa é grande assim como o custo de produção (Verma *et al.*, 1998). Outra alternativa seria fazer o enovelamento da proteína *in vitro*, após expressão em bactérias. A expressão funcional das SVMP é uma enorme barreira a ser superada. O estudo de mutantes pontuais, ou de regiões inteiras, dessas enzimas seria a chave, em tese, para elucidar o problema do efeito hemorrágico / não-hemorrágico. Sem essas “novas” metodologias, uma revisão / padronização completa dos testes de caracterização bioquímica e farmacológica estamos longe de encontrar a resposta definitiva para a divergência no modo de ação apresentada por essas enzimas.

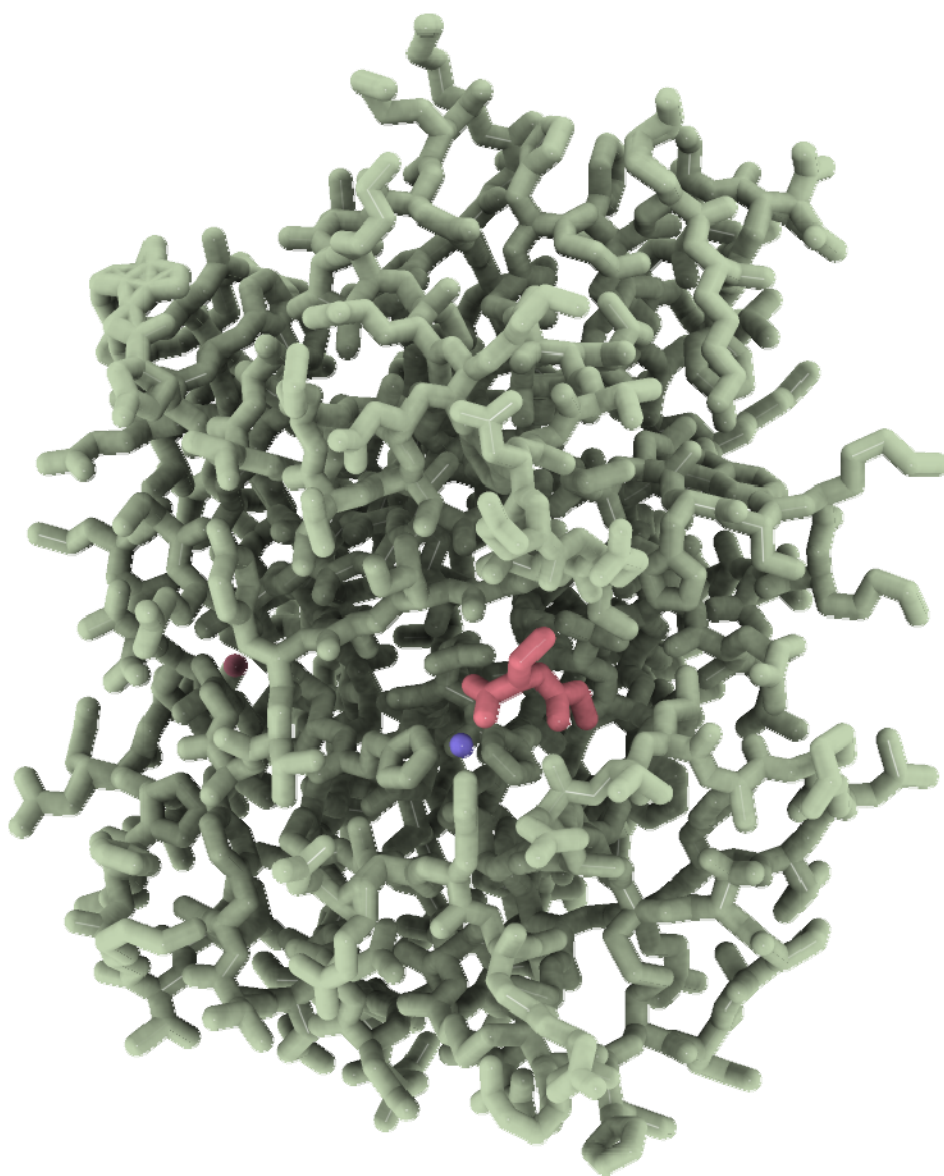
Essa parte do trabalho apresentou uma revisão da Literatura sobre as investigações que tentam solucionar o problema da divergência nos efeitos farmacológicos observados nas SVMP de classe P-I. As tentativas de explicar essa divergência, até o momento, não foram conclusivas. As evidências aqui apresentadas sugerem que uma mudança na metodologia de caracterização bioquímica /

farmacológica dessas enzimas se faz necessária para talvez, em breve, solucionarmos esse problema.



5 - CONCLUSÕES.

- A estrutura primária da metaloprotease não hemorrágica leucurolisina-a, purificada do veneno da serpente *Bothrops leucurus*, foi completamente determinada.
- Foram obtidos cristais de leuc-a nos testes preliminares de cristalização.
- Algumas das condições iniciais de cristalização foram otimizadas, gerando cristais adequados para os experimentos de difração de raios-X.
- Dois conjuntos de dados, um a 1,8 e outro a 1,6 Å, foram coletados, indexados, integrados, dimensionados e refinados para gerar dois modelos cristalográficos da leuc-a. O conjunto de dados a 1,6 Å apresentou uma densidade eletrônica não esperada em seu sítio catalítico.
- A densidade desconhecida foi interpretada como um novo inibidor peptídico endógeno presente no veneno.
- Esse novo inibidor foi sintetizado e usado com sucesso em ensaio de inibição da atividade proteolítica da leuc-a sobre a dimetilcaseína.
- Uma variante do peptídeo inibidor também foi sintetizada e foi usado com sucesso em ensaios de inibição da atividade proteolítica da leuc-a sobre a dimetilcaseína e o fibrinogênio humano.



6 - PERSPECTIVAS.

- Realizar estudos de caracterização dos substratos e sítios de clivagem da metaloprotease leucurolisina-a.
- Realizar a síntese de novos peptídeos inibidores e realizar novos testes de inibição da leuc-a.
- Cristalizar a leuc-a com os novos peptídeos sintéticos.
- Realizar o estudo estrutural das interações entre a leuc-a e os novos peptídeos.

7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

1. ADIS_INTERNATIONAL_LIMITED. Alfimeprase. **Drugs in R&D**, v. 9, n. 3, p. 185-90, 2008. ISSN 1174-5886. Disponível em: <
<http://www.ingentaconnect.com/content/adis/rdd/2008/00000009/00000003;jsessionid=d4ekb924t8cjp.alice> >.

2. AGERO, U.; ARANTES, R. M.; LACERDA-QUEIROZ, N.; MESQUITA, O. N.; MAGALHAES, A.; SANCHEZ, E. F.; CARVALHO-TAVARES, J. Effect of mutalysin II on vascular recanalization after thrombosis induction in the ear of the hairless mice model. **Toxicon**, v. 50, n. 5, p. 698-706, Oct 2007. ISSN 0041-0101 (Print). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17681580 >.

3. BAILEY, S. The CCP4 suite: programs for protein crystallography. **Acta Crystallogr D Biol Crystallogr**, v. 50, n. Pt 5, p. 760-3, Sep 1 1994. ISSN 0907-4449 (Print). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15299374 >.

4. BAKER, N. A.; SEPT, D.; JOSEPH, S.; HOLST, M. J.; MCCAMMON, J. A. Electrostatics of nanosystems: application to microtubules and the ribosome. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 98, n. 18, p. 10037-41, Aug 28 2001. ISSN 0027-8424 (Print). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11517324 >.

5. BELLO, C. A.; HERMOGENES, A. L.; MAGALHÃES, A.; VEIGA, S. S.; GREMSKI, L. H.; RICHARDSON, M.; SANCHEZ, E. F. Isolation and biochemical characterization of a fibrinolytic proteinase from Bothrops leucurus (white-tailed jararaca) snake venom. **Biochimie**, v. 88, n. 2, p. 189-200, Feb 2006. ISSN 0300-9084 (Print). Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16139412 >.

6. BJARNASON, J. B.; FOX, J. W. Hemorrhagic metalloproteinases from snake venoms. **Pharmacol Ther**, v. 62, n. 3, p. 325-72, 1994. ISSN 0163-7258 (Print).
Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7972338 >.

7. BODE, W.; GOMIS-RÜTH, F. X.; STOCKLER, W. Astacins, serralysins, snake venom and matrix metalloproteinases exhibit identical zinc-binding environments (HEXXHXXGXXH and Met-turn) and topologies and should be grouped into a common family, the 'metzincins'. **FEBS Lett**, v. 331, n. 1-2, p. 134-40, Sep 27 1993. ISSN 0014-5793 (Print). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8405391 >.

8. CAMPBELL, J. A., LAMAR, W. W. **The venomous reptiles of Latin America**. Ithaca: Comstock Pub. Associates, 1989. xii, 425 p. ISBN 0801420598 (alk. paper).

9. CHAN, W. C.; WHITE, P. D. **Fmoc solid phase peptide synthesis : a practical approach**. New York: Oxford University Press, 2000. xxiv, 346 p. ISBN 0199637253 (hb)

10. 0199637245 (pbk.). Disponível em: <
<http://www.loc.gov/catdir/enhancements/fy0604/99041250-d.html>

11. <http://www.loc.gov/catdir/enhancements/fy0604/99041250-t.html> >.

12. COLE, C.; BARBER, J. D.; BARTON, G. J. The Jpred 3 secondary structure prediction server. **Nucleic Acids Res**, v. 36, n. Web Server issue, p. W197-201, Jul 1 2008. ISSN 1362-4962 (Electronic). Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18463136 >.

13. DELANO, W. L. The PyMOL Molecular Graphics System. 2002. Disponível em: < <http://www.pymol.org> >. Acesso em: 01/02/2008.

14. EMSLEY, P.; COWTAN, K. Coot: model-building tools for molecular graphics. **Acta Crystallogr D Biol Crystallogr**, v. 60, n. Pt 12 Pt 1, p. 2126-32, Dec 2004. ISSN 0907-4449 (Print). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15572765 >.

15. FOX, J. W.; BJARNASON, J. B. Atrolysins: metalloproteinases from *Crotalus atrox* venom. **Methods Enzymol**, v. 248, p. 368-87, 1995. ISSN 0076-6879 (Print). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7674933 >.

16. FOX, J. W.; CAMPBELL, R.; BEGGERLY, L.; BJARNASON, J. B. Substrate specificities and inhibition of two hemorrhagic zinc proteases Ht-c and Ht-d from *Crotalus atrox* venom. **Eur J Biochem**, v. 156, n. 1, p. 65-72, Apr 1 1986. ISSN 0014-2956 (Print). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=3514216 >.

17. FOX, J. W.; SERRANO, S. M. Structural considerations of the snake venom metalloproteinases, key members of the M12 reprotolysin family of metalloproteinases. **Toxicon**, v. 45, n. 8, p. 969-85, Jun 15 2005. ISSN 0041-0101 (Print). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15922769 >.

18. FOX, J. W.; SERRANO, S. M. Insights into and speculations about snake venom metalloproteinase (SVMP) synthesis, folding and disulfide bond formation and their contribution to venom complexity. **Febs J**, v. 275, n. 12, p. 3016-30, Jun 2008. ISSN 1742-464X (Print). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18479462>.
19. FRANCIS, B.; SEEBART, C.; KAISER, I. I. Citrate is an endogenous inhibitor of snake venom enzymes by metal-ion chelation. **Toxicon**, v. 30, n. 10, p. 1239-46, oct 1992.
20. FREITAS, M. A.; GENO, P. W.; SUMNER, L. W.; COOKE, M. E.; HUDIBURG, S. A.; OWNBY, C. L.; KAISER, I. I.; ODELL, G. V. Citrate is a major component of snake venoms. **Toxicon**, v. 30, n. 4, p. 461-4, Apr 1992. Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1626327?ordinalpos=4&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Pubmed.Pubmed_ResultsPanel.Pubmed_DefaultReportPanel.Pubmed_RVDocSum>.
21. FRY, B. G., VIDAL, N., VAN DER WEERD, L., KOCHVA, E., RENJIFO, C. Evolution and diversification of the Toxicofera reptile venom system. **J Proteomics**, v. 72, n. 2, p. 127-36, Mar 6 2009. ISSN 1874-3919 (Print). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19457354>.
22. FUNASA. **Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos**. 2ª Revisada. Brasília: 2001. 112 ISBN 85-7346-014-8.
23. GASTEIGER, E.; HOOGLAND, C.; GATTIKER, A.; DUVAUD, S.; WILKINS, M. R.; APPEL, R. D.; BAIROCH, A. Protein Identification and Analysis Tools on

the ExPASy Server. In: WALKER, J. M. (Ed.). **The proteomics protocols handbook**. Totowa, N.J.: Humana Press, 2005. p.pp. 571-607. ISBN 1588293432 (hardcover alk. paper).

24. GOMIS-RÜTH, F. X.; KRESS, L. F.; BODE, W. First structure of a snake venom metalloproteinase: a prototype for matrix metalloproteinases/collagenases. **Embo J**, v. 12, n. 11, p. 4151-7, Nov 1993. ISSN 0261-4189 (Print). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8223430 >.
25. GONG, W.; ZHU, X.; LIU, S.; TENG, M.; NIU, L. Crystal structures of acutolysin A, a three-disulfide hemorrhagic zinc metalloproteinase from the snake venom of *Agkistrodon acutus*. **J Mol Biol**, v. 283, n. 3, p. 657-68, Oct 30 1998. ISSN 0022-2836 (Print). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9784374 >.
26. GREGO, K. F.; ALVES, J. A. S.; RAMEH DE ALBUQUERQUE, L. C.; FERNANDES, W. Referências hematológicas para a jararaca de rabo branco (*Bothrops leucurus*) recém capturadas da natureza. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 58, n. 6, p. 1240-3, 2006.
27. GREMSKI, L. H.; CHAIM, O. M.; PALUDO, K. S.; SADE, Y. B.; OTUKI, M. F.; RICHARDSON, M.; GREMSKI, W.; SANCHEZ, E. F.; VEIGA, S. S. Cytotoxic, thrombolytic and edematogenic activities of leucurolysin-a, a metalloproteinase from *Bothrops leucurus* snake venom. **Toxicon**, v. 50, n. 1, p. 120-34, Jul 2007. ISSN 0041-0101 (Print). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17482228 >.

28. GUTIERREZ, J. M.; RUCAVADO, A. Snake venom metalloproteinases: their role in the pathogenesis of local tissue damage. **Biochimie**, v. 82, n. 9-10, p. 841-50, Sep-Oct 2000. ISSN 0300-9084 (Print). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11086214>.
29. GUTIERREZ, J. M.; RUCAVADO, A.; ESCALANTE, T.; DIAZ, C. Hemorrhage induced by snake venom metalloproteinases: biochemical and biophysical mechanisms involved in microvessel damage. **Toxicon**, v. 45, n. 8, p. 997-1011, Jun 15 2005. ISSN 0041-0101 (Print). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15922771>.
30. HEINIG, M.; FRISHMAN, D. STRIDE: a web server for secondary structure assignment from known atomic coordinates of proteins. **Nucleic Acids Res**, v. 32, n. Web Server issue, p. W500-2, Jul 1 2004. ISSN 1362-4962 (Electronic). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15215436>.
31. HIGGINS, D. G.; THOMPSON, J. D.; GIBSON, T. J. Using CLUSTAL for multiple sequence alignments. **Methods Enzymol**, v. 266, p. 383-402, 1996. ISSN 0076-6879 (Print). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8743695>.
32. HITE, L. A.; JIA, L. G.; BJARNASON, J. B.; FOX, J. W. cDNA sequences for four snake venom metalloproteinases: structure, classification, and their relationship to mammalian reproductive proteins. **Arch Biochem Biophys**, v. 308, n. 1, p. 182-91, Jan 1994. ISSN 0003-9861 (Print). Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8311451 >.

33. HONG, T. T.; HUANG, J.; LUCCHESI, B. R. Effect of thrombolysis on myocardial injury: recombinant tissue plasminogen activator vs. alteplase. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 290, n. 3, p. H959-67, Mar 2006. ISSN 0363-6135 (Print). Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16243915 >.
34. HUANG, K. F.; CHIOU, S. H.; KO, T. P.; WANG, A. H. Determinants of the inhibition of a Taiwan habu venom metalloproteinase by its endogenous inhibitors revealed by X-ray crystallography and synthetic inhibitor analogues. **Eur J Biochem**, v. 269, n. 12, p. 3047-56, Jun 2002. ISSN 0014-2956 (Print). Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12071970 >.
35. HUANG, K. F., CHIOU, S. H., KO, T. P., YUANN, J. M., WANG, A. H. The 1.35 Å structure of cadmium-substituted TM-3, a snake-venom metalloproteinase from Taiwan habu: elucidation of a TNF α -converting enzyme-like active-site structure with a distorted octahedral geometry of cadmium. **Acta Crystallogr D Biol Crystallogr**, v. 58, n. Pt 7, p. 1118-28, Jul 2002. ISSN 0907-4449 (Print). Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12077431 >.
36. JIA, L. G.; WANG, X. M.; SHANNON, J. D.; BJARNASON, J. B.; FOX, J. W. Function of disintegrin-like/cysteine-rich domains of atrolysin A. Inhibition of platelet aggregation by recombinant protein and peptide antagonists. **J Biol Chem**, v. 272, n. 20, p. 13094-102, May 16 1997. ISSN 0021-9258 (Print). Disponível em:

<

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9148922 >.

37. KAMIGUTI, A. S.; THEAKSTON, R. D.; DESMOND, H.; HUTTON, R. A. Systemic haemorrhage in rats induced by a haemorrhagic fraction from *Bothrops jararaca* venom. **Toxicon**, v. 29, n. 9, p. 1097-105, 1991. ISSN 0041-0101 (Print).
Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1796474 >.
38. KONDO, H.; KONDO, S.; IKEZAWA, H.; MURATA, R.; OHSAKA, A. Studies on the quantitative method for determination of hemorrhagic activity of Habu snake venom. **Japanese Journal of Medical Science and Biology**, v. 13, p. 43-51, 1960.
39. KUMASAKA, T.; YAMAMOTO, M.; MORIYAMA, H.; TANAKA, N.; SATO, M.; KATSUBE, Y.; YAMAKAWA, Y.; OMORI-SATOH, T.; IWANAGA, S.; UEKI, T. Crystal structure of H2-proteinase from the venom of *Trimeresurus flavoviridis*. **J Biochem**, v. 119, n. 1, p. 49-57, Jan 1996. ISSN 0021-924X (Print).
Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8907175 >.
40. LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680-5, Aug 15 1970. ISSN 0028-0836 (Print).
Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=5432063 >.
41. LOU, Z.; HOU, J.; LIANG, X.; CHEN, J.; QIU, P.; LIU, Y.; LI, M.; RAO, Z.; YAN, G. Crystal structure of a non-hemorrhagic fibrin(ogen)olytic

metalloproteinase complexed with a novel natural tri-peptide inhibitor from venom of *Agkistrodon acutus*. **J Struct Biol**, v. 152, n. 3, p. 195-203, Dec 2005. ISSN 1047-8477 (Print). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16330227>.

42. MARKLAND, F. S., JR. Inventory of alpha- and beta-fibrinogenases from snake venoms. For the Subcommittee on Nomenclature of Exogenous Hemostatic Factors of the Scientific and Standardization Committee of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. **Thromb Haemost**, v. 65, n. 4, p. 438-43, Apr 8 1991. ISSN 0340-6245 (Print). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2057928>.
43. MARTINS, M.; ARAÚJO, M. S.; SAWAYA, R. J.; NUNES, R. Diversity and evolution of macrohabitat use, body size and morphology in a monophyletic group of Neotropical pitvipers (Bothrops). **Journal of Zoology**, v. 254, p. 529-38, 2001.
44. MARTINS, M.; MARQUES, O. A. V.; SAZIMA, I. Ecological and phylogenetic correlates of feeding habits in Neotropical pitvipers (Genus *Bothrops*). In: G. W. SCHUETT, M. H., M. E. DOUGLAS AND H. W. GREENE (Ed.). **Biology of the vipers**. Eagle Mountain: Eagle Mountain Publishing, 2002. p.307-28.
45. MISE, Y. F.; LIRA-DA-SILVA, R. M.; CARVALHO, F. M. Envenenamento por serpentes do gênero *Bothrops* no Estado da Bahia: aspectos epidemiológicos e clínicos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 40, n. 5, p. 569-73, set-out 2007.
46. MURSHUDOV, G. N.; VAGIN, A. A.; DODSON, E. J. Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method. **Acta Crystallogr D Biol Crystallogr**, v. 53, n. Pt 3, p. 240-55, May 1 1997. ISSN 0907-4449 (Print).

Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15299926>.

47. NAVAZA, J. Implementation of molecular replacement in AMoRe. **Acta Crystallogr D Biol Crystallogr**, v. 57, n. Pt 10, p. 1367-72, Oct 2001. ISSN 0907-4449 (Print). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11567147>.

48. OTWINOWSKI, Z.; MINOR, W. Processing of X-ray diffraction data collected in oscillation mode. **Methods Enzymol**, v. 276, n. Macromolecular Crystallography Part A p. 307-26, 1997.

49. OVERALL, C. M. Matrix metalloproteinase substrate binding domains, modules and exosites. In: CLARK, I. M. (Ed.). **Matrix metalloproteinase protocols**. Totowa, N.J.: Humana Press, v.151, 2001. cap. 4, p.xv, 545 p. ISBN 0896037339 (alk. paper).

50. PAINE, M. J.; DESMOND, H. P.; THEAKSTON, R. D.; CRAMPTON, J. M. Purification, cloning, and molecular characterization of a high molecular weight hemorrhagic metalloprotease, jararhagin, from Bothrops jararaca venom. Insights into the disintegrin gene family. **J Biol Chem**, v. 267, n. 32, p. 22869-76, Nov 15 1992. ISSN 0021-9258 (Print). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1385408>.

51. PINHO, F. M.; PEREIRA, I. D. Snake bites. **Revista da Associacao Medica Brasileira**, v. 47, n. 1, p. 24-9, Jan-Mar 2001. ISSN 0104-4230 (Print). Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11340447 >.

52. POLIKARPOV, I.; PERLES, L. A.; DE OLIVEIRA, R. T.; OLIVA, G.; CASTELLANO, E. E.; GARRATT, R. C.; CRAIEVICH, A. Set-up and experimental parameters of the protein crystallography beamline at the Brazilian National Synchrotron Laboratory. **J Synchrotron Radiat**, v. 5, n. Pt 2, p. 72-6, Mar 1 1998. ISSN 0909-0495 (Print). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16687806 >.
53. POUGH, F. H., HEISER, J. B., MCFARLAND, W. N. **Vertebrate life**. 4th. Upper Saddle River, N.J.: Prentice Hall, 1996. xvii, 798 p., [4] p. of plates ISBN 0023963700.
54. PROJETO_JARARACA. São Paulo, 2006. Disponível em: <
http://www.eco.ib.usp.br/labvert/Jararaca/projjar_principal.htm >. Acesso em: 09/04/2007.
55. RAMOS, O. H.; CARMONA, A. K.; SELISTRE-DE-ARAUJO, H. S. Expression, refolding, and in vitro activation of a recombinant snake venom pro-metalloprotease. **Protein Expr Purif**, v. 28, n. 1, p. 34-41, Mar 2003. ISSN 1046-5928 (Print). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12651104 >.
56. RAMOS, O. H.; SELISTRE-DE-ARAUJO, H. S. Comparative analysis of the catalytic domain of hemorrhagic and non-hemorrhagic snake venom metalloproteases using bioinformatic tools. **Toxicon**, v. 44, n. 5, p. 529-38, Oct 2004. ISSN 0041-0101 (Print). Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15450928 >.

57. RAMOS, O. H.; SELISTRE-DE-ARAÚJO, H. S. Snake venom metalloproteases-- structure and function of catalytic and disintegrin domains. **Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol**, v. 142, n. 3-4, p. 328-46, Mar-Apr 2006. ISSN 1532-0456 (Print). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16434235 >.
58. RATES, B.; FERRAZ, K. K.; BORGES, M. H.; RICHARDSON, M.; DE LIMA, M. E.; PIMENTA, A. M. Tityus serrulatus venom peptidomics: assessing venom peptide diversity. **Toxicon**, v. 52, n. 5, p. 611-8, Oct 2008. ISSN 0041-0101 (Print). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18718845 >.
59. RUCAVADO, A.; FLORES-SANCHEZ, E.; FRANCESCHI, A.; MAGALHÃES, A.; GUTIERREZ, J. M. Characterization of the local tissue damage induced by LHF-II, a metalloproteinase with weak hemorrhagic activity isolated from Lachesis muta muta snake venom. **Toxicon**, v. 37, n. 9, p. 1297-312, Sep 1999. ISSN 0041-0101 (Print). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10400290 >.
60. SANCHEZ, E. F.; MAGALHES, A.; MANDELBAUM, F. R.; DINIZ, C. R. Purification and characterization of the hemorrhagic factor II from the venom of the Bushmaster snake (Lachesis muta muta). **Biochim Biophys Acta**, v. 1074, n. 3, p. 347-56, Aug 6 1991. ISSN 0006-3002 (Print). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1909578 >.

61. SANCHEZ, E. F.; SWENSON, S. Proteases from South American Snake Venoms Affecting Fibrinolysis **Current Pharmaceutical Analysis**, v. 3, n. 2, p. 147-57, May 2007. Disponível em: <
<http://www.ingentaconnect.com/content/ben/cpa/2007/00000003/00000002/art00008>>.

62. SEIGEL, R. A., COLLINS, J. T. & NOVAK, S. S. **Snakes--ecology and evolutionary biology**. New York: Macmillan, 1987. xiv, 529 p. ISBN 0029478308.

63. SERAFIM, H., PECCININI-SEALE, D.M., BATISTIC, R.F. Estudo cariotípico de duas espécies brasileiras do gênero *Micrurus* (Ophidia: Elapidae). **Biota Neotropica**, v. 7, n. 1, p. 75-80, 15/01/07 2007. ISSN 1676-0603.

64. SERRANO, S. M.; WANG, D.; SHANNON, J. D.; PINTO, A. F.; POLANOWSKA-GRABOWSKA, R. K.; FOX, J. W. Interaction of the cysteine-rich domain of snake venom metalloproteinases with the A1 domain of von Willebrand factor promotes site-specific proteolysis of von Willebrand factor and inhibition of von Willebrand factor-mediated platelet aggregation. **Febs J**, v. 274, n. 14, p. 3611-21, Jul 2007. ISSN 1742-464X (Print). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17578514>.

65. STÖCKER, W.; BODE, W. Structural features of a superfamily of zinc-endopeptidases: the metzincins. **Curr Opin Struct Biol**, v. 5, n. 3, p. 383-90, Jun 1995. ISSN 0959-440X (Print). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7583637>.

66. STÖCKER, W.; GOMIS-RÜTH, F. X.; BODE, W.; ZWILLING, R. Implications of the three-dimensional structure of astacin for the structure and function of the astacin family of zinc-endopeptidases. **Eur J Biochem**, v. 214, n. 1, p. 215-31, May 15 1993. ISSN 0014-2956 (Print). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8508794 >.
67. STÖCKER, W.; GRAMS, F.; BAUMANN, U.; REINEMER, P.; GOMIS-RUTH, F. X.; MCKAY, D. B.; BODE, W. The metzincins--topological and sequential relations between the astacins, adamalysins, serralysins, and matrixins (collagenases) define a superfamily of zinc-peptidases. **Protein Sci**, v. 4, n. 5, p. 823-40, May 1995. ISSN 0961-8368 (Print). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7663339 >.
68. SVS/MS. Brasília, 2009. Disponível em: < http://portal.saude.gov.br/saude/area.cfm?id_area=380 >. Acesso em: 01/07/2009.
69. SWENSON, S.; MARKLAND, F. S., JR. Snake venom fibrin(ogen)olytic enzymes. **Toxicon**, v. 45, n. 8, p. 1021-39, Jun 15 2005. ISSN 0041-0101 (Print). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15882884 >.
70. TAKEDA, S.; IGARASHI, T.; MORI, H. Crystal structure of RVV-X: an example of evolutionary gain of specificity by ADAM proteinases. **FEBS Lett**, v. 581, n. 30, p. 5859-64, Dec 22 2007. ISSN 0014-5793 (Print). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18060879 >.

71. TAKEDA, S.; IGARASHI, T.; MORI, H.; ARAKI, S. Crystal structures of VAP1 reveal ADAMs' MDC domain architecture and its unique C-shaped scaffold. **Embo J**, v. 25, n. 11, p. 2388-96, Jun 7 2006. ISSN 0261-4189 (Print). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16688218>.
72. TSODIKOV, O. V.; RECORD, M. T., JR.; SERGEEV, Y. V. Novel computer program for fast exact calculation of accessible and molecular surface areas and average surface curvature. **J Comput Chem**, v. 23, n. 6, p. 600-9, Apr 30 2002. ISSN 0192-8651 (Print). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11939594>.
73. VERMA, R.; BOLETI, E.; GEORGE, A. J. Antibody engineering: comparison of bacterial, yeast, insect and mammalian expression systems. **J Immunol Methods**, v. 216, n. 1-2, p. 165-81, Jul 1 1998. ISSN 0022-1759 (Print). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9760222>.
74. WAGSTAFF, S. C.; FAVREAU, P.; CHENEVAL, O.; LAING, G. D.; WILKINSON, M. C.; MILLER, R. L.; STOCKLIN, R.; HARRISON, R. A. Molecular characterisation of endogenous snake venom metalloproteinase inhibitors. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 365, n. 4, p. 650-6, Jan 25 2008. ISSN 1090-2104 (Electronic). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18029259>.
75. WATANABE, L.; SHANNON, J. D.; VALENTE, R. H.; RUCAVADO, A.; ALAPE-GIRON, 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**, v. 12, n. 10, p. 2273-81, Oct 2003. ISSN 0961-8368 (Print). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14500885>.
76. WILSON, K. J., YUAN, P. M. Protein and peptide purification. In: J.B.C. FINDLAY, M. J. G. (Ed.). **Protein Sequencing a Practical Approach**. Oxford, New York: IRL Press, 1989. p.3-41.
77. WORLD_HEALTH_ORGANIZATION. **Rabies and envenomings : a neglected public health issue**. World Health Organization. Geneva: 10 January. 2007
78. XU, X.; CHEN, J.; ZHANG, L.; LIU, Q. Metal ions- and pH-induced conformational changes of acutolysin A from Agkistrodon acutus venom probed by fluorescent spectroscopy. **Biopolymers**, v. 85, n. 1, p. 81-90, Jan 2007. ISSN 0006-3525 (Print). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17063468>.
79. ZHANG, D.; BOTOS, I.; GOMIS-RÜTH, F. X.; DOLL, R.; BLOOD, C.; NJOROGÉ, F. G.; FOX, J. W.; BODE, W.; MEYER, E. F. Structural interaction of natural and synthetic inhibitors with the venom metalloproteinase, atrolysin C (form d). **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 91, n. 18, p. 8447-51, Aug 30 1994. ISSN 0027-8424 (Print). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8078901>.
80. ZHU, X.; TENG, M.; NIU, L. Structure of acutolysin-C, a haemorrhagic toxin from the venom of Agkistrodon acutus, providing further evidence for the mechanism of the pH-dependent proteolytic reaction of zinc metalloproteinases. **Acta Crystallogr D Biol Crystallogr**, v. 55, n. Pt 11, p. 1834-41, Nov 1999. ISSN 0907-4449 (Print).

Disponível

em:

<

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10531480 >.