

Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Biológicas

Purificação e caracterização de uma nova metaloprotease da serpente
***Bothrops moojeni* Hoge, 1966 (Squamata: Viperidae) com ação na**
agregação plaquetária

MAYARA RIBEIRO DE QUEIROZ

Orientador: Prof. Dr. Fábio de Oliveira

Belo Horizonte - MG

Julho - 2011

Mayara Ribeiro de Queiroz

**Purificação e caracterização de uma nova metaloprotease da
serpente *Bothrops moojeni* Hoge, 1966 (Squamata: Viperidae) com
ação na agregação plaquetária**

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre no Programa de Pós Graduação do Mestrado Profissional em Inovação Biofarmacêutica do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais.

Área de concentração: Biotecnologia e Formulações Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Fábio de Oliveira

Belo Horizonte
Instituto de Ciências Biológicas da UFMG

2011

Queiroz, Mayara Ribeiro de

Purificação e caracterização de uma nova metaloprotease da serpente *Bothrops moojeni* Hoge, 1966 (Squamata: Viperidae) com ação na agregação plaquetária. [manuscrito] / Mayara Ribeiro de Queiroz.- 2011. 60f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Fábio de Oliveira

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas.

1. Animais peçonhentos - Toxicologia - Teses. 2. Jararaca (Cobra) - Veneno - Teses. 3. Bothrops - Teses. 4. Metaloproteinases – Teses. 5. Plaquetas (Sangue) – Agregação. 6. Biofarmacêutica – Teses. 7. Alfa-fibrinogenase. I. Oliveira, Fábio de. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 591.145

**“PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE UMA NOVA
METALOPROTEASE DA SERPENTE BOTHROPS MOOJENI
HOGE, 1966 (SQUAMATA: VIPERIDAE) COM AÇÃO NA
AGREGAÇÃO PLAQUETÁRIA”**

MAYARA RIBEIRO DE QUEIROZ

Dissertação de Mestrado defendida e aprovada, no dia 08 de julho de 2011, pela Banca Examinadora constituída pelos seguintes membros:



PROFA. DRA. LEÓNILDA STANZIOLA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS/UFU



PROFA. DRA. JÚNIA DE OLIVEIRA COSTA
INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA
DO TRIÂNGULO MINEIRO/IFTM



PROF. DR. MARCELO EMÍLIO BELETTI
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS/UFU



PROF. DR. FÁBIO DE OLIVEIRA
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA/UFU, ORIENTADOR

Instituto de Ciências Biológicas - Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG

Belo Horizonte, 08 de julho de 2011.

Dedico este trabalho a três pessoas muito especiais.

*Aos meus pais, Simara e Queiroz, por todo amor e dedicação.
Vocês são minha força e persistência. Vocês são o que há de melhor em mim...*

E ao meu avô Alberico.

*Anjos da minha vida...
Obrigada por tudo!*

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao INCT em Nano-Biofarmacêutica, CNPq, FAPEMIG, Universidade Federal de Minas Gerais e Universidade Federal de Uberlândia.

Ao coordenador do Mestrado Profissional em Inovação Biofarmacêutica Professor Dr. Robson Augusto de Souza Santos.

Aos membros da Banca Examinadora pela disponibilidade e atenção.

À Bety e ao Helinho, pelos favores e por sempre estarem dispostos a ajudar. À Cynthia Almeida, secretária do Mestrado Profissional.

Ao Professor Dr. Marcelo Emílio Beletti e funcionários do Laboratório de Histologia. À Professora Dra. Valeska Barcelos Guzman, à Dra. Danielle Reis Napolitano e à Professora Dra. Leonilda Stanziola.

Aos meus amigos e colegas de laboratório. Obrigada por compartilharmos nossas dúvidas, problemas, aprendizados e momentos de alegria. Carla, Kelly e Nadia pela amizade, por todo carinho e apoio. Agradeço a todos, sem exceções, Thalita, Saulo, Ana Luiza, Thaísa, Bruna, Déborah, Mariana e Mário, vocês são muito importantes.

Ao Professor Dr. Fábio de Oliveira, meu orientador e amigo, que nunca mediu esforços para me ajudar no decorrer deste trabalho. Obrigada pela orientação criteriosa, pela inesgotável paciência, dedicação, confiança e por todas as oportunidades. Seu apoio e atenção tornaram os problemas que surgiram ao longo da minha formação, apenas pequenos desafios. Você é um exemplo de profissional e de ser humano.

À Fernanda, que esteve presente em um momento muito importante da minha vida e se tornou uma amiga muito especial. Obrigada por todo apoio e auxílio, por me acolher em seu lar, antes mesmo de me conhecer.

Aos meus amigos, por todos os momentos que passamos juntos e por tudo que vocês representam.

Agradeço também à minha avó, Luzia, por todo o amor e dedicação incondicional. Obrigada por todos os conselhos e apoio nos momentos difíceis. Em especial, agradeço ao meu avô, Alberico, que partiu esse ano, mas que sempre esteve presente em minha vida. As lembranças e um amor repleto de saudades estarão para sempre em meu coração.

Ao Adriano, meu amigo e noivo. Obrigada pelo aprendizado que temos um com o outro, pelas risadas, compreensão, paciência, carinho, confiança, amor, respeito e por sempre estar presente. Seu apoio nos momentos difíceis foi muito importante para que eu acreditasse em dias melhores. Amar você me tornou uma pessoa melhor e mais feliz.

À minha irmã Thacy. Obrigada por todo carinho, pelas brincadeiras, pelos momentos de alegria, pela amizade e, até mesmo, pelas brigas. O amor que sinto por você é indescritível.

À minha mãe, Simara, conselheira, amiga e confidente. E ao meu pai, Queiroz, amigo e protetor. Vocês são minha fonte de esperança, proteção, alegria, fé, orientação, conforto e amor. O motivo pelo qual eu desejo ser um ser humano melhor. A vocês devo tudo que sou e aprendi. Sem vocês as conquistas seriam impossíveis. Obrigada por todos os conselhos e “brincas”, pela dedicação, compreensão, carinho e confiança. O apoio de vocês foi de fundamental importância para minha persistência em direção aos meus ideais. Não é possível descrever com palavras a admiração, a gratidão e o amor infinito que sinto por vocês.

Agradeço à força maior, que guia e protege minha vida, pelas oportunidades e conquistas. Por me dar força e coragem para enfrentar os momentos difíceis, pelas pessoas queridas, amigos e minha família.

Agradeço a todos que contribuíram de maneira direta ou indireta em minha formação.

RESUMO

As peçonhas de serpentes contêm uma mistura complexa de diferentes proteínas e peptídeos biologicamente ativos. O presente estudo teve como objetivo avaliar as atividades proteolíticas e biológicas, assim como o efeito inibitório sobre a agregação plaquetária de uma nova metaloprotease da peçonha de *Bothrops moojeni*. A purificação da enzima, denominada BmooMP α -II, foi realizada através de duas etapas cromatográficas (troca iônica em DEAE-Sephacel e exclusão molecular em Sephacryl S300). BmooMP α -II é uma proteína monomérica que apresenta uma massa molecular aparente de 25kDa em SDS-PAGE 14% em condições redutoras. A atividade fibrinogenolítica foi avaliada por SDS-PAGE 14%. Primeiramente, a BmooMP α -II clivou a cadeia A α do fibrinogênio seguida pela cadeia B β , mas não apresentou efeitos sobre a cadeia γ . A atividade fibrinogenolítica foi inibida pelo β -mercaptoetanol, EDTA e 1,10-fenantrolina. A faixa de temperatura e pH ótimos para a atividade fibrinogenolítica foram de 30-50°C e pH=8, respectivamente. Os resultados indicam que essa proteína é provavelmente uma α -fibrinogenase e pertence à classe PI das SVMPs. A BmooMP α -II não apresentou atividades hemorrágica, coagulante ou anticoagulante. Além disso, a BmooMP α -II não induziu edema ou hiperalgesia significantes. As observações histológicas mostraram que a BmooMP α -II causou alterações morfológicas no fígado, rins, pulmões e músculo de camundongos Swiss. A enzima BmooMP α -II inibiu a agregação plaquetária induzida por ADP, colágeno, ristocetina e epinefrina. Quando desnaturada por altas temperaturas, a BmooMP α -II apresentou ação mais rápida de inibição da agregação plaquetária induzida por ADP. Por fim, nossos resultados sugerem o uso da BmooMP α -II como um potente inibidor da agregação plaquetária.

Palavras-chave: peçonha de *Bothrops moojeni*, metaloprotease, α -fibrinogenase e agregação plaquetária.

ABSTRACT

Snake venoms contain a complex mixture of many different biologically active proteins and peptides. The present study aimed to evaluate the proteolytic and biological activities, as well as inhibitory effects on platelet aggregation by a new metalloproteinase from *Bothrops moojeni* venom. The purification of enzyme, named BmooMP α -II, was carried out through two chromatographic steps (ion-exchange on DEAE-Sepharose and molecular exclusion on Sephacryl S300). BmooMP α -II is a monomeric protein with an apparent molecular mass of 25kDa by SDS-PAGE 14% under reducing conditions. Fibrinogenolytic activity was evaluated by SDS-PAGE 14%. First, BmooMP α -II cleaves the A α -chain of fibrinogen followed by the B β -chain, and shows no effects on the γ -chain. Fibrinogenolytic activity is inhibited by β -mercaptoethanol, EDTA and 1,10-phenantroline. Its optimum temperature and pH for the fibrinogenolytic activity were 30-50°C and pH=8, respectively. Results indicate that this protein probably is a α -fibrinogase and belongs to class PI of SVMPs. BmooMP α -II was devoid of hemorrhagic, coagulant or anticoagulant activities. Furthermore, BmooMP α -II induced no significant edema or hyperalgesia. Histological observations showed that BmooMP α -II caused morphological alterations in liver, lung, kidney and muscle of Swiss mice. BmooMP α -II inhibited platelet aggregation induced by ADP, collagen, ristocetin and epinephrine. When denatured by high temperatures, BmooMP α -II was faster in inhibition of platelet aggregation induced by ADP. Finally, our results suggest the use of BmooMP α -II as a potent inhibitor of platelet aggregation.

Keywords: *Bothrops moojeni* venom, metalloproteinase, α -fibrinogase and platelet aggregation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 01: <i>Bothrops moojeni</i>	3
Figura 02: Classificação das SVMs.. ..	8
Figura 03: Morfologia das plaquetas humanas	11
Figura 04: Estrutura molecular da desintegrina Rhodostomin.....	15
Figura 05: Cromatografia de troca iônica da peçonha de <i>B. moojeni</i> em resina DEAE Sephacel.....	27
Figura 06: Cromatografia de exclusão molecular em coluna HiPrep™ 26/60 Sephacryl™ S- 300 da fração DS7.	28
Figura 07: Eletroforese em gel de poliacrilamida a 14% com agentes desnaturantes da peçonha de <i>B. moojeni</i> e frações	29
Figura 8: Eletroforese em gel de poliacrilamida a 14% com agentes desnaturantes dos produtos de digestão do fibrinogênio bovino pela enzima BmooMP α -II	32
Figura 9: Fotomicrografia de cortes de fígado de camundongos.	35
Figura 10: Fotomicrografia de cortes de pulmão de camundongos.	36
Figura 11: Fotomicrografia de cortes de rim (região cortical) de camundongos.....	37
Figura 12: Fotomicrografia de cortes do músculo gastrocnêmio direito de camundongos	38
Figura 13: Inibição da agregação plaquetária pela enzima BmooMP α -II.....	40
Figura 14: Inibição da agregação plaquetária induzida por ADP pela enzima BmooMP α -II desnaturada.	42

LISTA DE TABELAS

Tabela 01: Recuperação protéica da enzima BmoMP α -II a cada etapa de purificação em relação ao total de proteínas presentes na peçonha bruta de <i>Bothrops moojeni</i>	30
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-HT - 5-hidroxitriptamina

ADP - adenosina difosfato

AMBIC - bicarbonato de amônio

Bis-acrilamida - N, N' metileno-bis-acrilamida

BjussuMP-II - metaloprotease de baixo peso molecular da peçonha de *Bothrops jararacussu*

BmooMP α -I - metaloprotease de baixo peso molecular (α -fibrinogenase) I da peçonha de *Bothrops moojeni*

BmooMP α -II - metaloprotease de baixo peso molecular (α -fibrinogenase) II da peçonha de *Bothrops moojeni*

COX-1 – ciclo-oxigenase-1

DEAE - dietilaminoetil

DFP - diisopropilfluorfosfato

ECM - matriz extracelular

EDTA - ácido etilenodiaminotetracético

FT - Fator Tecidual

FvW - Fator de von Willebrand

GP - glicoproteína

HPLC - Cromatografia líquida de alta eficiência, do inglês: High performance liquid chromatography

i.m. - intramuscular

i.p. - intraperitoneal

KGD - lisina-glicina-ácido aspártico

KTS - lisina-treonina-serina

LAO - L-aminoácido oxidase

MLD - metionina-leucina-ácido aspártico

MGD - metionina-glicina-ácido aspártico

NO - óxido nítrico

PAGE - eletroforese em gel de poliacrilamida

PLA₂ - fosfolipase A₂

PMSF - fluoreto de fenilmetilsulfonil

PPP - plasma pobre em plaquetas

PRP - plasma rico em plaquetas

RGD - arginina-glicina-ácido aspártico

RTS - arginina-treonina-serina

SDS - dodecil sulfato de sódio

SVMPs - metaloproteases de peçonhas de serpente, do inglês: Snake Venom Metalloproteinases

Tris - tris(hidroximetil)aminometano

TxA₂ - tromboxano A₂

VGD - valina-glicina-ácido aspártico

WGD - triptofano-glicina-ácido aspártico

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Serpentes brasileiras	1
1.2	Acidente botrópico.....	3
1.3	Peçonhas de serpentes.....	4
1.3.1	Serino proteases de peçonhas de serpentes.....	5
1.3.2	Metaloproteases de peçonhas de serpente (SVMPs).....	6
1.4	Hemostasia.....	9
1.4.1	Agregação plaquetária	10
1.5	Metaloproteases/desintegrinas e a agregação plaquetária.....	13
1.6	Objetivos.....	18
1.6.1	Objetivo Geral	18
1.6.2	Objetivos Específicos	18
2	MATERIAL E MÉTODOS	19
2.1	Obtenção da peçonha bruta de <i>Bothrops moojeni</i>	19
2.2	Animais.....	19
2.3	Obtenção do sangue humano	19
2.4	Purificação da protease BmooMP α -II da peçonha bruta de <i>B. moojeni</i>	20
2.4.1	Cromatografia de troca iônica da peçonha bruta de <i>B. moojeni</i> em resina DEAE Sephacel.....	20
2.4.2	Cromatografia de exclusão molecular da fração DS7	20
2.5	Eletroforese em gel de poliacrilamida com agentes desnaturantes.....	20
2.6	Determinação quantitativa de proteínas.....	21
2.7	Ensaio enzimáticos e biológicos	21
2.7.1	Atividade caseinolítica	21
2.7.2	Atividade fibrinogenolítica.....	22
2.7.2.1	Influência de inibidores sobre atividade fibrinogenolítica	22
2.7.2.2	Influência do pH sobre atividade fibrinogenolítica	22
2.7.2.3	Influência da temperatura sobre a atividade fibrinogenolítica	23
2.7.3	Atividade hemorrágica	23

2.7.4	Avaliação das alterações histológicas induzidas pela enzima BmooMP α -II	23
2.7.5	Avaliação da hiperalgesia	24
2.7.6	Avaliação da formação de edema	24
2.7.7	Atividade anticoagulante <i>in vivo</i>	25
2.7.8	Atividade coagulante <i>in vitro</i>	25
2.7.9	Ensaio de inibição da agregação plaquetária.....	25
2.8	Análises estatísticas	26
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	27
3.1	Purificação da protease BmooMP α -II da peçonha bruta de <i>B. moojeni</i>	27
3.2	Ensaio enzimáticos e biológicos	30
4	CONCLUSÃO	45
5	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	46

1 INTRODUÇÃO

Os organismos peçonhentos compreendem mais de 100.000 espécies distribuídas entre os principais filos animais como cordados, equinodermos, moluscos, anelídeos, artrópodes e cnidários (CALVETE, 2009). Cada peçonha consiste em um coquetel único de peptídeos e proteínas. Essas toxinas são capazes de perturbar a atividade de enzimas críticas, receptores, ou canais iônicos, causando um desarranjo no sistema nervoso central e periférico, nos sistemas cardiovascular e neuromuscular, na coagulação do sangue e na homeostase (EDITORIAL, 2006; CALVETE, 2009). A peçonha provém uma variedade de vantagens ao animal, incluindo a capacidade de digerir a presa eficientemente e a defesa contra predadores (EDITORIAL, 2006).

Os acidentes causados por animais peçonhentos ocorrem em todo o mundo, mas são particularmente importantes nas regiões tropicais e subtropicais, devido ao grande número de espécies peçonhentas e ao estilo de vida rural da população. As espécies mais importantes são as de serpentes, escorpiões, aranhas e cnidários (LALLOO, 2005).

1.1 Serpentes brasileiras

As serpentes peçonhentas brasileiras pertencem às famílias Elapidae e Viperidae (CAMPBELL e LAMAR, 1989). A família Viperidae apresenta dentição solenóglifa, na qual o maxilar é reduzido e móvel com presas muito desenvolvidas na região anterior. As presas são canaliculadas e ligadas através de ductos a glândulas de peçonha (LOCK, 2008; LOPES, 2008). A família Viperidae possui três subfamílias Azemiopinae, Viperinae e Crotalinae. Todas as espécies de viperídeos presentes na América do Sul são crotalíneos (ZUG *et al.*, 2001).

No Brasil, a subfamília Crotalinae possui 28 espécies, incluindo as pertencentes ao gênero *Bothrops* (BÉRNILS, 2010). Uma das principais características do táxon é a presença de fosseta loreal bem desenvolvida (ZUG *et al.*, 2001).

Fenwick *et al.* (2009) propuseram uma análise filogenética de 43 táxons de *Bothrops* (31 espécies), *Bothriopsis* (sete táxons de seis espécies) e *Bothrocophias* (cinco espécies) utilizando uma análise combinada de caracteres morfológicos e moleculares. Segundo a nova proposta, o gênero *Bothrops* está restrito às espécies *B. andianus*, *B. asper*, *B. atrox*, *B. brazili*, *B. caribbaeus*, *B. isabelae*, *B. jararacussu*, *B. lanceolatus*, *B. leucurus*, *B. marajoensis*, *B. venezuelensis*, *B. muriciensis*, *B. osbornei*, *B. pirajai*, *B. punctatus*, *B. sanctaecrucis* e *B. moojeni* (FENWICK *et al.*, 2009).

As serpentes botrópicas são encontradas principalmente em zonas rurais e periferia de grandes cidades. Habitam preferencialmente ambientes úmidos como matas, áreas cultivadas e locais onde haja facilidade de proliferação de roedores. Possuem hábitos noturnos e são agressivas quando ameaçadas (FUNASA, 2001; FRANÇA e MÁLAQUE, 2003). Embora a maioria das serpentes botrópicas apresentem dieta generalista, parece haver uma variação considerável na importância relativa de cada tipo de presa entre as espécies. Entretanto, para a maioria das espécies generalistas, mamíferos, sapos e lagartos são presas que representam mais de 80% da dieta (MARTINS *et al.*, 2002).

A espécie *B. moojeni* (Caiçaca) (Figura 01), descrita por Hoge em 1966, é uma espécie importante, uma vez que desempenha a função de predador generalista, controlando populações de pequenos animais (lacraias, anuros, lagartos, serpentes, aves e mamíferos), alguns deles considerados pragas em áreas de cultivo (MARTINS *et al.*, 2002; NOGUEIRA *et al.*, 2003). A espécie possui tamanho médio e é encontrada em áreas ripárias, incluindo a borda e o interior da mata de galerias e brejos. A serpente *B. moojeni* permanece ativa praticamente ao longo de todos os meses do ano, principalmente durante a noite (SAWAYA *et al.*, 2008). A espécie é vivípara e possui reprodução sazonal (MARTINS *et al.*, 2002; NOGUEIRA *et al.*, 2003). A peçonha dessa serpente possui uma complexa variedade de proteínas com diferentes atividades biológicas que possuem potencial de uso como modelos para o desenvolvimento de novos fármacos (DUTRA, 2008).



Figura 01: *B. moojeni* (foto: M. Martins). FONTE: Sawaya *et al.* (2008).

1.2 Acidente botrópico

Os acidentes ofídicos apresentam importância médica pela frequência com que ocorrem e pela gravidade dos problemas ocasionados. Em geral, sua ocorrência está relacionada a fatores climáticos e aumento da atividade humana no campo (FUNASA, 2001). Os acidentes ofídicos ocorrem principalmente no início e no final do ano, em pessoas do gênero masculino, em trabalhadores rurais, na faixa etária produtiva, atingindo, principalmente, os membros inferiores (BOCHNER e STRUCHINER, 2003).

A fauna ofídica brasileira de interesse médico está representada pelos gêneros *Bothrops*, *Crotalus*, *Lachesis*, *Micrurus*, e por alguns da família *Colubridae*. Cerca de 90% dos acidentes por serpentes peçonhentas são causados por aquelas pertencentes ao gênero *Bothrops*. Quanto à letalidade, o maior índice corresponde ao gênero *Crotalus* com 1,87%, e o menor, ao gênero *Bothrops*, que corresponde a 0,31% (FUNASA, 2001).

A peçonha é inoculada via subcutânea através das presas da serpente. Os componentes da peçonha geralmente atingem a circulação pelos vasos linfáticos, embora as moléculas de baixo peso molecular possam ser absorvidas diretamente nos capilares. O envenenamento causado por serpentes da família *Elapidae* causa mais frequentemente neurotoxicidade, enquanto que por serpentes da família *Viperidae* causam dano tecidual local, choque e distúrbios da coagulação (LALLOO, 2005).

O procedimento terapêutico utilizado no tratamento de acidentes ofídicos é a soroterapia. O soro antiofídico é uma mistura de imunoglobulinas ou anticorpos resultantes da sensibilização de animais (geralmente cavalos) por aplicações sucessivas de doses da peçonha bruta (FUNASA, 2001). O soro utilizado depende da espécie envolvida no acidente. Em

muitas partes do mundo, soros antiofídicos poliespecíficos estão disponíveis para tratamento de acidentes causados pelas espécies mais comuns. A administração, geralmente, é realizada por infusão intravenosa lenta (LALLOO, 2005).

Os sintomas, sinais e gravidade do acidente ofídico dependem de diversos fatores, tais como, a idade e tamanho da vítima; a natureza, localização, profundidade e número de picadas; a motivação da serpente no momento do acidente; a quantidade de peçonha injetada; a espécie e o tamanho da serpente envolvida; as condições das presas e das glândulas de peçonha; a sensibilidade da vítima; os patógenos presentes na boca da serpente e o tratamento (RUSSEL, 1973).

Os acidentes causados por serpentes botrópicas provocam efeitos locais e sistêmicos. As manifestações sistêmicas mais comuns são indução do estado de choque, distúrbios na coagulação sanguínea, alterações cardiovasculares, hemorragias gastrintestinais, náuseas, vômitos e hematúria (RUSSELL, 1979; MEBS e OWNBY, 1990; COSTA *et al.*, 2010a). Quanto aos efeitos locais, causam necrose, edema, infiltração de leucócitos, dor intensa, equimoses e hemorragias no ponto da picada, sintomas evidenciados nas primeiras horas após o acidente (RODRIGUES *et al.*, 2001; TORRES, 2007; NASCIMENTO *et al.*, 2010). A necrose muscular é um efeito local relevante, pois pode resultar em uma perda irreversível da função ou do próprio tecido, havendo a possibilidade de amputação do membro afetado (SOARES *et al.*, 2003; STÁBELI *et al.*, 2006).

Apesar da mortalidade resultante de acidentes por envenenamento botrópico ser reduzida pela soroterapia, os danos locais causados ao tecido não são revertidos pelas antipeçonhas (soros antiofídicos), ainda que estas sejam administradas logo após o acidente (BORKOW *et al.*, 1997; SOARES *et al.*, 2004). Dessa forma, estudos visando uma melhoria na eficácia desse soro têm se intensificado, nos últimos anos.

1.3 Peçonhas de serpentes

As peçonhas de serpentes podem apresentar variações na composição, diferenciando-se entre as famílias, gêneros, espécies e entre indivíduos de uma mesma espécie (CHIPPAUX *et al.*, 1991; FRANCISCHETTI *et al.*, 1998). Essas diferenças intra-específicas são decorrentes de variações geográficas, sexuais, ontogenéticas e sazonais (CHIPPAUX *et al.*, 1991).

As peçonhas ofídicas constituem um conjunto complexo de peptídeos e proteínas (mais de 90% do peso seco), compostos orgânicos com baixo peso molecular e compostos

inorgânicos, como cálcio, cobalto, ferro, fósforo, potássio, magnésio, manganês, sódio e zinco (MARKLAND, 1998; RAMOS e SELISTRE-DE-ARAÚJO, 2006; CALGAROTTO *et al.*, 2008). Serotonina, histamina, aminoácidos, carboidratos, citratos e nucleosídeos são exemplos de componentes orgânicos de baixo peso molecular encontrados nas peçonhas de serpentes (RAMOS e SELISTRE-DE-ARAÚJO, 2006).

Os compostos protéicos presentes na peçonha podem ser peptídeos, compostos enzimáticos, não-enzimáticos ou inibidores enzimáticos. Acetilcolinesterases, ADPases, ATPases, aminotransferases, metaloproteases, serinoproteases, PLA₂, hialuronidases e L-aminoácido oxidases (LAO) são alguns dos componentes enzimáticos presentes na peçonha ofídica (SINGLETERY *et al.*, 2005; RAMOS e SELISTRE-DE-ARAÚJO, 2006; ÂNGULO e LOMONTE, 2009; GOMES *et al.*, 2009; COSTA *et al.*, 2010a). Os componentes não-enzimáticos da peçonha são representados pelos ativadores de proteína C, fatores de crescimento (NGF e VEGF), lectinas, proteínas ligantes do FvW e precursores de peptídeos bioativos (RAMOS e SELISTRE-DE-ARAÚJO, 2006).

As moléculas protéicas podem ser farmacologicamente ativas, induzindo uma grande variedade de efeitos sobre as vítimas dos acidentes (FRANCISCHETTI, 1998). A lesão tecidual local, um dos grandes problemas após acidentes causados por serpentes botrópicas, é uma consequência da ação combinada de vários componentes da peçonha como, por exemplo, PLA₂, proteases, fatores hemorrágicos e de mediadores endógenos liberados pela ação da resposta inflamatória (GUTIÉRREZ e RUCAVADO, 2000; COSTA *et al.*, 2003; ZYCHAR *et al.*, 2010).

As peçonhas botrópicas são ricas em enzimas proteolíticas (proteases), que estão envolvidas em atividades biológicas específicas, como atividade hemorrágica, coagulante e anticoagulante. As proteases são um grupo heterogêneo de proteínas que são classificadas de acordo com a estrutura em serinoproteases e metaloproteases.

1.3.1 Serinoproteases de peçonhas de serpentes

As serinoproteases são abundantes nas peçonhas das serpentes da família Viperidae. Elas são responsáveis por 20% do teor de proteínas totais. As proteases, sozinhas, não são letais, mas contribuem para o efeito tóxico da peçonha quando associadas a outras proteínas (BRAUD *et al.*, 2000).

As enzimas caracterizadas como serinoproteases são definidas por um mecanismo catalítico que inclui um resíduo de serina altamente reativo, que exerce um papel crítico na

reação. O mecanismo consiste na formação de um complexo transitório acil-enzima pelo resíduo de serina, estabilizado pela presença de resíduos de histidina e ácido aspártico dentro do sítio ativo (BARRETT e RAWLINGS, 1995). As serinoproteases são inibidas competitivamente por benzamidina e por p-aminobenzamidina. Essas enzimas também são inibidas por PMSF e DFP, que reagem com o resíduo de serina do sítio ativo da protease, inativando-a irreversivelmente (MATSUI *et al.*, 2000; SERRANO e MAROUN, 2005).

Apesar das características estruturais semelhantes, as serinoproteases de peçonha de serpente apresentam uma grande variedade de atividades farmacológicas. Em geral, essas enzimas afetam determinadas etapas da cascata de coagulação por degradação proteolítica, ativação de componentes sanguíneos específicos, fibrinólise e agregação plaquetária. Foram descritas, por exemplo, serinoproteases ativadoras do fator V, ativadoras de proteína C, ativadoras de protrombina e ativadoras de plasminogênio (SERRANO e MAROUN, 2005).

Algumas serinoproteases apresentam ambas as atividades fibrinogenolítica e fibrinolítica, mas muitas delas clivam especificamente o fibrinogênio, promovendo a coagulação (SERRANO e MAROUN, 2005). As serinoproteases classificadas como *thrombin-like* possuem efeito coagulante *in vitro*, mas anticoagulante *in vivo* e causam uma rápida e eficiente trombólise. Por esse motivo, essas enzimas despertaram interesse para o uso clínico como anticoagulantes e trombolíticos. Estudos promissores sugerem o uso de algumas *thrombin-like* na prevenção e tratamento de desordens trombóticas, sob certas condições, tais como trombose das veias profundas, infarto do miocárdio, doenças vasculares periféricas, isquemia e transplantes de órgãos e cirurgias vasculares, para prevenir a formação de trombos na superfície desses órgãos ou prótese (VERSTRAETE e ZOLDHELYI, 1995; MARSH e WILLIAMS, 2005; OLIVEIRA *et al.*, 2009; COSTA *et al.*, 2010a). Diversas serinoproteases *thrombin-like* têm sido purificadas de peçonhas de serpentes botrópicas, tais como BthT1 de *B. moojeni* (OLIVEIRA, 2001), Leucurobin de *B. leucurus* (MAGALHÃES *et al.*, 2007), BpSP-I de *B. pauloensis* (COSTA *et al.*, 2009), Bhalternin de *Bothrops alternatus* (COSTA *et al.*, 2010a) e TLBm de *B. marajoensis* (VILCA-QUISPE *et al.*, 2010).

1.3.2 Metaloproteases de peçonhas de serpente (SVMPs)

As metaloproteases de peçonhas de serpente constituem um grande grupo de proteases metais-dependentes. Os metais, principalmente os cátions divalentes, como o cálcio e o zinco, desempenham um papel crítico na atividade proteolítica e, conseqüentemente, na atividade biológica dessas proteases (FOX e SERRANO, 2009). Agentes quelantes, tais como

o EDTA e 1,10-fenantrolina, podem inibi-las, eliminando completamente sua atividade enzimática (MARKLAND, 1998; MATSUI *et al.*, 2000).

As SVMPs zinco-dependentes pertencem à família metzincina. Essas enzimas possuem em comum um domínio de ligação de zinco com estruturas muito semelhantes entre si (GUTIÉRREZ e RUCAVADO, 2000). A família metzincina pode ser subdividida nas subfamílias reprotisinas, serralisinas, astacinas e matrixinas (BODE *et al.*, 1993; RA e PARKS, 2007). O sítio ligante de zinco da família metzincina tem uma sequência de aminoácidos comum em todas as subfamílias (HEBXHXBGBXHZ) onde H representa a histidina; E, o ácido glutâmico; G, a glicina; B, um resíduo hidrofóbico; X, um aminoácido qualquer e Z, um aminoácido diferente entre as quatro subfamílias, mas conservado dentro das mesmas (MARKLAND, 1998).

Estudos indicam que as SVMPs são sintetizadas e armazenadas nas glândulas de peçonha como zimogênios. A ativação dessas enzimas pode ocorrer por atividade autocatalítica residual ou pela ação de outras proteases presentes na peçonha (SWENSON e MARKLAND, 2005; RAMOS e SELISTRE-DE-ARAÚJO, 2006).

As SVMPs são classificadas em três classes, PI, PII e PIII (Figura 02), de acordo com a organização de seus multidomínios, considerando a presença ou ausência de domínios não protease observados nos transcritos de mRNA e proteínas isoladas da peçonha. Essa classificação foi proposta por Fox e Serrano (2008) baseando-se em análises proteômicas e transcriptomas.

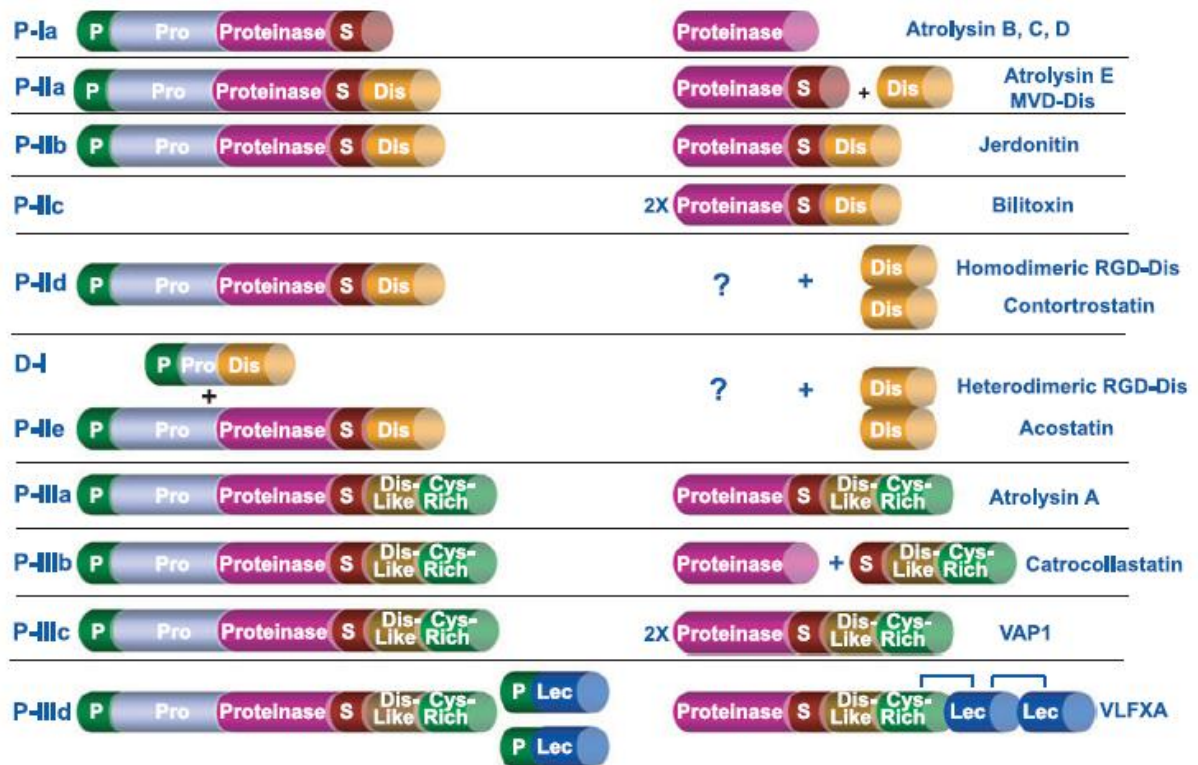


Figura 02: Classificação das SVMPs (FOX e SERRANO, 2008). P: peptídeo sinalizador; Pro: segmento da pró-proteína, removido durante sua ativação; S: sequência HEBXHXBGBXH; Dis: domínio desintegrina; *Dis-like*: domínio semelhante à desintegrina; *Cys-rich*: domínio rico em cisteína; Lec: lectina; (?): produto processado, mas não identificado na peçonha. FONTE: Fox e Serrano (2008).

A classe PI compreende SVMPs compostas somente de um domínio metaloprotease. Essas proteases apresentam uma grande variedade de atividades biológicas, dependentes de suas respectivas estruturas primárias e terciárias. A classe PII inclui enzimas que apresentam o domínio metaloprotease, seguido de um domínio desintegrina. Em muitos casos, o domínio desintegrina é separado do domínio metaloprotease por um processo proteolítico pós-traducional. Destaca-se que ambos os produtos proteolíticos são estáveis, uma vez que têm sido isolados a partir das peçonhas de diversas serpentes (SHIMOKAWA *et al.*, 1996; FOX e SERRANO, 2008). As SVMPs classe PIII são as mais intrigantes das categorias de SVMPs quanto a sua função e contribuição na complexidade da peçonha. As SVMPs PIII possuem um domínio rico em cisteína (*Cys-rich*) em adição aos domínios metaloprotease e *Disintegrin-like*. Conforme mostrado na figura 02, a existência das subclasses de PII (PIIa, PIIb, PIIc, PIIId e PIIe) e PIII (PIIIa, PIIIb, PIIIc e PIIId), reflete o potencial de processamento proteolítico, bem como a formação de estruturas diméricas. A subclasse PIIId compreende enzimas com duas subunidades conectadas por pontes dissulfeto. Uma das subunidades é constituída pelos três domínios característicos das enzimas PIII e a outra por

lectina tipo-C (FOX e SERRANO, 2005; GUTIÉRREZ *et al.*, 2005; FOX e SERRANO, 2008; FOX e SERRANO, 2009).

As SVMPs têm sido apontadas como os principais componentes responsáveis pela hemorragia (MORINE *et al.*, 2008). Estes componentes estão associados aos acidentes ofídicos, causando desde um aumento na permeabilidade até a ruptura do endotélio vascular. As metaloproteases hemorrágicas induzem o sangramento devido à degradação proteolítica de componentes da matriz extracelular, além da degeneração e ruptura das células do endotélio dos vasos sanguíneos (GUTIÉRREZ e RUCAVADO, 2000; GAY *et al.*, 2005). A capacidade de causar hemorragia no local da picada é atribuída a todas as classes de SVMPs (FOX e SERRANO, 2009). As SVMPs PIII são consideradas mais hemorrágicas que as outras SVMPs. Os domínios *Disintegrin-like* e *Cys-rich* podem torná-las mais ativas participando na especificidade proteolítica por direcionar as SVMPs PIII aos substratos adequados nos capilares sanguíneos (GUTIÉRREZ *et al.*, 2005; LU *et al.*, 2005, FOX e SERRANO, 2009). Entretanto, há na literatura SVMPs PIII desprovidas de atividade hemorrágica, como o ativador de protrombina Berythactivase da peçonha de *B. erythromelas* (SILVA *et al.*, 2003), bem como SVMPs das classes PI e PII não hemorrágicas. A presença ou ausência de determinados domínios não denotam necessariamente a capacidade de causar hemorragia.

As SVMPs desempenham um papel importante nos danos teciduais locais e nas alterações sistêmicas decorrentes do envenenamento por viperídeos. Essas proteases induzem além da hemorragia, mionecrose, danos na pele e inflamação, degradam componentes da matriz extracelular e prejudicam a regeneração do músculo esquelético afetado (GUTIÉRREZ e RUCAVADO, 2000). A maioria das atividades funcionais associadas as SVMPs estão relacionadas a distúrbios na hemostasia, exercendo efeitos pró ou anticoagulante. Algumas delas interferem na agregação plaquetária e na cascata de coagulação, causando alterações na resposta hemostática normal (GUTIÉRREZ e RUCAVADO, 2000).

1.4 Hemostasia

O termo hemostasia se refere a um conjunto de processos fisiológicos capaz de manter o sangue em estado fluido e livre de coágulos nos vasos normais e que, em caso de lesão vascular, está pronto para induzir a formação do tampão hemostático rápido e localizado, evitando a hemorragia. O sistema hemostático humano é baseado em uma série de complexas interações envolvendo proteínas do sangue, plaquetas, células endoteliais, e estruturas subendoteliais (MARKLAND, 1998).

Em condições fisiológicas normais, as células endoteliais, que revestem os vasos sanguíneos desempenham um papel essencial na prevenção da ativação intravascular das plaquetas e coagulação. O endotélio vascular proporciona uma superfície não-trombogênica, em decorrência da presença de sulfato de heparan de superfície, um cofator da antitrombina III que, por sua vez, atua como inibidor da formação do trombo. O endotélio também está implicado na limitação do trombo, uma vez que produz prostaglandina (PGI₂) e NO, transforma ADP em adenosina, sintetiza o ativador de plasminogênio tecidual e expressa a trombomodulina, um receptor da trombina. Entretanto, o endotélio também desempenha função ativa na hemostasia, sintetizando e armazenando vários componentes hemostáticos essenciais, como o FvW e o FT (RANG *et al.*, 2004).

A lesão de um vaso sanguíneo desencadeia três importantes mecanismos para controlar a perda de sangue: vasoconstrição, adesão e agregação das plaquetas, e formação da rede de fibrina. O primeiro mecanismo envolve a contração da musculatura lisa da parede do vaso lesionado devido a ação de agentes vasoativos. Em seguida, há a adesão das plaquetas circulantes ao local da lesão e posterior adesão de outras plaquetas às já aderidas, formando o tampão plaquetário. E enfim, a coagulação do sangue ocorre através da ação dos fatores da coagulação, que permite, mediante a formação de uma rede de fibrina, a consolidação do tampão plaquetário, formando um tampão hemostático (RANG *et al.*, 2004).

1.4.1 Agregação plaquetária

As plaquetas são consideradas células incompletas, pois são produzidas a partir da fragmentação do citoplasma de megacariócitos da medula óssea, que podem formar de duas a três mil plaquetas cada um. As plaquetas apresentam aspecto granular e são as menores células do sangue humano medindo cerca de 2-4µm de diâmetro (JURK e KEHREL, 2005).

Durante a lesão vascular as plaquetas são recrutadas da circulação para a matriz subendotelial exposta formando um tampão hemostático para cessar a hemorragia. Dessa forma, desenvolvem um papel central na hemostasia (KAMIGUTI, 2005).

A adesão plaquetária à parede do vaso danificado é a primeira etapa da hemostasia envolvendo a participação das plaquetas. As plaquetas apresentam diversos receptores glicoprotéicos de adesão na superfície de sua membrana que, quando ativados, são responsáveis pela mudança de conformação, adesão ao endotélio e agregação a outras plaquetas. Estes receptores são ativados por diferentes agonistas (KAMIGUTI, 2005).

Dentre os diversos receptores de adesão, o complexo glicoprotéico GPIb/IX/V e a GpVI, que liga a plaqueta respectivamente ao FvW e ao colágeno subendotelial, são os principais responsáveis pela regulação da adesão plaquetária inicial e sua ativação no sangue circulante (ANDREWS e BERNDT, 2004). A ligação do FvW à GPIb/IX/V induz a secreção de ADP, que aumenta a afinidade da integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ pelo FvW (GAWAZ, 2004). O antibiótico ristocetina é capaz de induzir a interação GPIb/IX/V-FvW *in vitro* (JURK e KEHREL, 2005). Diferentemente da GPIb/IX/V, a GPVI atua como mediador da ativação de diferentes receptores adesivos, incluindo as integrinas $\alpha_{IIb}\beta_3$ e $\alpha_2\beta_1$. O receptor GPVI é essencial para a adesão e agregação plaquetária em colágeno imobilizado *in vitro* (GAWAZ, 2004).

O processo de adesão das plaquetas é complexo e depende da tensão de cisalhamento. Sob baixas condições de cisalhamento, as plaquetas aderem predominantemente ao colágeno, fibronectina e laminina através de integrinas β_1 . Em condições de alto cisalhamento, as plaquetas aderem ao FvW através da GPIb, iniciando a ativação plaquetária (MARKLAND, 1998; KAMIGUTI, 2005).

A adesão plaquetária induz rápida transdução de sinais que desencadeia uma série de eventos, como a ativação plaquetária, alterações no citoesqueleto, difusão e secreção do conteúdo granular e ativação de integrinas que sustentarão a adesão e a agregação. A alteração no citoesqueleto das plaquetas ativadas está associada à mudança da forma discóide e prolongamento de pseudópodos (Figura 03), à contração interna e liberação dos constituintes dos grânulos (ANDREWS e BERNDT, 2004; JURK e KEHREL, 2005).

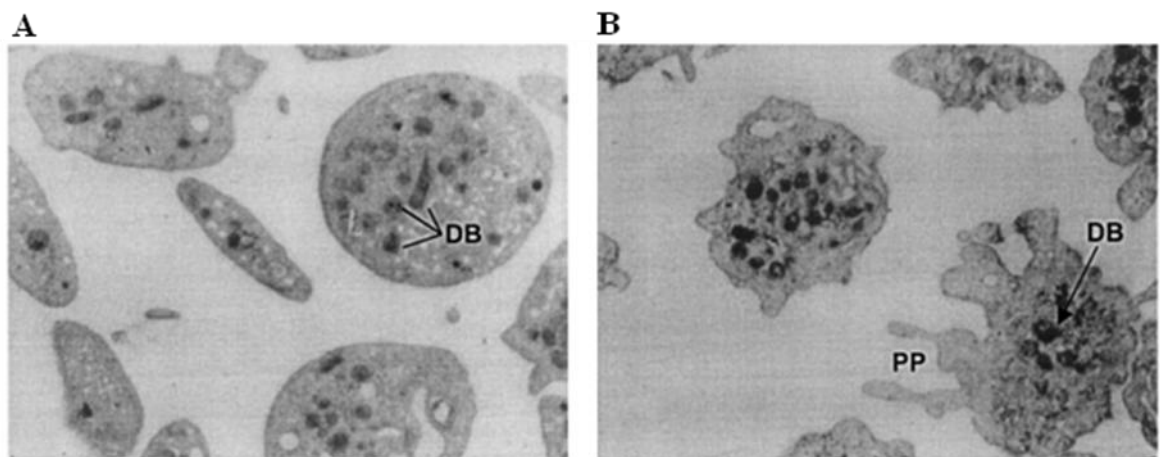


Figura 03: Morfologia das plaquetas humanas (JURK; KEHREL, 2005). A – Plaquetas não ativadas com grânulos uniformemente distribuídos. B – Plaquetas ativadas com formação de pseudópodos e centralização dos grânulos. DB: corpo denso; PP: pseudópodo. FONTE: Jurk e Kehrel (2005).

As integrinas plaquetárias são receptores transmembranares formados por duas subunidades, α e β , associadas por ligações não-covalentes. Estes receptores conectam a ECM ao citoesqueleto do meio intracelular, permitindo interações célula-célula ou célula-matriz (SELISTRE-DE-ARAUJO *et al.*, 2010).

São descritas cinco tipos de subunidades α (α_2 , α_{IIb} , α_V , α_5 , α_6) e dois tipos de subunidades β (β_1 e β_3) que formam as integrinas plaquetárias $\alpha_{IIb}\beta_3$, dominante na superfície das plaquetas, $\alpha_V\beta_3$ (receptor de vitronectina), $\alpha_2\beta_1$ (receptor de colágeno), $\alpha_5\beta_1$ (receptor de fibronectina) e $\alpha_6\beta_1$ (receptor de laminina). As integrinas podem interagir principalmente com a região RGD (arginina-glicina-ácido aspártico) das moléculas ligantes. Também já foram descritas interações de integrinas com outras sequências de aminoácidos homólogas, como VGD (valina-glicina-ácido aspártico), MLD (metionina-leucina-ácido aspártico), MGD (metionina-glicina-ácido aspártico), KGD (lisina-glicina-ácido aspártico), WGD (triptofano-glicina-ácido aspártico), RTS (arginina-treonina-serina) e KTS (lisina-treonina-serina) (CALVETE *et al.*, 2005; BENNETT *et al.*, 2009; NIESWANDT *et al.*, 2009).

As plaquetas ativadas secretam fatores da coagulação, fatores de crescimento, como fator de crescimento derivado das plaquetas, e o conteúdo dos grânulos, incluindo agonistas secundários, como ADP e 5-HT (RANG *et al.*, 2004). O ADP atua via receptores acoplados à proteína G, P2Y₁ e P2Y₁₂, reforçando a agregação plaquetária $\alpha_{IIb}\beta_3$ -dependente. O agonista 5-HT é um potente vasoconstritor que, juntamente com o ADP, amplifica a resposta plaquetária (ANDREWS e BERNDT, 2004; JURK e KEHREL, 2005). Vários produtos de secreção das plaquetas aderidas provocam estímulos adicionais às plaquetas circulantes que são recrutadas para formar agregados (JURK e KEHREL, 2005).

As plaquetas aderidas e ativadas formam TxA₂ a partir do ácido araquidônico pela ação da tromboxano sintase, reforçando o processo de ativação após a liberação no espaço extracelular e ligação ao receptor específico de TxA₂ (TP α e TP β). O TxA₂ também possui atividade vasoconstritora, o que favorece a formação do trombo pela desaceleração do fluxo sanguíneo (GAWAZ, 2004).

A epinefrina atua como agente agonista da agregação plaquetária ativando as plaquetas sem a mudança inicial na conformação, levando à liberação do ácido araquidônico endógeno com formação de TxA₂ e secreção plaquetária (BERNARDI e MOREIRA, 2004).

A ativação das plaquetas induz a exposição de fosfolípídeos ácidos sobre a superfície externa da plaqueta, promovendo a formação de trombina (RANG *et al.*, 2004). A trombina é um potente ativador plaquetário e inicia sua sinalização, em parte, através dos receptores ativados por protease ligados à proteína G (PARs). Estes receptores convertem um

evento de clivagem proteolítica extracelular em um sinal transmembrana. A ativação desses receptores PARs leva a um aumento de Ca^{2+} intracelular que regula muitos eventos que resultam na agregação plaquetária (SAVAGE *et al.*, 2001).

Todos os agonistas excitatórios da plaqueta, exceto a epinefrina, induzem o aumento das concentrações citosólicas de Ca^{2+} , tanto a partir da sua mobilização dos estoques internos (sistema tubular denso) quanto a partir do aumento do influxo de Ca^{2+} do meio extracelular (HOURANI e CUSACK, 1991).

A agregação plaquetária é caracterizada pelo acúmulo de plaquetas em um tampão hemostático. O receptor central da agregação plaquetária, fator chave para a função das plaquetas, é a GPIIb/IIIa (integrina $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$). Isso porque a interação plaqueta-plaqueta é iniciada pela ligação do fibrinogênio ou ligantes contendo a sequência de aminoácidos RGD à integrina $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ ativada, que então gera sinais, resultando na formação de agregados irreversíveis. Independentemente do estímulo inicial, o bloqueio da integrina $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ impede a agregação entre plaquetas via fibrinogênio e, portanto, a formação de agregados irreversíveis. Somente o estímulo das plaquetas leva ao aumento de moléculas de GPIIb/IIIa via secreção dos grânulos e à ativação das GPIIb/IIIa expostas na superfície, permitindo a ligação de ligantes solúveis (JURK e KEHREL, 2005; KAMIGUTI, 2005).

A mesma sequência de eventos que leva a formação do trombo na hemostasia normal, resulta em doenças trombóticas. A ruptura da placa aterosclerótica, expondo a matriz fibrosa subjacente pode levar à formação do trombo mediado pelas interações GPIb/IX/V-FvW e GPVI-colágeno. Além disso, o estresse de cisalhamento patológico em uma artéria obstruída pode induzir a ligação do receptor GPIb/IX/V ao FvW, iniciando a agregação dependente da integrina $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$. A mudança da integrina $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ a partir de um estado de baixa para uma alta afinidade é considerada a via final da ativação plaquetária. O trombo formado pode então bloquear o fluxo sanguíneo no cérebro ou coração, causando acidente vascular encefálico ou infarto agudo do miocárdio (ANDREWS e BERNDT, 2004; GAWAZ, 2004).

1.5 Metaloproteases/desintegrinas e a agregação plaquetária

As peçonhas de serpentes da família Viperidae apresentam potentes ativadores e inibidores da função plaquetária (MARKLAND, 1998; KAMIGUTI, 2005). Essas peçonhas contêm uma grande variedade de metaloproteases que são altamente tóxicas, cujo efeito biológico mais estudado é a interferência no sistema hemostático (MATSUI *et al.*, 2000; RAMOS e SELISTRE-DE-ARAÚJO, 2006). As SVMPs apresentam ampla especificidade de

substrato, sendo capazes de degradar proteínas envolvidas na hemostasia e digerir glicoproteínas presentes nas membranas das plaquetas e seus ligantes (MARSH e WILLIAMS, 2005; RAMOS e SELISTRE-DE-ARAÚJO, 2006).

As SVMPs são enzimas que degradam o fibrinogênio e ou fibrina. Elas podem ser classificadas como α -fibrinogenases e β -fibrinogenases, dependendo da especificidade de hidrólise das cadeias do fibrinogênio. A maioria das SVMPs são enzimas fibrin(ogen)olíticas, clivando preferencialmente a cadeia A α e, com menor atividade, a cadeia B β do fibrinogênio (MARKLAND, 1998). Como o fibrinogênio tem a função de principal ligante da integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$, a inibição da agregação plaquetária por SVMPs poderia ser atribuída a sua degradação. Entretanto, a clivagem das cadeias A α e B- β pelas α -fibrinogenases não afeta a agregação plaquetária porque é a cadeia γ que contém o mais importante sítio de ligação às plaquetas (KAMIGUTI, 2005).

Embora diversas SVMPs terem sido identificadas por seu efeito antagonista aos receptores plaquetários, os domínios funcionais das SVMPs, bem como os mecanismos moleculares envolvidos em muitas dessas interações ainda não foram determinados (DU *et al.*, 2006). Algumas SVMPs afetam a agregação plaquetária via GPIb, subunidade do complexo GPIb/IX/V (ANDREWS e BERNDT, 2004; WIJEYEWICKREMA *et al.*, 2005; DU *et al.*, 2006).

A atividade inibitória da agregação plaquetária induzida por colágeno das SVMPs parece ser primariamente induzida pela interação com a integrina plaquetária $\alpha_2\beta_1$ (KAMIGUTI, 2005). Até o momento, não há evidências de que a inibição da agregação plaquetária induzida pelo colágeno ocorra pela interação da SVMP com o receptor GPVI. A Alborhagin, por exemplo, é uma SVMP purificada da peçonha de *Trimeresurus albolabris* que interage com a GPVI, atuando como um potente ativador da função plaquetária (ANDREWS *et al.*, 2001). Apesar da atividade proteolítica da Alborhagin não ser um fator crítico para a ativação plaquetária dependente da GPVI, o domínio metaloprotease está envolvido no reconhecimento e sinalização (WIJEYEWICKREMA *et al.*, 2005). As proteínas que atuam como ativadores da função plaquetária via GPVI, como a Alborhagin, podem ser utilizadas para isolamento, caracterização e investigação de mecanismos de sinalização desse importante receptor (DU *et al.*, 2002).

As desintegrinas, uma família de pequenos polipeptídeos (40-100 aminoácidos) ricos em cisteína, são inibidores não-enzimáticos comuns da agregação plaquetária (KAMIGUTI *et al.*, 1998; BRAUD *et al.*, 2000; EBLE, 2010). A família das desintegrinas pode ser dividida em cinco grupos diferentes de acordo com o comprimento e o número de

pontes dissulfeto dos polipeptídeos (CALVETE *et al.*, 2003). A primeira subfamília inclui desintegrinas curtas compostas de 41-51 resíduos e quatro pontes dissulfeto. O segundo grupo é formado por desintegrinas de tamanho médio que contêm cerca de 70 resíduos de aminoácidos e seis pontes dissulfeto. Outro grupo inclui as desintegrinas com cerca de 84 resíduos e sete pontes dissulfeto. A quarta subfamília, por sua vez, compreende o domínio *disintegrin-like* das SVMPs da classe PIII. Essas desintegrinas apresentam aproximadamente 100 resíduos de aminoácidos e oito pontes dissulfeto. Diferentemente dos demais grupos que são moléculas de cadeia simples, o quinto grupo de desintegrinas é composto por homo e heterodímeros (CALVETE *et al.*, 2005).

A maioria das desintegrinas é liberada de precursores das SVMPs PII (RAMOS e SELISTRE-DE-ARAÚJO, 2006). A inibição de integrinas pelas desintegrinas depende do pareamento adequado dos resíduos de cisteína que determinam a conformação da alça inibitória, cujo ápice contém uma sequência RGD (Figura 04) ou sequências homólogas (como citado anteriormente) (CALVETE *et al.*, 2003; EBLE, 2010).

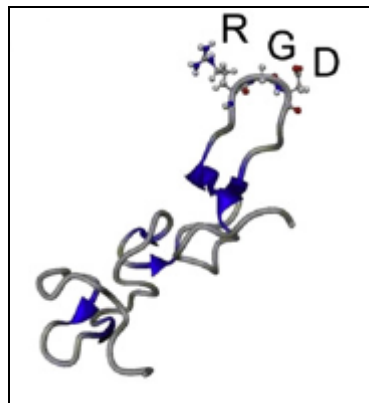


Figura 04: Estrutura molecular da desintegrina Rhodostomin da peçonha de *Calloselasma rhodostoma*, que possui a sequência RGD na alça de ligação à integrina. Esta sequência RGD se liga à integrina plaquetária $\alpha_{IIb}\beta_3$ (EBLE, 2010). FONTE: adaptado de Eble (2010).

As desintegrinas que possuem a sequência de aminoácidos RGD, KGD ou WGD se ligam especificamente à integrina plaquetária $\alpha_{IIb}\beta_3$, bloqueando a ligação do fibrinogênio a esse receptor e, conseqüentemente, resulta na inibição da agregação plaquetária (CALVETE *et al.*, 2005).

Diversos fármacos antiplaquetários derivados de toxinas de peçonhas de serpentes estão em avanço clínico. O Eptifibatide é um exemplo de fármaco utilizado no tratamento de trombose e outras doenças cardiovasculares. Trata-se de um peptídeo cíclico baseado na sequência KGD da desintegrina Barbourin purificada da peçonha da serpente *Sistrurus*

miliarius barbouri. O Eptifibatide bloqueia especificamente a integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ (SCARBOROUGH *et al.*, 1991; TOPOL *et al.*, 1999).

Algumas desintegrinas também possuem atividade antitumoral por serem capazes de inibir a migração celular de tumores, a metástase e a angiogênese dependentes de integrinas. Resíduos adjacentes à sequência RGD (ou outra), a estrutura tridimensional, a estrutura da região C-terminal e o padrão de pontes dissulfeto das desintegrinas parecem interferir com a especificidade de ligação dessas moléculas às integrinas (COMINETTI, 2004).

A adesão mediada por integrinas é crucial para a metástase de tumores. As interações entre células tumorais e plaquetas podem contribuir para etapas críticas na cascata metastática, uma vez que as plaquetas facilitam a adesão e retenção das células tumorais na parede do vaso sanguíneo sob condições de cisalhamento relativamente altas. Essas interações são mediadas por GPIIb-IIIa plaquetária e integrinas α_v nas células tumorais independentemente da natureza da subunidade β , como por exemplo, integrinas $\alpha_v\beta_3$ expressas em células de câncer de mama agressivo (DARDIK *et al.*, 1997; FELDING-HABERMANN, 2003).

Há na literatura diversos relatos de metaloproteases e desintegrinas derivadas de peçonhas de serpentes que apresentam capacidade de inibir a adesão, migração, proliferação e progressão do câncer *in vivo* (RÁDIS-BAPTISTA, 2005). A desintegrina Contortrostatin, por exemplo, inibe a disseminação do câncer de ovário humano. Essa desintegrina é capaz de bloquear a adesão das células da linhagem OVCAR-5 a proteínas da matriz extracelular e inibir a invasão das células tumorais (MARKLAND *et al.*, 2001). Outro exemplo de desintegrina é a Rhodostomin, que pode inibir a adesão, migração e invasão de células de carcinoma de mama e próstata. Essa proteína inibe especificamente a ligação de anticorpos monoclonais (MoAb) 7E3, que reconhecem a integrina $\alpha_v\beta_3$ para as células tumorais (YANG *et al.*, 2005). Resultados promissores foram apresentados por Zhu *et al.* (2010) referentes à recombinante da Jerdonitin, uma SVMP PII da peçonha da serpente *Trimeresurus jerdonii*. Essa SVMP recombinante apresenta capacidade de inibição do crescimento de várias linhagens de células tumorais humanas, incluindo de câncer de fígado (Bel7402), de leucemia (K562) e de carcinoma gástrico (BGC823).

A interferência de toxinas presentes em peçonhas de serpentes ocorre, muitas vezes, devido a características únicas de atividade enzimática, estrutura e ligação. Em suma, as toxinas, tais como as desintegrinas e metaloproteases de peçonhas de serpentes são ferramentas importantes para estudos básicos de hemostasia, principalmente relativos à

função plaquetária e de desenvolvimento e metástase de células tumorais, bem como apresentam potencial terapêutico. Certamente, o avanço nas investigações sobre a constituição bioquímica das peçonhas conduzirá a descobertas promissoras para a terapêutica antiplaquetária (antitrombótica) e antitumoral.

1.6 Objetivos

1.6.1 Objetivo Geral

Purificar e caracterizar uma nova metaloprotease da peçonha da serpente *B. moojeni* e estudar seus efeitos enzimáticos e não enzimáticos sobre a agregação plaquetária.

1.6.2 Objetivos Específicos

- Purificar uma metaloprotease da peçonha de *B. moojeni*, utilizando cromatografias de troca iônica e exclusão molecular;
- Caracterizar quimicamente a metaloprotease purificada quanto a determinação de sua massa molecular por SDS-PAGE;
- Caracterizar os principais efeitos biológicos/enzimáticos causados pela metaloprotease purificada, tais como: atividade proteolítica sobre a caseína e fibrinogênio bovino, atividades coagulante, anticoagulante *in vivo* e hemorrágica;
- Avaliar os efeitos de inibidores de proteases e a estabilidade catalítica da metaloprotease purificada;
- Avaliar as alterações histológicas induzidas pela protease purificada;
- Avaliar a indução de dor e edema pela protease purificada;
- Avaliar a interferência da metaloprotease purificada sobre a agregação plaquetária de plasma humano.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Obtenção da peçonha bruta de *Bothrops moojeni*

A peçonha bruta de *B. moojeni* foi fornecida pelo Serpentário Bioagents, Batatais-São Paulo, sob responsabilidade da bióloga Alexandra Jardim Sandrin. Após a coleta, as peçonhas foram imediatamente dessecadas a vácuo em temperatura ambiente e conservadas a -20°C até o momento do uso.

2.2 Animais

36 camundongos machos Swiss (20-25g) e 12 ratos machos Wistar (200-250g) foram mantidos em condições controladas de temperatura ($22 \pm 2^{\circ}\text{C}$), umidade relativa (60-70%), ciclo automático claro/escuro (12 horas) e com livre acesso à água e ração.

Os experimentos foram realizados em conformidade com as diretrizes atuais para os cuidados de animais de laboratório e as orientações éticas para investigações com consciência animal, estabelecidas pelo Comitê de Ética na Utilização de Animais da Universidade Federal de Uberlândia (CEUA/UFU), Minas Gerais, Brasil (Protocolo n° 028/09).

2.3 Obtenção do sangue humano

Os experimentos foram realizados em conformidade com as diretrizes atuais para investigações com seres humanos, estabelecidas pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal de Uberlândia (CEP/UFU), Minas Gerais, Brasil (Protocolo n° 055/11).

O sangue foi obtido pela doação de sangue de 10 sujeitos que foram convidados a participarem da pesquisa como doadores voluntários. Os critérios para a seleção dos doadores voluntários foram: não apresentar sinais ou sintomas de doença, desidratação ou desnutrição, estar entre 18 e 65 anos, pesar mais que 50kg, não estar utilizando nenhum tipo de medicamento que interfira na hemostasia, não utilizar drogas ilícitas, não ter ingerido bebidas alcoólicas nas últimas 24 horas que antecediam o experimento e não apresentar qualquer distúrbio na hemostasia.

2.4 Purificação da protease BmooMP α -II da peçonha bruta de *B. moojeni*

2.4.1 Cromatografia de troca iônica da peçonha bruta de *B. moojeni* em resina DEAE Sephacel

O fracionamento da peçonha bruta de *B. moojeni* foi realizado conforme técnicas descritas por Oliveira (2001) com algumas modificações. Cerca de 400mg da peçonha bruta foram dissolvidos em 4,0mL de tampão bicarbonato de amônio (AMBIC) 0,05M, pH=7,8, centrifugados a 10.000g por 10 minutos à temperatura ambiente e aplicados a uma coluna de cromatografia (2,5 x 20cm) contendo a resina DEAE Sephacel. As amostras foram eluídas em gradiente de concentração de AMBIC (0,05M – 0,6M), utilizando uma câmara de mistura com volume de 150mL. As frações, contendo 3,0mL cada, foram coletadas em um fluxo de 20,0mL/hora por um coletor de frações (modelo 2110, Bio Rad, EUA). A absorbância de cada fração foi acompanhada à 280nm, em um espectrofotômetro (BioSpec-mini, Shimadzu Biotech, Japão). Em seguida, o gráfico foi construído, as amostras delimitadas, reunidas em 'pools', dosadas, liofilizadas e armazenadas à -20°C. A sétima fração obtida, denominada DS7, foi submetida a outro passo de purificação.

2.4.2 Cromatografia de exclusão molecular da fração DS7

A fração DS7 foi submetida a um segundo passo de purificação em resina de exclusão molecular HiPrepTM 26/60 SephacrylTM S-300 em sistema HPLC - ÄKTApurifierTM 10 (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Suécia). A coluna foi equilibrada e as amostras eluídas em AMBIC 0,05M, pH=7,8. As frações, contendo 2,0mL cada, foram coletadas em um fluxo de 30,0mL/hora. A absorbância de cada fração foi acompanhada à 280nm.

2.5 Eletroforese em gel de poliacrilamida com agentes desnaturantes

A eletroforese em gel de poliacrilamida a 14%, na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), foi realizada conforme a técnica descrita por Laemmli (1970). Foi utilizado um gel de empilhamento a 5% em pH=6,8, contendo Tris-HCl 0,125M e SDS 0,1% e um gel de separação a 14% em pH=8,8 e SDS 0,1%, mantendo a relação acrilamida:bis-acrilamida de 30:0,8 (m/m).

Amostras de proteínas foram dissolvidas em tampão Tris-HCl 0,0625M, pH=6,8, contendo 10% (m/v) de β -mercaptoetanol, 10% (v/v) de glicerol, 0,2% (m/v) de SDS e 0,001% (m/v) de azul de bromofenol como corante. As amostras preparadas foram incubadas durante 3 a 5 minutos em água fervente. Em seguida, cerca de 5 a 30 μ L de amostra foram aplicados no gel. Paralelamente foi aplicado no gel o padrão de peso molecular LMW (Low Molecular Weight) — fosforilase b (97.000), albumina bovina (66.000), ovoalbumina (45.000), anidrase carbônica (30.000), inibidor de tripsina (20.100) e α -lactoalbumina (14.400), dissolvido no mesmo tampão.

As proteínas e os géis foram corados por 15 minutos em uma solução de Coomassie Blue R-250 a 0,2% (m/v) dissolvido em água: metanol: ácido acético (4:5:1 v/v). Os géis foram descorados em uma solução contendo água: etanol: ácido acético (6:3:1 v/v).

O peso molecular da enzima purificada foi estimado pelo software de análise de imagem Kodak 1D.

2.6 Determinação quantitativa de proteínas

As proteínas utilizadas no trabalho foram quantificadas através do Método do Microbiureto, conforme descrito por Itzhaki e Gill (1964). Soluções contendo de 0,1 a 2,0mg de proteínas foram submetidas à dosagem. Para estimar a curva padrão foi utilizada a albumina do soro bovino. As amostras de proteínas foram completadas para o volume de 1,0mL com água, aos quais foram acrescentados 500 μ L das soluções previamente preparadas R1 (0,21% $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ dissolvido em NaOH 30,4%) ou R2 (NaOH a 30%). A seguir, foi realizada a leitura em espectrofotômetro BioSpec-mini (Shimadzu Biotech, Japão) a 310nm, contra um branco sem proteína, e calculada a concentração da amostra.

2.7 Ensaio enzimáticos e biológicos

2.7.1 Atividade caseinolítica

A atividade proteolítica sobre a caseína foi analisada em SDS-PAGE 14%. 25 μ L da solução de caseína (10mg/mL) em Tris/HCl 50 mM, pH=7,8, NaCl 150 mM, previamente filtrada, foram incubados com 10 μ g da enzima BmooMP α -II à 37°C por diferentes intervalos de tempo (0, 15, 30, 60 e 120 minutos). As amostras foram reduzidas e desnaturadas pela adição de 25 μ L de Tris-HCl 0,0625M, pH=6,8, contendo 10% (m/v) de β -mercaptoetanol,

10% (v/v) de glicerol, 0,2% (m/v) de SDS e 0,001% (m/v) de azul de bromofenol como corante. Os produtos da reação foram analisados em SDS-PAGE 14% como descrito no item 2.5.

2.7.2 Atividade fibrinogenolítica

A atividade proteolítica sobre o fibrinogênio foi realizada como descrito por Rodrigues *et al.* (2000), com algumas modificações. Amostras de 25 μ L de fibrinogênio bovino (3mg/mL) em solução salina foram incubados com 10 μ g da enzima BmooMP α -II à 37°C por diferentes intervalos de tempo (0, 15, 30, 60 e 120 minutos). A reação foi interrompida pela adição de 25 μ L de Tris-HCl 0,0625M, pH=6,8, contendo 10% (m/v) de β -mercaptoetanol, 10% (v/v) de glicerol, 0,2% (m/v) de SDS e 0,001% (m/v) de azul de bromofenol como corante. Os produtos da reação foram analisados em SDS-PAGE 14% como descrito no item 2.5.

2.7.2.1 Influência de inibidores sobre atividade fibrinogenolítica

A inibição da atividade fibrinogenolítica foi determinada pela pré-incubação da enzima BmooMP α -II à 37°C por 15 minutos com o agente redutor β -mercaptoetanol (5mM) ou com um dos seguintes inibidores de proteases: EDTA (5mM), 1,10-fenantrolina (5mM), aprotinina (5mM), benzamidina (5mM) ou leupeptina (5mM). Em seguida, as amostras tratadas foram adicionadas ao fibrinogênio bovino e incubados por 60 minutos. A atividade fibrinogenolítica foi realizada conforme descrito no item 2.7.2.

2.7.2.2 Influência do pH sobre atividade fibrinogenolítica

A influência do pH sobre a atividade fibrinogenolítica foi avaliada pela pré-incubação de 10 μ g da enzima BmooMP α -II em tampões de diferentes pHs (tampão acetato de sódio 0,2 M, pH=4 e 5; fosfato de sódio 0,2 M, pH=6 e 7; Tris-HCl 0,2 M, pH=8 e 9; borato de sódio 0,2 M, pH=10) por 15 minutos à 37°C. Em seguida, as amostras pré-incubadas foram adicionadas ao fibrinogênio bovino e incubados por 60 minutos. A atividade fibrinogenolítica foi realizada conforme descrito no item 2.7.2.

2.7.2.3 Influência da temperatura sobre a atividade fibrinogenolítica

A influência da temperatura sobre a atividade fibrinogenolítica foi avaliada pré-incubando 10µg da enzima BmooMPα-II por 15 minutos em diferentes temperaturas (30, 40, 50, 60, 70, 80 e 90°C). Em seguida, as amostras pré-incubadas foram adicionadas ao fibrinogênio bovino e incubados por 60 minutos. A atividade foi realizada conforme descrito no item 2.7.2.

2.7.3 Atividade hemorrágica

A atividade hemorrágica foi realizada conforme a metodologia descrita por Nikai *et al.* (1984) com algumas modificações. Cerca 100µg da enzima BmooMPα-II em solução salina (volume final de 100µL) foram injetados por via subcutânea no dorso de camundongos Swiss machos (n=3). O grupo de animais controle negativo recebeu injeção de 100µL de solução salina estéril. Após 3 horas, os animais foram sacrificados com o aprofundamento de anestesia (cetamina/xilazina), as peles foram removidas e observada a presença de halos hemorrágicos na face interna.

2.7.4 Avaliação das alterações histológicas induzidas pela enzima BmooMPα-II

A caracterização das alterações histológicas sistêmicas induzidas pela enzima BmooMPα-II foi realizada como descrito por Costa *et al.* (2010a), com algumas modificações. A análise foi realizada em cortes histológicos de órgãos de camundongos Swiss machos (n=4) que receberam injeções via i.p. da enzima BmooMPα-II (50µg), da peçonha bruta de *B. moojeni* (50µg) ou de 100µL de solução salina estéril.

A atividade miotóxica induzida pela enzima BmooMPα-II foi realizada como descrito por Rodrigues *et al.* (2001), com algumas modificações. A análise foi realizada em cortes histológicos dos músculos gastrocnêmios direitos de camundongos Swiss machos (n=4) que receberam injeções via i.m. da enzima BmooMPα-II (50µg), da peçonha bruta de *B. moojeni* (50µg) ou de 50µL de solução salina estéril.

Após 24 horas, os animais foram sacrificados com o aprofundamento de anestesia (cetamina/xilazina) e os órgãos (coração, rins, fígado, pulmões e músculo gastrocnêmio direito) foram dissecados. Os tecidos foram, então, fixados em uma solução de formol a 10%

(v/v), por 24 horas. As peças foram desidratadas com concentrações crescentes de etanol (70 a 100%), diafanizadas em xilol e então processadas para a inclusão em parafina. Os blocos obtidos foram cortados com o auxílio de um micrótomo. Os cortes com cerca de 5,0 μ m de espessura foram corados com hematoxilina/eosina, montados em lâmina e lamínula, examinados ao microscópio de luz e fotografados.

2.7.5 Avaliação da hiperalgesia

A medida da hiperalgesia foi realizada pelo método de retirada da pata do rato submetida à compressão descrito por Randall e Selitto (1957), com algumas modificações. A massa em gramas (g) necessária para provocar uma resposta nociceptiva, flexão da pata, foi determinada como o limiar nociceptivo. O valor de 300g foi utilizado como limiar máximo para evitar danos às patas. A hiperalgesia foi induzida por injeção intraplantar da enzima BmooMP α -II (15, 50 e 75 μ g) na pata posterior direita dos ratos Wistar (n=4). O mesmo volume de solução salina estéril foi injetado na pata posterior esquerda para o controle negativo. O limiar nociceptivo foi medido antes e 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 24 horas após a injeção da BmooMP α -II utilizando um aparelho analgesímetro Randall Sellito (modelo EFF-440, Insight, Brasil). Os resultados foram calculados como a diferença do limiar nociceptivo entre as duas patas e expressos em porcentagem de alteração do limiar nociceptivo em relação ao limiar inicial.

2.7.6 Avaliação da formação de edema

O edema foi induzido por injeção intraplantar da enzima BmooMP α -II (15, 50 e 75 μ g) na pata posterior direita dos ratos Wistar (n=4). O mesmo volume de solução salina estéril foi injetado na pata posterior esquerda para o controle negativo. Os volumes de ambas as patas foram medidos utilizando o aparelho pletismômetro (modelo 7140, Ugo Basile, Itália) antes e 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 24 horas após a injeção. Os resultados foram calculados como a diferença de volume entre as duas patas e expressos em porcentagem do aumento do volume da pata em relação ao volume inicial.

2.7.7 Atividade anticoagulante *in vivo*

O ensaio anticoagulante *in vivo* foi realizado segundo o método descrito por Gene *et al.* (1989), com algumas modificações. Cerca de 100µg da enzima BmooMPα-II em solução salina estéril (volume final de 100µL) foram injetados via i.p. em camundongos Swiss machos (n=3). O mesmo volume de solução salina estéril foi injetado no grupo de animais controle negativo. Após uma hora, os animais foram sacrificados com o aprofundamento de anestesia (cetamina/xilazina) e o sangue foi coletado por punção cardíaca. O sangue foi colocado em tubos de ensaio e mantidos à 25-30°C até que ocorresse a formação de um coágulo visível macroscopicamente. A atividade foi determinada medindo-se o tempo decorrido até o início da coagulação do sangue.

2.7.8 Atividade coagulante *in vitro*

A atividade coagulante sobre o plasma bovino foi realizada como descrito por Oliveira *et al.* (2001). O plasma bovino coletado na presença de citrato de sódio foi fornecido pelo professor Dr. Antonio Vicente Mundim do Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Veterinário da Universidade Federal de Uberlândia. Cerca de 10µg da enzima BmooMPα-II em 10µL de solução salina foram adicionados a 200µL de plasma bovino e incubados à 37°C. Os experimentos controle positivo foram realizados adicionando cloreto de cálcio 0,2M ao plasma. Os experimentos controle negativo foram realizados adicionando apenas solução salina. As amostras foram mantidas em constante e leve agitação. O tempo necessário para o início da formação da rede de fibrina foi registrado e comparado com os grupos controle positivo e negativo. A extensão do tempo de coagulação para mais de 240 segundos foi considerado como amostra não-coagulante. Cada teste foi realizado em triplicata.

2.7.9 Ensaio de inibição da agregação plaquetária

O PRP foi preparado como descrito por Sanchez *et al.* (2010), com algumas modificações. O *pool* de sangue humano coletado na presença de citrato de sódio foi centrifugado a 100g durante 12 minutos a temperatura ambiente. O PPP foi obtido nas mesmas condições, porém a centrifugação foi realizada a 1000g por 15 minutos.

A agregação foi medida utilizando o Agregômetro automático de 4 canais (AggRAMTM versão 1.1, Helena Laboratories, EUA). Os ensaios de inibição da agregação

plaquetária foram realizados a 37°C em cubeta de vidro siliconizada, usando 200µL de PRP, mantidos sob agitação constante. Diferentes doses da enzima BmooMPα-II (20, 40 e 80µg) foram adicionadas ao PRP e, em seguida, foram adicionados os seguintes agonistas plaquetários: ADP (20µM), colágeno (10µg/mL), ristocetina (1mg/mL) e epinefrina (300µM).

A fim de avaliar a relevância da atividade proteolítica da enzima na inibição da agregação plaquetária, 80µg da enzima foram pré-incubados por 15 minutos a 100°C antes da adição ao PRP.

As curvas resultantes dos ensaios foram expressas em porcentagem de agregação em relação à absorbância do PPP, que representa 100% de agregação. Experimentos controle foram realizados usando apenas agonistas plaquetários. Os ensaios foram realizados em triplicatas.

2.8 Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas pelo teste ANOVA no programa GraphPad Prism, versão 5.01. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Purificação da protease BmooMP α -II da peçonha bruta de *B. moojeni*

No presente trabalho, uma nova metaloprotease foi purificada por dois passos cromatográficos: uma combinação de cromatografia de troca iônica e exclusão molecular. O fracionamento da peçonha bruta de *B. moojeni* em resina de troca iônica (DEAE Sephacel) resultou em oito frações principais, denominadas DS1, DS2, DS3, DS4, DS5, DS6, DS7 e DS8. O perfil cromatográfico é mostrado na figura 05.

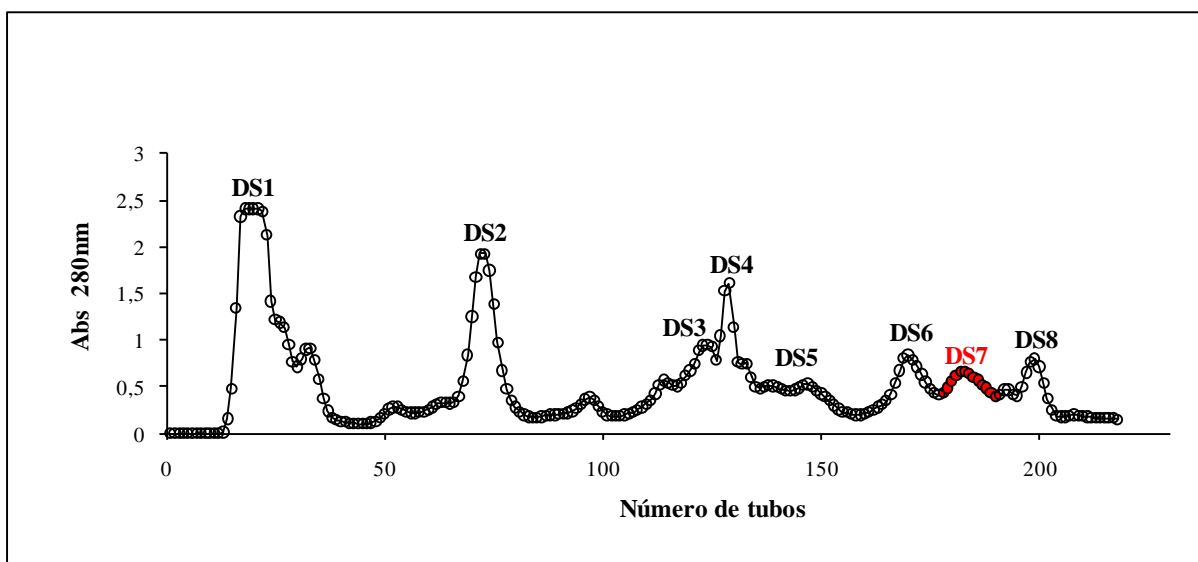


Figura 05: Cromatografia de 400mg da peçonha bruta de *B. moojeni* em resina DEAE Sephacel (2,5 x 20cm). As amostras foram eluídas com gradiente de concentração de bicarbonato de amônio (0,05M – 0,6M). As frações, contendo 3,0mL cada, foram coletadas em um fluxo de 20,0mL/hora.

As frações obtidas a partir dessa cromatografia foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida a 14% em condições desnaturantes (resultados não mostrados). A análise do perfil eletroforético mostrou que as frações apresentam várias bandas protéicas com pesos moleculares variando entre 14.000 e 100.000, das quais várias são conhecidas. Na fração DS2, por exemplo, foi observada uma banda majoritária, que possivelmente representa uma metaloprotease anticoagulante, denominada BmooMP α -I, isolada da peçonha bruta de *B. moojeni* por Bernardes *et al.* (2008). A α -fibrinogenase BmooMP α -I foi inicialmente purificada por cromatografia de troca iônica em DEAE Sephacel, assim como a nova protease purificada no presente trabalho, presente na fração DS7 (destaque na figura 05).

A fração DS7 apresentou atividade proteolítica significativa sobre as cadeias do fibrinogênio bovino (dados não mostrados). Essa fração, após ser reunida em *pool*, liofilizada e ressuspendida, foi submetida ao próximo passo de purificação em resina de exclusão molecular (Figura 06).

A utilização do tampão bicarbonato de amônio nas etapas cromatográficas dispensou processos posteriores para eliminar o sal, como diálise ou filtração em gel. Isso porque o tampão bicarbonato de amônio é volátil e, dessa forma, de fácil retirada pelo processo de liofilização (TORRES, 2007).

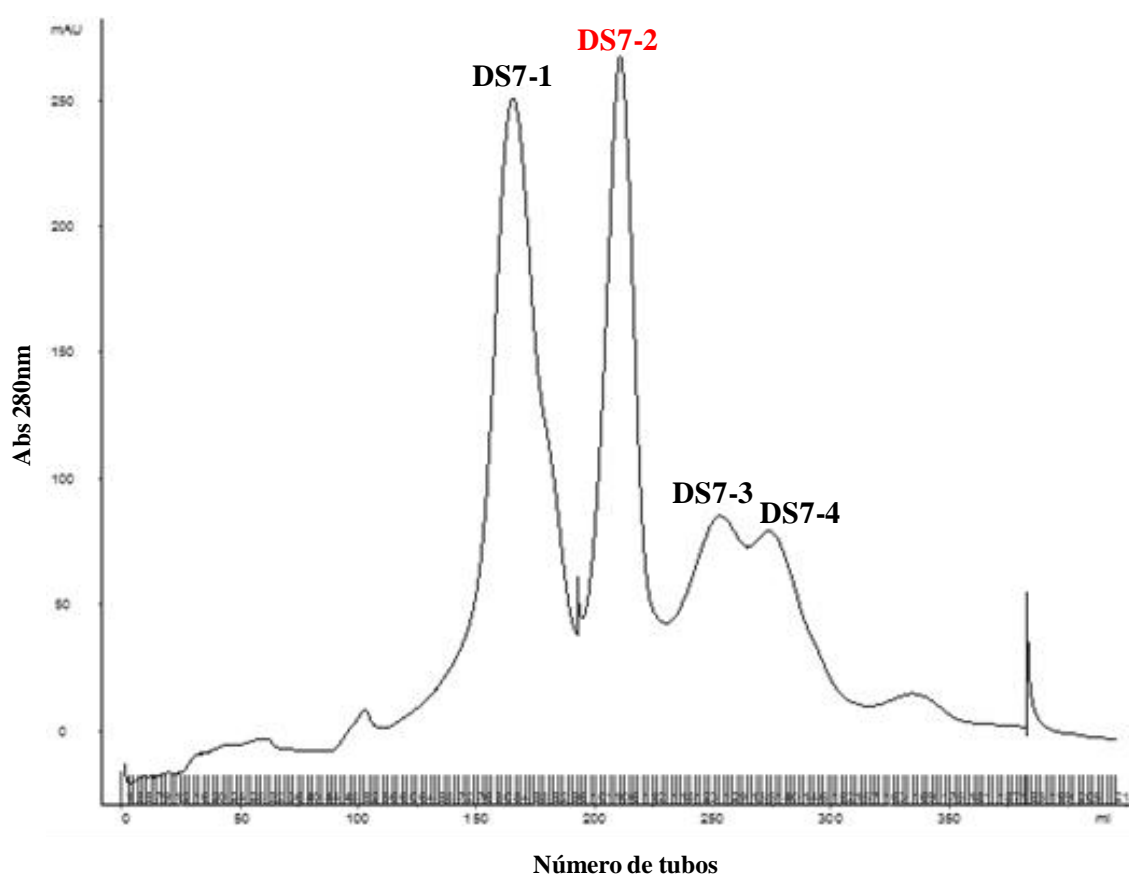


Figura 06: Cromatografia de exclusão molecular em coluna HiPrep™ 26/60 Sephacryl™ S-300 em sistema HPLC ÄKTApurifier™ 10 da fração DS7. A coluna foi equilibrada e as amostras eluídas em AMBIC 0,05M, pH=7,8. As frações, contendo 2,0mL cada, foram coletadas em um fluxo de 30,0mL/hora.

As subfrações resultantes do segundo passo cromatográfico foram analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida a 14% (resultados não mostrados). Na subfração DS7-2 foi observada uma banda majoritária e com alto grau de pureza (Figura 07). A única banda protéica evidente na subfração DS7-2 corresponde a protease utilizada para atingir os objetivos do presente trabalho, a qual foi denominada BmooMP α -II.

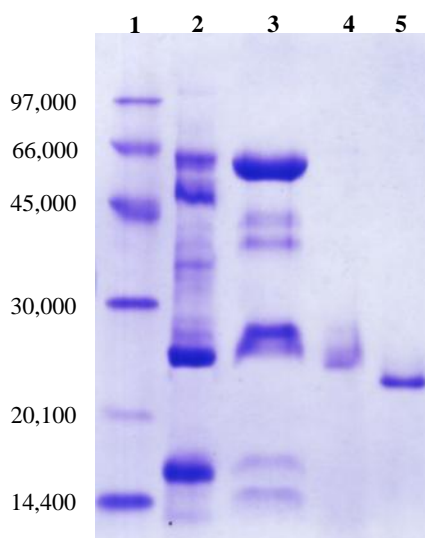


Figura 07: Eletroforese em gel de poliacrilamida a 14% com agentes desnaturantes da peçonha de *B. moojeni* e frações. Linhas: (1) Padrão de peso molecular LMW (Low Molecular Weight): fosforilase b (97.000), albumina bovina (66.000), ovoalbumina (45.000), anidrase carbônica (30.000), inibidor de tripsina (20.100) e α -lactoalbumina (14.400); (2) Peçonha bruta de *B. moojeni* reduzida; (3) DS7 reduzida; (4) BmooMP α -II reduzida; (5) BmooMP α -II não reduzida.

A análise da eletroforese em gel de poliacrilamida a 14% com agentes desnaturantes mostrou que a enzima BmooMP α -II consiste em uma cadeia polipeptídica simples e que apresenta peso molecular aparente de 25.000 em condições redutoras (Figura 07 – linha 4) e 23.000 em condições não redutoras (Figura 07 – linha 5). O peso molecular da BmooMP α -II foi similar a de diversas metaloproteases de peçonhas botrópicas descritas na literatura, tais como: BjussuMP-II (24.000) de *B. jararacussu* (MARCUSSE *et al.*, 2007); Atroxlysin-I (23.000) de *B. atrox* (SANCHEZ *et al.*, 2010); BleucMP (23.500) de *B. leucurus* (GOMES *et al.*, 2011) e BmooMP α -I (24.500) (BERNARDES *et al.*, 2008).

A tabela 01 mostra a recuperação protéica da enzima BmooMP α -II a cada etapa de purificação, em relação ao total de proteínas presentes na peçonha bruta de *B. moojeni*. BmooMP α -II representa aproximadamente 0,9% do total de proteínas presentes na peçonha. O rendimento dessa protease foi semelhante ao da metaloprotease hemorrágica BlaH1 (0,8-1%) purificada de *B. lanceolatus* (STROKA *et al.*, 2005). Em contrapartida, esse rendimento pode ser considerado baixo quando comparado a diversas proteases purificadas de peçonhas botrópicas por diferentes metodologias, tais como BthMP (GOMES *et al.*, 2009) e BmooMP α -I (BERNARDES *et al.*, 2008) que representam cerca de 2,3% e 8,7% de *B. moojeni*, respectivamente; BpSP-I representando aproximadamente 3% de *B. pauloensis* (COSTA *et al.*, 2009); e Leucurobin, que representa cerca 3,5% de *B. leucurus*

(MAGALHÃES *et al.*, 2007). A concentração da proteína de interesse na peçonha bruta e as metodologias adotadas para sua purificação são os principais fatores que determinam a recuperação protéica final.

Tabela 01: Recuperação protéica da enzima BmooMP α -II a cada etapa de purificação em relação ao total de proteínas presentes na peçonha bruta de *B. moojeni*.

Frações	Recuperação protéica *
Peçonha bruta	100%
DS-7	5,5%
BmooMP α -II	0,9%

* Recuperação protéica estimada pela dosagem do *pool* das frações e subfrações obtidas.

3.2 Ensaio enzimáticos e biológicos

A caracterização da atividade proteolítica da enzima BmooMP α -II foi realizada utilizando a caseína e o fibrinogênio como substratos. A análise da eletroforese em gel de poliacrilamida a 14% mostrou que a enzima BmooMP α -II apresentou atividade proteolítica reduzida sobre a caseína à 37°C (resultados não mostrados). Esses resultados são concordantes com aqueles encontrados para a metaloprotease hemorrágica purificada de *B. alternatus* por Gay *et al.* (2005).

A enzima BmooMP α -II apresentou atividade proteolítica sobre as cadeias do fibrinogênio bovino. A enzima degrada parcialmente as cadeias A α e B β do fibrinogênio com apenas 15 minutos de incubação (Figura 08A – linha 2). Ambas as cadeias são totalmente degradadas após 60 minutos (Figura 08A – linhas 4 e 5). Nossos resultados mostram que a enzima não foi capaz de degradar a cadeia γ , mesmo depois de 120 minutos de incubação. A enzima BmooMP α -II hidrolisa preferencialmente a cadeia A α , seguida da cadeia B β do fibrinogênio, o que a classifica como uma α -fibrinogenase, assim como outras proteases botrópicas, tais como Neuwiedase da peçonha de *B. neuwiedi* (RODRIGUES *et al.*, 2000), BlaH1 da peçonha de *B. lanceolatus* (STROKA *et al.*, 2005), BjussuMP-II (MARCUSI *et al.*, 2007), BmooMP α -I (BERNARDES *et al.*, 2008), BthMP (GOMES *et al.*, 2009) e BleucMP (GOMES *et al.*, 2011).

O efeito de diferentes inibidores de proteases sobre a atividade fibrinogenolítica da enzima BmooMP α -II foi testado. A atividade fibrinogenolítica da enzima foi fortemente inibida pelos agentes quelantes EDTA e 1,10-fenantrolina (Figura 08B – linhas 3 e 5). Essas

substâncias são inibidores de metaloproteases, pois removem cofatores metálicos que são essenciais para a catálise enzimática (COSTA *et al.*, 2010b). Esses resultados sugerem que a BmooMP α -II pertence à família das SVMs. A inibição da atividade fibrinogenolítica pelo agente redutor β -mercaptoetanol (Figura 08B – linha 4) sugere ainda que a enzima BmooMP α -II possui importantes resíduos de cisteína em sua sequência de aminoácidos e que as pontes dissulfeto são fundamentais para sua integridade estrutural e funcional. A atividade fibrinogenolítica da enzima não foi inibida pela presença de benzamidina ou aprotinina (Figura 08B – linhas 6 e 8), inibidores de serinoproteases, ou leupeptina (Figura 08B – linha 7), inibidor de serino e cisteínoproteases. A análise do peso molecular (Figura 07 – linhas 4 e 5) sugere que a BmooMP α -II pertence a classe PI das SVMs. As SVMs PI apresentam peso molecular de 20.000 a 30.000 e são enzimas não hemorrágicas ou fracamente hemorrágicas (MARKLAND, 1998; CALVETE *et al.*, 2003).

A atividade fibrinogenolítica da enzima foi avaliada em uma ampla faixa de pH, variando entre 4,0 e 10,0 (Figura 08C). Os resultados mostraram que a BmooMP α -II apresenta atividade fibrinogenolítica máxima em pH 8,0 (Figura 08C – linha 6) e atividade drasticamente reduzida em pH ácido (4,0 e 5,0) (Figura 08C – linhas 2 e 3) e pH alcalino (10,0) (Figura 08C – linha 8). Os pHs extremos podem causar alteração nas cargas da enzima provocando modificações na estrutura tridimensional. Isso pode causar influência na interação da enzima com o substrato e, conseqüentemente, a perda da atividade enzimática (TORRES, 2007).

Os resultados da atividade fibrinogenolítica temperatura-dependente mostraram que a enzima BmooMP α -II apresenta atividade máxima em temperatura de 30 à 50°C (Figura 08D – linhas 2 à 4) e que, no entanto, a enzima é sensível a altas temperaturas (acima de 60°C) (Figura 08D – linhas 5 à 8). Muitas enzimas, purificadas e descritas na literatura, apresentam características similares à enzima BmooMP α -I, como por exemplo, Leucurolysin-a purificada da peçonha de *B. leucurus* (BELLO *et al.*, 2006), BpSP-I (COSTA *et al.*, 2009), BthMP (GOMES *et al.*, 2009) e TLBm (VILCA-QUISPE *et al.*, 2010). Elas são ativas em uma larga faixa de pH e perdem a atividade proteolítica em altas temperaturas.

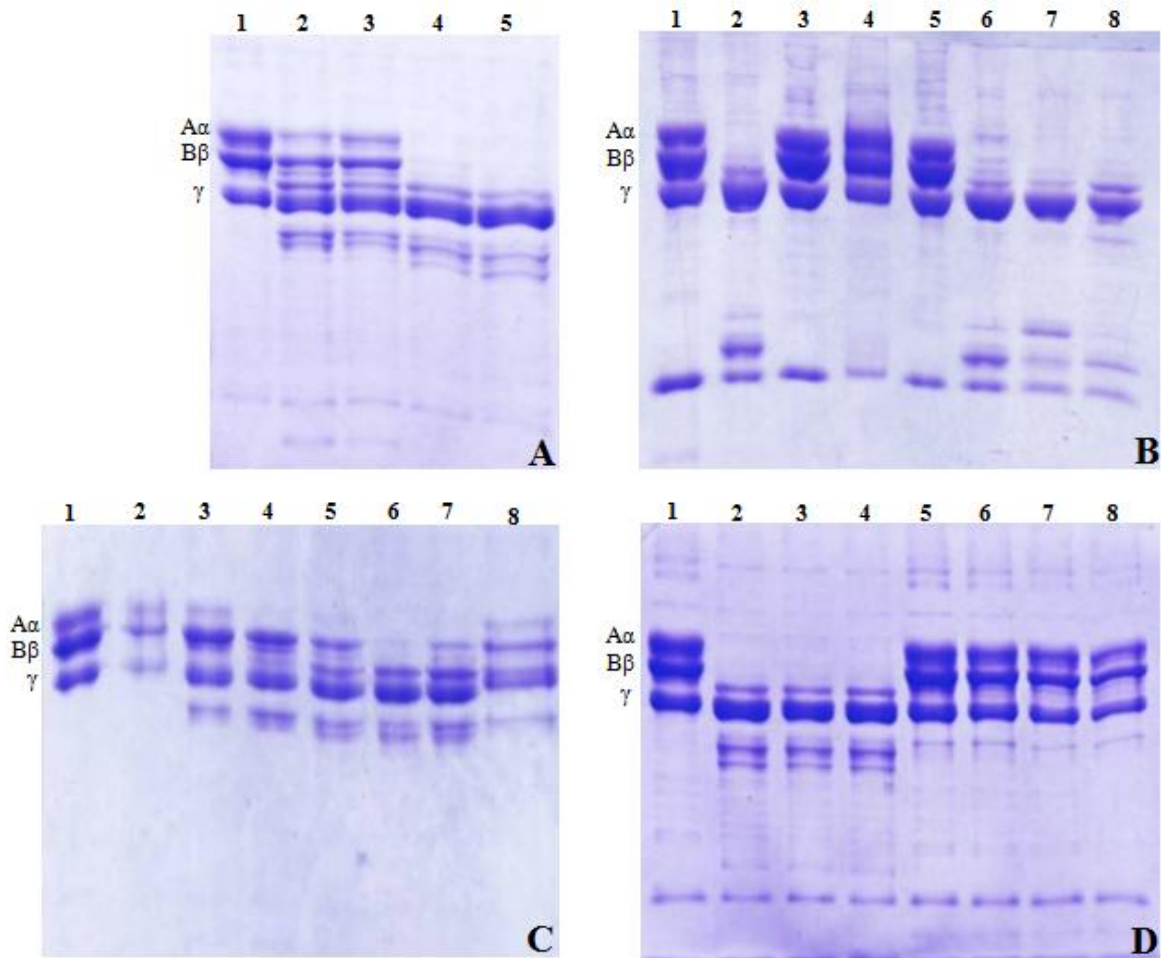


Figura 08: Eletroforese em gel de poliacrilamida a 14% com agentes desnaturantes dos produtos de digestão do fibrinogênio pela enzima BmooMP α -II: (A) tempo-dependente. Linhas: (1-5)Fibrinogênio incubado com BmooMP α -II por 0; 15; 30; 60 e 120 minutos, respectivamente. (B) na presença de inibidores. Linhas: (1) Fibrinogênio controle (tempo 0); (2) Fibrinogênio incubado com BmooMP α -II por 60 minutos; (3-8) Fibrinogênio com BmooMP α -II pré-incubada na presença de EDTA; β -mercaptoetanol; 1,10-fenantrolinea; benzamidina; leupeptina e aprotinina, respectivamente. (C) pH-dependente. Linhas: (1) Fibrinogênio controle (tempo 0); (2-8) Fibrinogênio com BmooMP α -II pré-incubada em pH=4,0; 5,0; 6,0; 7,0; 8,0; 9,0 e 10,0, respectivamente. (D) temperatura-dependente. Linhas: (1) Fibrinogênio controle (tempo 0); (2-8)Fibrinogênio com BmooMP α -II pré-incubada nas temperaturas 30; 40; 50; 60; 70; 80 e 90°C, respectivamente.

Uma ampla variedade de atividades funcionais é atribuída às SVMPs, incluindo hemorrágica (BJARNASON e FOX, 1994). Entretanto, a enzima BmooMP α -II foi considerada não-hemorrágica, uma vez que não foi capaz de induzir hemorragia quando 100 μ g foram injetados via subcutânea em camundongos (resultados não mostrados). Em geral, as SVMPs PIII são toxinas hemorrágicas mais potentes que as outras classes, especialmente a classe PI. Diversas SVMPs PI não-hemorrágicas foram caracterizadas, tais como Neuwiedase (RODRIGUES *et al.*, 2000), BmooMP α -I (BERNARDES *et al.*, 2008) e

BleucMP (GOMES *et al.*, 2011). A explicação sugerida tem sido que os domínios adicionais na estrutura podem contribuir para a maior potência hemorrágica da classe PIII (FOX e SERRANO, 2005).

O estudo da toxicidade sistêmica foi realizado pela análise das alterações histológicas induzidas 24 horas após injeção i.p. de 50µg da enzima BmooMPα-II ou da peçonha bruta de *B. moojeni* em 100µL de solução salina. No coração, a peçonha de *B. moojeni* causou degeneração hialina e hemólise, enquanto a BmooMPα-II não induziu alterações (resultados não mostrados). As fotomicrografias dos cortes histológicos dos órgãos (fígado, pulmões e rins), quando comparadas às do grupo controle (Figuras 9A, 10A e 11A), mostraram alterações relevantes induzidas pela BmooMPα-II, que parece contribuir para o efeito tóxico da peçonha bruta. A enzima BmooMPα-II (Figuras 9D e 9E) e a peçonha (Figuras 9B e 9C) induziram hemorragia e necrose no fígado. A hemorragia é evidenciada pela presença de eritrócitos entre os hepatócitos e não limitados por endotélio, enquanto a necrose é caracterizada pela perda dos limites celulares, citoplasmólise, picnose, cariorrexe e cariólise. No pulmão, assim como a peçonha bruta (Figuras 10B e 10C), a BmooMPα-II (Figuras 10D e 10E) causou pneumonite evidenciada por dilatação do septo alveolar devido ao infiltrado inflamatório. A peçonha bruta também induziu a hiperemia pulmonar. A figura 11 mostrou que a BmooMPα-II (Figuras 11D e 11E) e a peçonha de *B. moojeni* (Figuras 11B e 11C) induziram degeneração tubular renal com formação de debris celulares e infiltrado inflamatório. A ação nefrotóxica direta da peçonha de *B. moojeni* nas células tubulares e estruturas glomerulares é o mais importante fator fisiopatológico na indução da insuficiência renal pelo envenenamento (BOER-LIMA *et al.*, 1999). As alterações renais induzidas pela BmooMPα-II podem levar à insuficiência renal.

Os efeitos associados a alterações histológicas de diversas proteases botrópicas têm sido bastante estudados. Diferentemente da BmooMPα-II, estudos de alterações histológicas induzidas pelas enzimas botrópicas Bhalternin (COSTA *et al.*, 2010a) e BleucMP (GOMES *et al.*, 2011) mostraram a presença de hemólise e infiltrado inflamatório no tecido cardíaco, respectivamente. As alterações causadas pela peçonha de *B. alternatus* e pela Bhalternin (COSTA *et al.*, 2010a) no tecido hepático, assim como pela BmooMPα-II, foram caracterizadas pela necrose. No tecido pulmonar, a Bhalternin (COSTA *et al.*, 2010a) também induziu efeitos semelhantes aos causados pela BmooMPα-II. A Neuwidase (RODRIGUES *et al.*, 2001), uma metaloprotease desprovida de atividade hemorrágica local, induziu hemorragia nos pulmões após injeção intravenosa em camundongos. Entretanto, não causou hemorragia no coração, rins ou fígado.

A lesão tecidual local é um dos principais problemas decorrentes de acidentes botrópicos, sendo consequência da ação combinada de vários componentes da peçonha (GUTIÉRREZ e RUCAVADO, 2000; ZYCHAR *et al.*, 2010). A necrose muscular é um importante efeito local induzido por acidentes botrópicos (SOARES *et al.*, 2003; GOMES *et al.*, 2009; COSTA *et al.*, 2010a; QUEIROZ *et al.*, 2011). O efeito miotóxico induzido 24 horas após a injeção i.m. de 50µg da BmooMPα-II ou da peçonha bruta de *B. moojeni* em 50µL de solução salina no músculo gastrocnêmio é evidente quando comparado ao grupo controle (Figura 12A). Como esperado, a análise histológica do grupo controle não apresentou nenhuma alteração morfológica: as fibras permaneceram íntegras, com estriações e núcleos periféricos evidentes (Figura 12A). Portanto, as modificações histológicas observadas são decorrentes da ação das toxinas inoculadas. A enzima BmooMPα-II (Figuras 12D e 12E) induziu, após 24 horas, mionecrose evidenciada por perda dos limites celulares, citoplasmólise, ausência de estriações e núcleos pouco evidentes ou ausentes, acompanhada por infiltrado inflamatório e hemorragia, assim como a peçonha de *B. moojeni* (Figuras 12B e 12C). A hemorragia encontrada na porção do tecido muscular pode ser um efeito secundário à intensa necrose ou ter ocorrido por ação do domínio metaloprotease sobre os componentes vasculares após 24 horas de ação *in vivo*. O mecanismo pelo qual SVMPs induzem lesão muscular não está bem estabelecido. Os danos musculares causados por algumas SVMPs hemorrágicas podem ocorrer como um efeito secundário à isquemia. No entanto, para outras SVMPs não está claro se causam um efeito citotóxico direto nas células musculares ou se agem por outro mecanismo indireto ainda não identificado (GUTIÉRREZ e RUCAVADO, 2000). Além das SVMPs hemorrágicas, as SVMPs não hemorrágicas parecem também desempenhar um papel relevante na lesão tecidual local por causar degradação da matriz extracelular, o que pode afetar os processos regenerativos (GUTIÉRREZ e RUCAVADO, 2000).

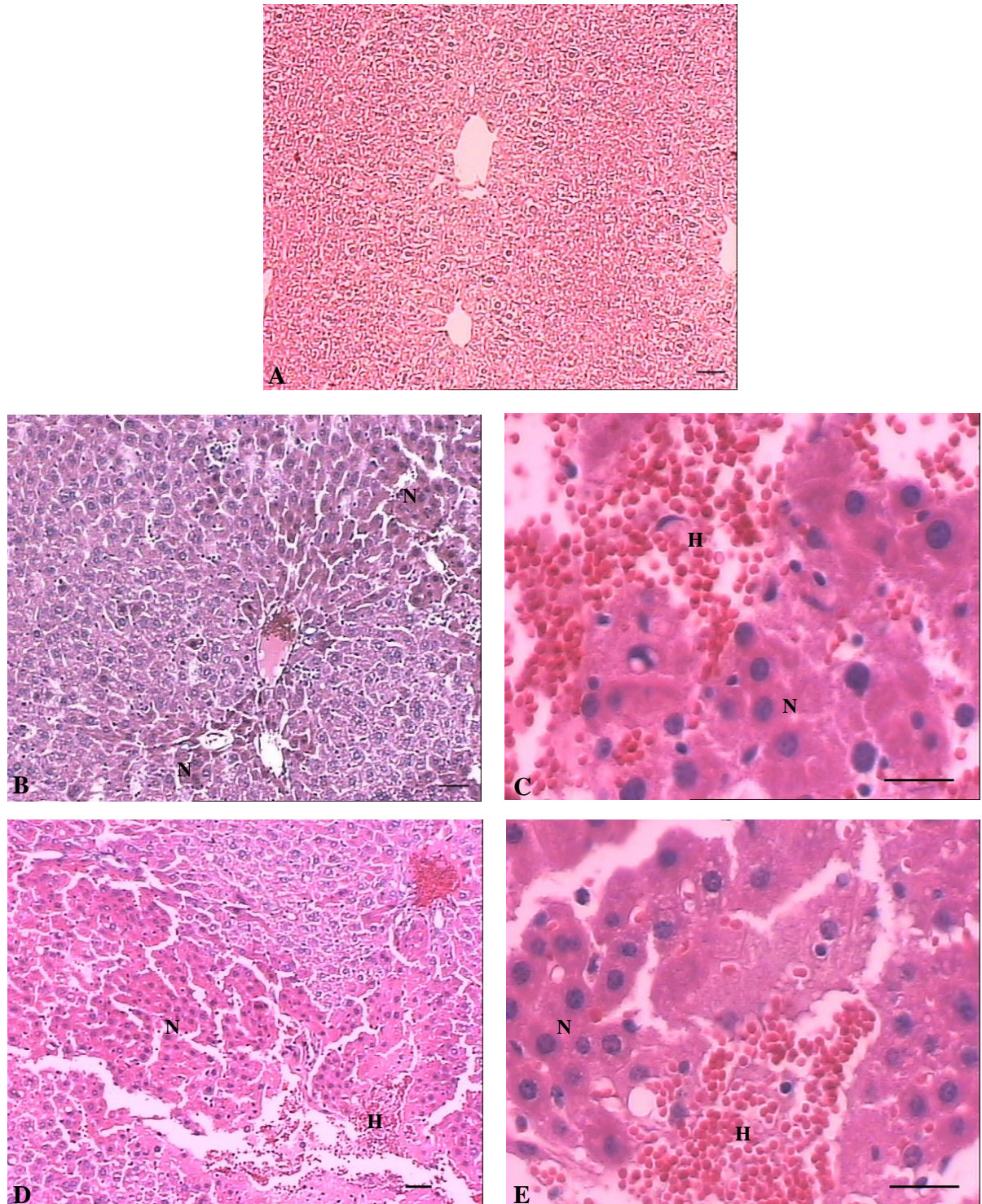


Figura 09: Fotomicrografia de cortes de fígado de camundongos 24h após injeção i.p. A - 100µL de solução salina (controle): tecido normal. B-C e D-E - 50µg de peçonha bruta de *B. moojeni* e 50µg de BmooMPα-II/100µL de solução salina, respectivamente: necrose e hemorragia. Coloração: eosina-hematoxilina. As letras indicam a presença de (N) necrose e (H) hemorragia. Barra = 100µm (A, B, D); Barra = 50µm (C, E).

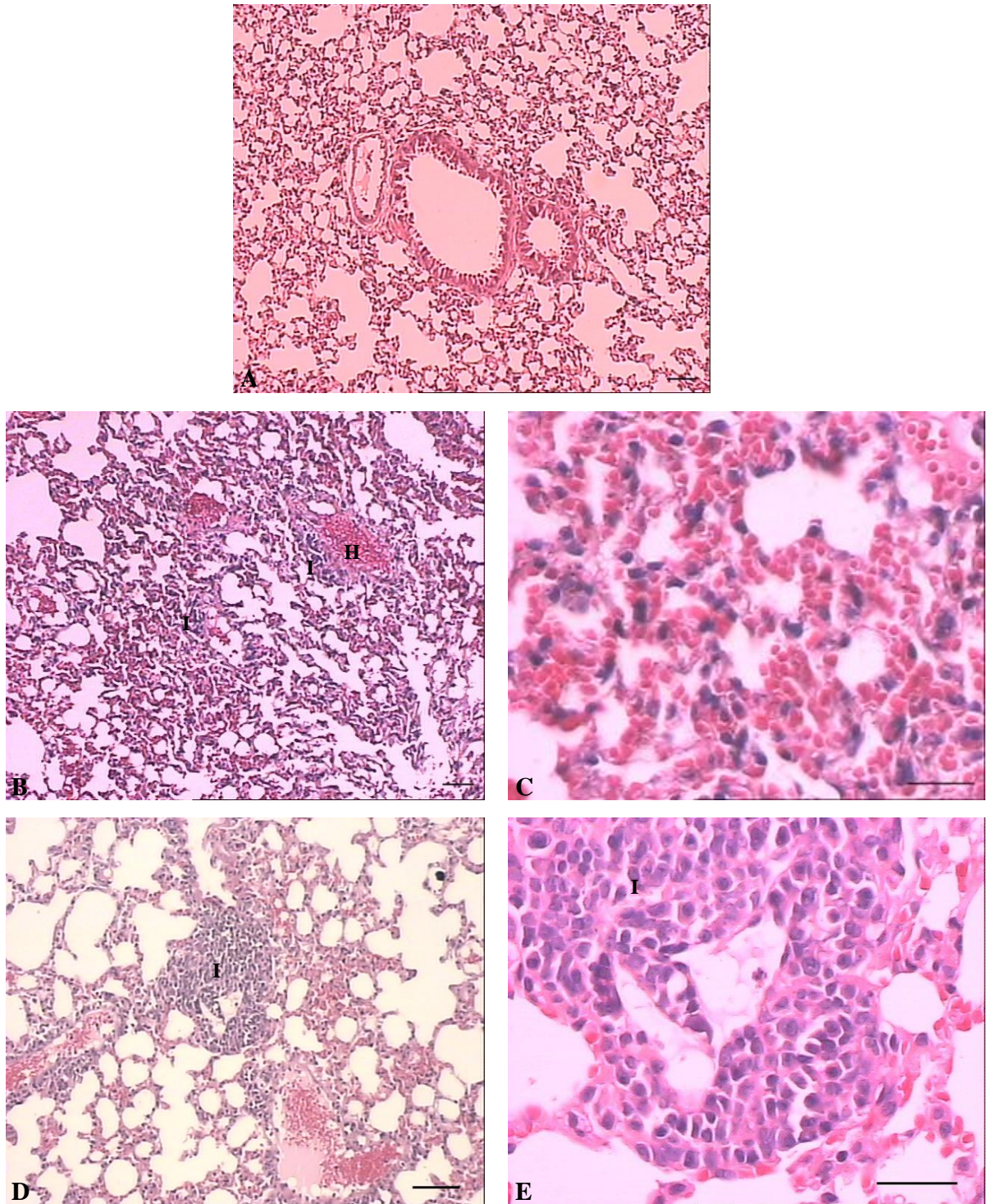


Figura 10: Fotomicrografia de cortes de pulmão de camundongos 24h após injeção i.p. A - 100 μ L de solução salina (controle): tecido normal. B-C e D-E - 50 μ g de peçonha bruta de *B. moojeni* e 50 μ g de BmooMP α -II/100 μ L de solução salina, respectivamente: pneumonite evidenciada por dilatação dos septos alveolares devido ao infiltrado inflamatório e hiperemia. Coloração: eosina-hematoxilina. As letras indicam a presença de (I) infiltrado inflamatório e (H) hiperemia. Barra = 100 μ m (A, B, D); Barra = 50 μ m (C, E).

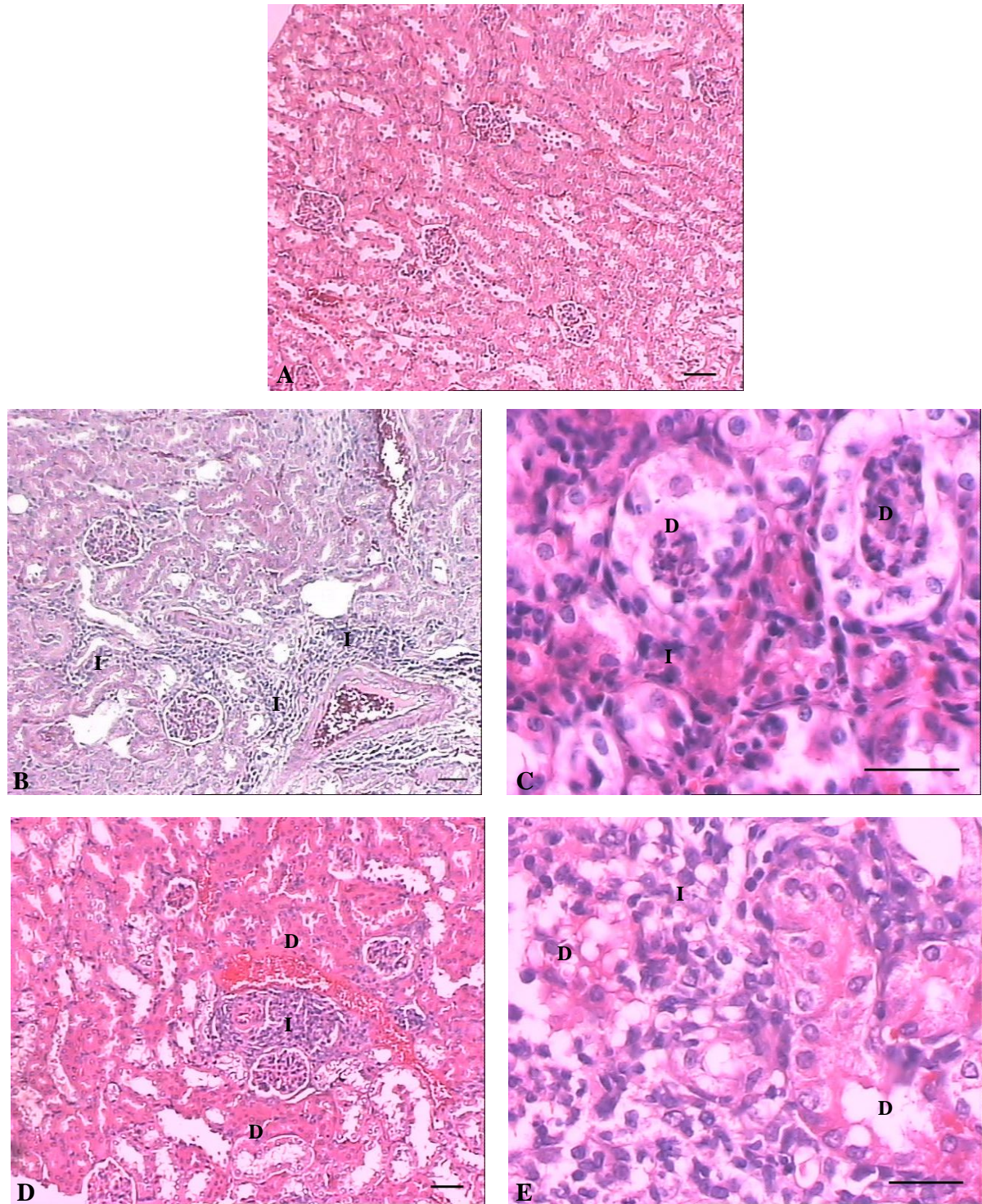


Figura 11: Fotomicrografia de cortes de rim (região cortical) de camundongos 24h após injeção i.p. A - 100µL de solução salina (controle): região cortical do rim normal. B-C e D-E - 50µg de peçonha bruta de *B. moojeni* e 50µg de BmooMP α -II/100µL de solução salina, respectivamente: degeneração tubular renal com formação de debris celulares e infiltrado inflamatório. Coloração: eosina-hematoxilina. As letras indicam a presença de (D) degeneração tubular renal e (I) infiltrado inflamatório. Barra = 100µm (A, B, D); Barra = 50µm (C, E).

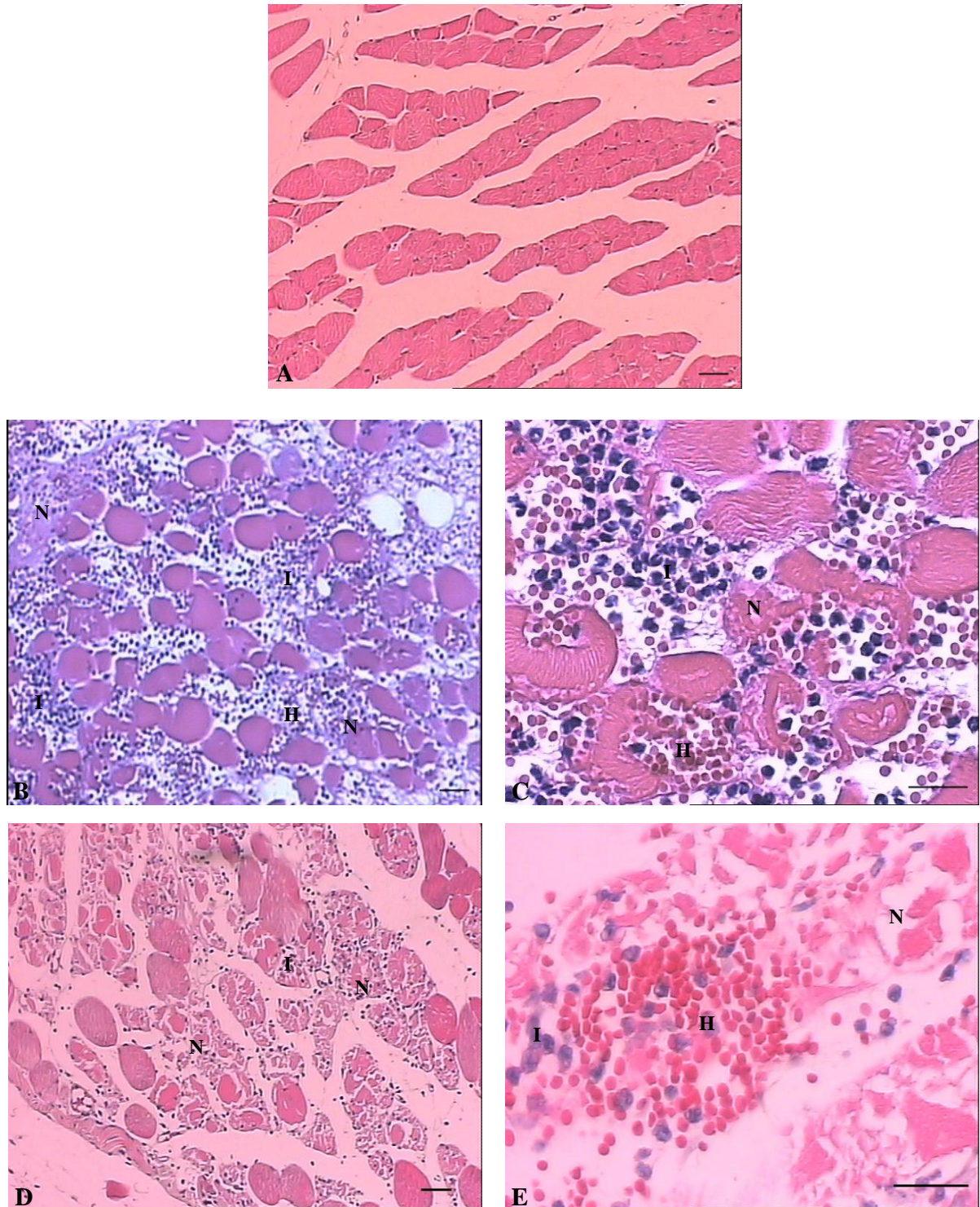


Figura 12: Fotomicrografia de cortes do músculo gastrocnêmio direito de camundongos 24h após injeção i.m. A - 50µL de solução salina (controle): fibras musculares íntegras. B-C e D-E - 50µg de peçonha bruta de *B. moojeni* e 50µg de BmooMPα-II/50µL de solução salina, respectivamente: mionecrose evidenciada por perda dos limites celulares, citoplasmólise, ausência de estriações e núcleos pouco evidentes ou ausentes, acompanhada por infiltrado inflamatório e hemorragia. Coloração: eosina-hematoxilina. As letras indicam a presença de (N) necrose, (I) infiltrado inflamatório e (H) hemorragia. Barra = 100µm (A, B, D); Barra = 50µm (C,E).

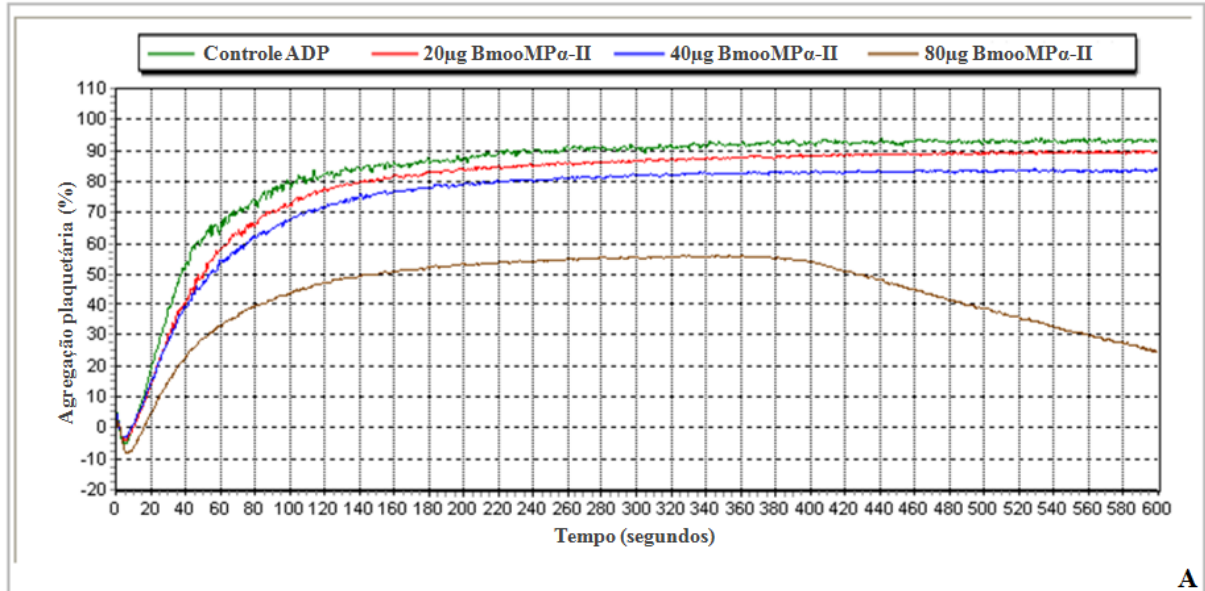
Os sintomas locais do envenenamento botrópico incluem edema, dor, hemorragia, inchaço, bolhas e necrose (DAMICO *et al.*, 2007). A formação de edema, normalmente acompanhado por hiperalgesia, é resultado da ação sinérgica de diversos componentes da peçonha. Essas toxinas podem promover a sensibilização de nociceptores e a liberação de uma ampla variedade de mediadores inflamatórios, induzindo o aumento da permeabilidade vascular, mecanismos que desencadeiam a hiperalgesia e a formação de edema, respectivamente (TEIXEIRA *et al.*, 2003; GREMSKI *et al.*, 2007; GOMES *et al.*, 2009; GUTIÉRREZ *et al.*, 2009; TEIXEIRA *et al.*, 2009; NASCIMENTO *et al.*, 2010; ZYCHAR *et al.*, 2010). Entretanto, pela metodologia adotada, a BmooMP α -II (15, 50 e 75 μ g/pata) não induziu diferença significativa na formação de edema ou hiperalgesia em relação as medidas iniciais (resultados não mostrados). Esses resultados sugerem que a enzima BmooMP α -II parece não contribuir para os efeitos locais de edema e hiperalgesia provocados pela peçonha de *B. moojeni*.

O envenenamento por viperídeos é frequentemente associado com desordens na hemostasia devido à ação de componentes protéicos que interferem no mecanismo de coagulação. A ação de toxinas enzimáticas ou não enzimáticas pode levar a efeitos pró-coagulantes, ou ao consumo de componentes da coagulação, tornando o sangue incoagulável (KAMIGUTI, 2005). Nossos resultados mostraram que a enzima BmooMP α -II não apresentou capacidade de coagular o plasma bovino *in vitro* e/ou de tornar o sangue dos camundongos incoagulável (resultados não mostrados).

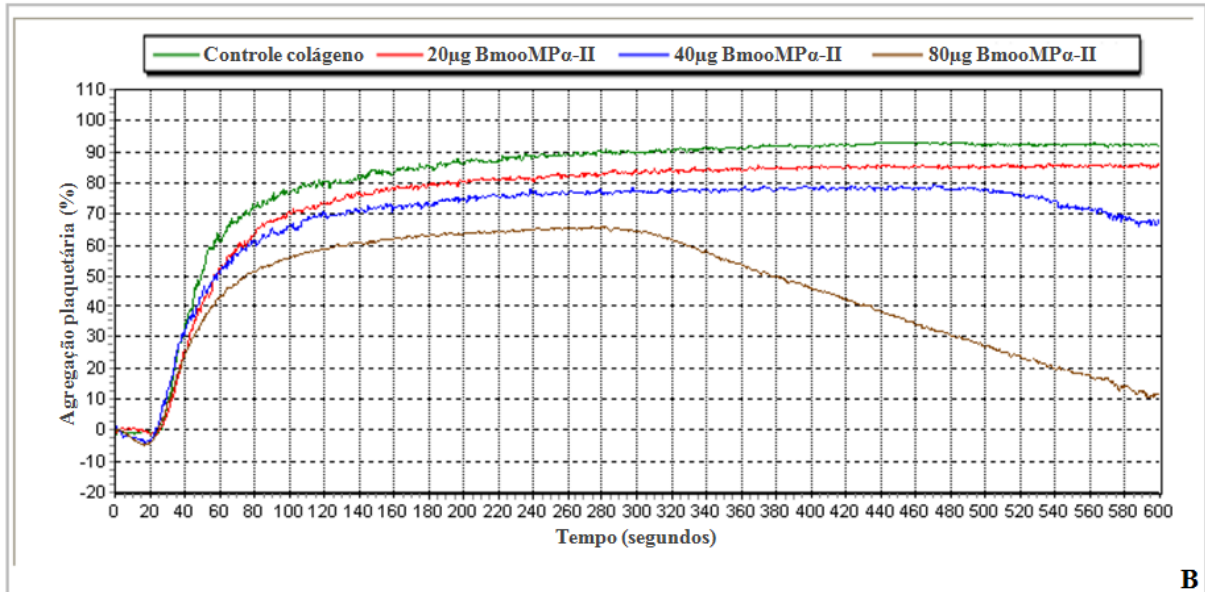
As lesões dos vasos sanguíneos resultam na exposição de proteínas subendoteliais, tais como o colágeno e o FvW. Essas moléculas se ligam a receptores específicos presentes na superfície das plaquetas. Este fenômeno estimula a ativação das plaquetas e leva a geração intracelular de segundos mensageiros, que resulta em um conjunto de respostas que incluem rearranjos do citoesqueleto (mudança de forma), exocitose de grânulos (secreção) e expressão dos receptores GPIIb/IIIa (integrinas $\alpha_{IIb}\beta_3$). Por sua vez, o fibrinogênio plasmático se liga aos receptores expressos, promovendo a ligação de plaquetas adjacentes, as quais aderem umas as outras, possibilitando a agregação plaquetária e a origem de um tampão hemostático (SHLANSKY-GOLDBERG, 2002; FULY *et al.*, 2004).

Os ensaios de inibição da agregação plaquetária pela enzima BmooMP α -II (20, 40 e 80 μ g) foram realizados utilizando vários indutores da agregação plaquetária. Nossos resultados mostram que a enzima BmooMP α -II foi capaz de inibir a agregação induzida por ADP (Figura 13A), colágeno (Figura 13B), ristocetina (Figura 13C) e epinefrina (resultados não mostrados) de maneira dose dependente em relação à curva controle. Na figura 13,

observa-se que, ao final de 600 segundos, a inibição máxima pela BmooMP α -II foi de aproximadamente 75% da agregação induzida por ADP e ristocetina e 85% da agregação induzida por colágeno.



A



B

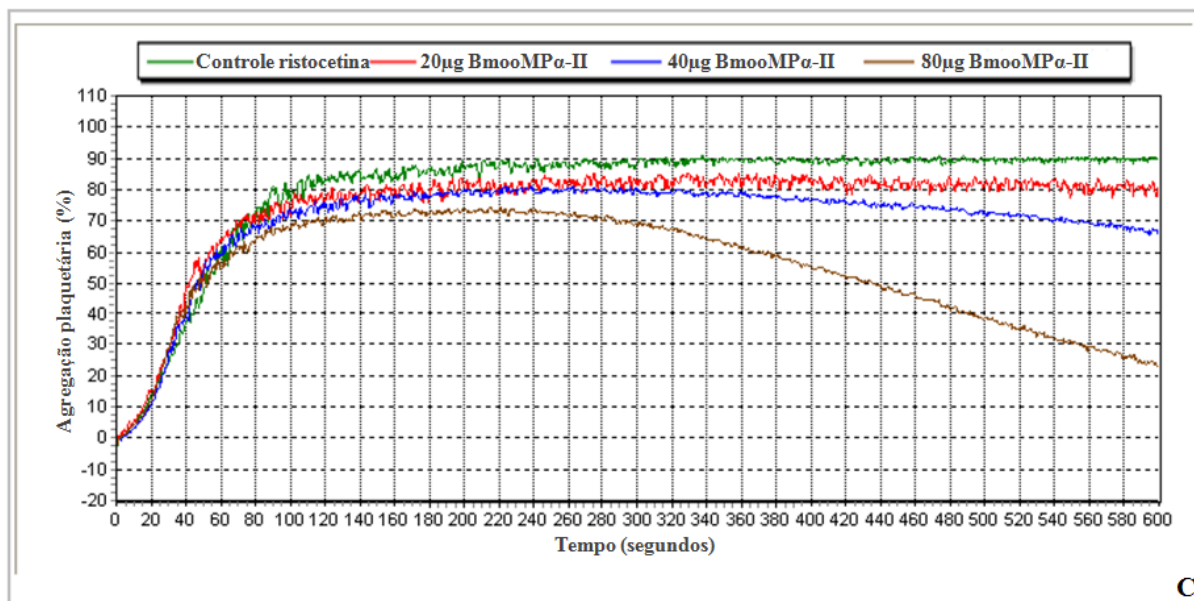


Figura 13: Inibição da agregação plaquetária pela enzima BmoMP α -II (20 μ g, 40 μ g e 80 μ g) induzida por A – ADP; B – colágeno; C – ristocetina. Curva verde: controle da agregação plaquetária induzida pelo agonista. Curva vermelha: inibição da agregação plaquetária por 20 μ g da enzima BmoMP α -II. Curva azul: inibição da agregação plaquetária por 40 μ g da enzima BmoMP α -II. Curva marrom: inibição da agregação plaquetária por 80 μ g da enzima BmoMP α -II.

As peçonhas de serpentes apresentam uma ampla variedade de toxinas que afetam a função plaquetária por agir sobre receptores específicos da superfície das plaquetas ou sobre seus ligantes (ANDREWS e BERNDT, 2000; KAMIGUTI, 2005; MARSH e WILLIAMS, 2005). Mocarhagin, por exemplo, uma SVMP de 55kDa isolada da peçonha de *Naja mocambique mocambique*, inibe a agregação plaquetária por remoção do fragmento His-1-Glu-282 do receptor GPIIb α (WARD *et al.*, 1996; DU *et al.*, 2006). A GPIIb α é o único substrato da Mocarhagin, detectável na superfície plaquetária (WIJEYEWICKREMA *et al.*, 2005).

A Jararhagin (52kDa) é uma SVMP hemorrágica do tipo PIII isolada da peçonha de *Bothrops jararaca*. Essa enzima inibe a agregação plaquetária induzida pela ristocetina e pelo colágeno. A inibição da agregação induzida pela ristocetina é atribuída à hidrólise do FvW pela enzima. Por outro lado, a inibição da agregação plaquetária, induzida pelo colágeno, acontece pela ação direta sobre a integrina $\alpha_2\beta_1$ (LAING e MOURA-DA-SILVA, 2005). A Jararhagin se liga à integrina na superfície da plaqueta e cliva a subunidade β_1 . Curiosamente, a Jararhagin enzimaticamente inativa, também inibi a agregação plaquetária, porém é menos eficiente que a sua forma enzimaticamente ativa (KAMIGUTI, 2005).

Outro exemplo de SVMP que interfere na agregação plaquetária é a Catrocollastatin, uma protease de 50kDa purificada da peçonha de *Crotalus atrox*. A Catrocollastatin se liga ao colágeno, inibindo a adesão das plaquetas ao colágeno e, conseqüentemente, a agregação induzida por esse agonista. Essa ligação parece ser mediada pelo domínio *Disintegrin-like* da SVMP (ZHOU *et al.*, 1996).

A fim de avaliar a relevância da atividade proteolítica da enzima BmooMP α -II sobre a inibição da agregação plaquetária induzida pelo ADP, a enzima foi desnaturada por temperatura (aquecida por 15 minutos a 100°C), antes da realização dos ensaios. Nossos resultados mostraram que, nestas condições, a atividade proteolítica sobre as cadeias do fibrinogênio da enzima foi totalmente inibida. A figura 14 mostra as curvas de agregação plaquetária obtidas nesse ensaio.

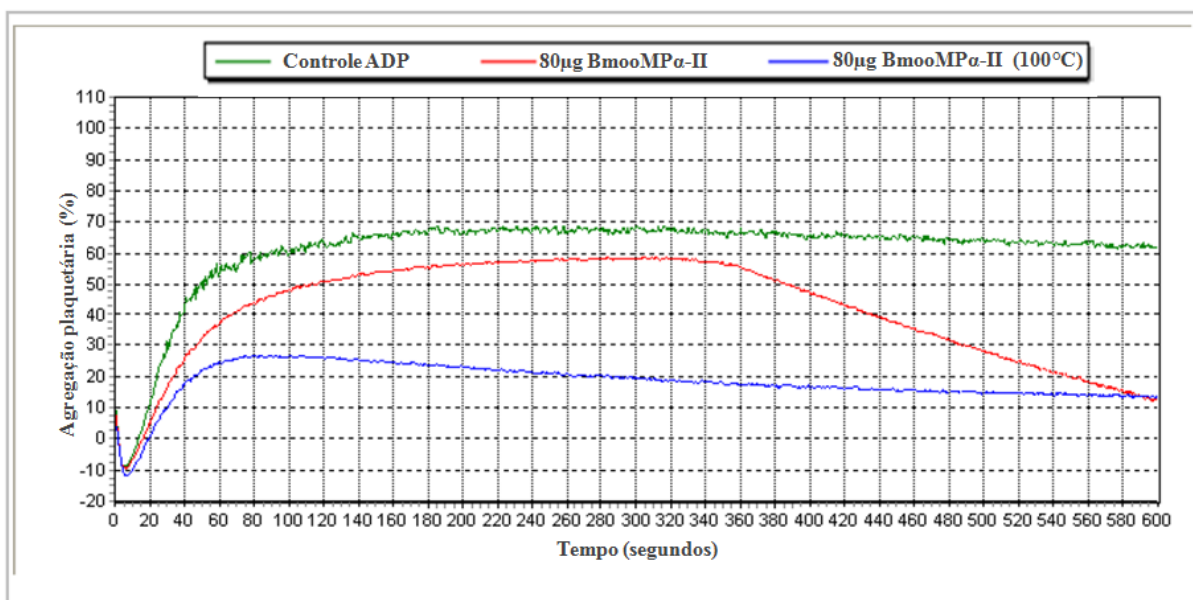


Figura 14: Inibição da agregação plaquetária induzida por ADP pela enzima BmooMP α -II desnaturada. Curva verde: controle da agregação plaquetária induzida pelo ADP. Curva vermelha: inibição da agregação plaquetária por 80µg da BmooMP α -II. Curva azul: inibição da agregação plaquetária por 80µg da BmooMP α -II desnaturada.

A atividade proteolítica parece não ser o fator determinante para a inibição da agregação plaquetária pela enzima BmooMP α -II. Os resultados mostraram que, ao final de 600 segundos, não houve diferença na inibição por 80µg da enzima BmooMP α -II nativa (Figura 14: curva vermelha) e desnaturada (Figura 14: curva azul). Entretanto, o efeito de inibição da agregação plaquetária induzida por ADP pela enzima desnaturada foi mais rápido que a inibição pela enzima nativa. Esses resultados sugerem que a inibição da agregação

plaquetária induzida pela enzima BmooMP α -II pode ser devido a uma ação estrutural e não enzimática.

O motivo do rápido efeito de inibição da agregação pela enzima BmooMP α -II desnaturada pode ser explicado pelo desenovelamento das cadeias da proteína e a exposição da sequência responsável pela interação da molécula com os receptores da superfície das plaquetas. Esse resultado pode ser interessante considerando que as alterações histológicas mais relevantes encontradas em diversos órgãos podem ser causadas, principalmente, pela atividade proteolítica da enzima. Sendo assim, a utilização da BmooMP α -II proteoliticamente inativa como modelo farmacológico em estudos terapêuticos torna-se mais viável.

A BjussuM PII , purificada da peçonha de *B. jararacussu*, é um exemplo de SVMP pertencente a classe PI capaz de inibir a agregação plaquetária. Entretanto, diferente da BmooMP α -II, a inibição pela BjussuM PII é dependente de sua atividade enzimática, pois na presença de inibidores de metaloproteases, a inibição da agregação plaquetária por essa enzima é perdida (MARCUSSE *et al.*, 2007). A atroxlysin-I, SVMP PI isolada da peçonha de *B. atrox*, inibe a agregação plaquetária induzida pelo colágeno e ADP. A inibição é independente de sua atividade proteolítica, apesar da atroxlysin-I desprovida de atividade enzimática ser menos potente como inibidor da agregação plaquetária (SANCHEZ *et al.*, 2010).

A interferência na função plaquetária é uma das estratégias para o tratamento de distúrbios trombóticos (SAJEVIC *et al.*, 2011). Os agentes antiplaquetários são indicados principalmente em casos relacionados à trombose arterial, tais como infarto agudo do miocárdio e acidente vascular cerebral trombótico. Entretanto, apesar de comprovada eficácia clínica, os agentes antiplaquetários atuais, tanto endovenosos como orais, apresentam algumas limitações. A principal substância indicada é o ácido acetilsalicílico (aspirina). A aspirina inibe o metabolismo do ácido araquidônico através da inativação irreversível da enzima COX-1. Esse fármaco pode causar resistência e efeitos adversos gastrintestinais, tais como úlceras gástricas e hemorragias gastrintestinais (HANKEY e EIKELBOOM, 2006; TÖRÜNER, 2007).

Outras substâncias com ações diferentes como, por exemplo, o clopidogrel, podem ser aditivas aos efeitos da aspirina (RANG *et al.*, 2004). O clopidogrel é um antagonista específico do receptor presente na superfície plaquetária P2Y₁₂. Esse fármaco contribui para a desestabilização dos agregados plaquetários induzidos pelo ADP, com consequente desagregação plaquetária. O clopidogrel não causa alteração significativa nas etapas iniciais da agregação plaquetária (LORDKIPANIDZÉ *et al.*, 2009). Uma das

desvantagens do clopidogrel é a necessidade de metabolização pelo fígado para gerar um metabólito ativo. Dessa forma, sob a dose recomendada, o efeito é estabilizado apenas após 3-4 dias (GACHET, 2005).

A participação da integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ na agregação plaquetária justifica o interesse em terapias com bloqueadores desse receptor, visto que todas as vias de ativação das plaquetas convergem para essa via final comum, fundamental para a formação do trombo. Teoricamente, o bloqueio da integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ não deve comprometer a adesão plaquetária à matriz subendotelial, o que reduz o risco de hemorragia (TOPOL *et al.*, 1999; KAMIGUTI, 2005). São exemplos de antagonistas da integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ o eptifibatide, um peptídeo cíclico baseado na sequência KGD da desintegrina Barbourin, e o abciximab, um fragmento de anticorpo monoclonal dirigido contra a integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$, que tem seu uso limitado pela imunogenicidade (TOPOL *et al.*, 1999; GOMES *et al.*, 2000; RANG *et al.*, 2004).

Considerando o fato da enzima BmooMP α -II ter sido capaz de inibir a agregação plaquetária induzida por diversos agonistas, sugere-se que a enzima atue em um ou mais receptores plaquetários envolvidos na agregação induzida pelo ADP, colágeno, ristocetina e epinefrina. Um possível mecanismo de ação da BmooMP α -II é o antagonismo à integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$. Entretanto, há a necessidade de mais estudos para que sejam esclarecidas as vias de inibição da agregação plaquetária e a estrutura da BmooMP α -II. Investigações a respeito dessa enzima, incluindo a expressão da toxina recombinante ou do fragmento específico, podem contribuir para estudos básicos da função plaquetária e para o desenvolvimento de modelos de novos fármacos. Além disso, é possível que a investigação da BmooMP α -II em células tumorais leve a resultados promissores para a terapêutica antitumoral.

4 CONCLUSÃO

Uma nova SVMP, denominada BmooMP α -II (25kDa em condições redutoras), foi purificada da peçonha de *B. moojeni*. Os resultados indicam que essa enzima é uma α -fibrinogenase que pertence à classe PI das SVMPs. A BmooMP α -II não apresentou atividades hemorrágica, coagulante ou anticoagulante. Essa enzima também não apresentou efeitos edematogênico e hiperalgésico significantes. A BmooMP α -II induziu alterações histológicas relevantes nos pulmões, rins, fígado e músculo. Além disso, a nova protease inibiu a agregação plaquetária induzida por ADP, colágeno, epinefrina e ristocetina. Quando desnaturada por altas temperaturas, a BmooMP α -II apresentou ação inibitória mais rápida. Enfim, os resultados apontam a BmooMP α -II como um potente inibidor da agregação plaquetária.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDREWS, R.K., BERNDT, M.C. Snake venom modulators of platelet adhesion receptors and their ligands. **Toxicon**, v.38, p.775-791, 2000.

ANDREWS, R.K.; GARDINER, E.E.; ASAZUMA, N.; BERLANGA, O.; TULASNE, D.; NIESWANDT, B.; SMITH, A.I.; BERNDT, M.C.; WATSON, S.P. A novel viper venom metalloproteinase, alborhagin, is an agonist at the platelet collagen receptor GPVI. **The Journal of Biological Chemistry**, v.276, p.28092-28097, 2001.

ANDREWS, R.K.; BERNDT, M.C. Platelet physiology and thrombosis. **Thrombosis Research**, v.114, p.447-453, 2004.

ANGULO, Y.; LOMONTE, B. Biochemistry and toxicology of toxins purified from the venom of the snake *Bothrops asper*. **Toxicon**, v.54, p.949-957, 2009.

BARRETT, A.J.; RAWLINGS, N.D. Families and clans of serine peptidases. **Archives Biochemistry Biophysics**, v.318, p.247-250, 1995.

BELLO, C.A.; HERMOGENES, A.L.N.; MAGALHAES, 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, p.189-200, 2006.

BENNETT, J.S.; BERGER, B.W.; BILLINGS, P.C. The structure and function of platelet integrins. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v.7, p.200-205, 2009.

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

BERNARDI, P.S.; MOREIRA, H.W. Análise dos traçados de ondas da agregação plaquetária em pacientes com doenças cardiovasculares em uso do ácido acetil salicílico comparados a doadores de sangue. **Revista Brasileira de Hematologia Hemoterapia**, v.26, p.239-244, 2004.

BÉRNILS, R.S. (org.). 2010. Brazilian reptiles – List of species. **Sociedade Brasileira de Herpetologia**. Disponível em: <<http://www.sbherpetologia.org.br/>>. Acesso em: 07 mar. 2011.

BJARNASON, J.B.; FOX, J.W. Hemorrhagic metalloproteinases from snake-venoms. **Pharmacology & Therapeutics**, v.62, p.325-372, 1994.

BOCHNER, R.; STRUCHINER, C. J. Epidemiologia dos acidentes ofídicos nos últimos 100 anos no Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v.19, p.7-16, 2003.

BODE, W.; GOMIS-RÜTH, F.X.; STÖCKLER, 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 LETTERS**, v.331, p.134-140, 1993.

BOER-LIMA, P.A.; GONTIJO, J.A.R.; CRUZ-HÖFLING, M.A. Histologic and functional renal alterations caused by *Bothrops moojeni* snake venom in rats. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.61, p.698-706, 1999.

BORKOW, G.; GUTIÉRREZ, J.M.; OVADIA, M. Inhibition of toxic activities of *Bothrops asper* venom and other crotalid snake venoms by a novel neutralizing mixture. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v.147, p.442-447, 1997.

BRAUD, S.; BON, C.; WISNER, A. Snake venom proteins acting on hemostasis. **Biochimie**, v.82, p.851-859, 2000.

CALGAROTTO, A.K.; DAMICO, D.C.S.; PONCE-SOTO, L.A.; BALDASSO, P.A.; SILVA, S.L.; SOUZA, G.H.M.F.; EBERLIN, M.N.; MARANGONI, S. Biological and

biochemical characterization of new basic phospholipase A₂ BmTX-I isolated from *Bothrops moojeni* snake venom. **Toxicon**, v.51, p.1509-1519, 2008.

CALVETE, J.J.; MORENO-MURCIANO, M.P.; THEAKSTON, D.G.; KISIEL, D.G.; MARCINKIEWICZ, C. Snake venom disintegrins: novel dimeric disintegrins and structural diversification by disulphide bond engineering. **Biochemical Journal**, v.372, p.725-734, 2003.

CALVETE, J.J.; MARCINKIEWICZ, C.; MONLEÓN, D.; ESTEVE, V.; CELDA, B.; JUÁREZ, P.; SANZ, L. Snake venom disintegrins: evolution of structure and function. **Toxicon**, v.45, p.1063-1074, 2005.

CALVETE, J.J. Venomics: Digging into the evolution of venomous systems and learning to twist nature to fight pathology. **Journal of proteomics**, v.72, p.121-126, 2009.

CAMPBELL, J.A.; LAMAR, W.W. **The venomous reptiles of Latin America**. Ithaca: Cornell University Press, 1989, 425p.

CHIPPAUX, J.P.; WILLIAMS, V.; WHITE, J. Snake venom variability: methods of study, results and interpretation. **Toxicon**, v.29, p.1279-1303, 1991.

COMINETTI, M.R. **Estudo dos efeitos metaloproteases/desintegrinas isoladas do veneno da serpente *Bothrops alternatus* sobre a adesão celular e expressão gênica**. Tese (Doutorado em Ciências Fisiológicas) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2004.

COSTA, J.O.; BALDO, C.; HAMAGUCHI, A.; HOMSI-BRANDEBURGO, M.I.; OLIVEIRA, F. Purificação de uma enzima fibrinogenolítica da peçonha da serpente *Bothrops alternatus*. **Bioscience Journal**, v.19, p.147-153, 2003.

COSTA, F.L.S.; RODRIGUES, R.S.; IZIDORO, L.F.M.; MENALDO, D.L.; HAMAGUCHI, A.; HOMSI-BRANDEBURGO, M.I.; FULY, A.L.; SOARES, S.G.; SELISTRE-DE-ARAÚJO, H.S.; BARRAVIERA, B.; SOARES, A.M.; RODRIGUES, V.M. Biochemical and

functional properties of a thrombin-like enzyme isolated from *Bothrops pauloensis* snake venom. **Toxicon**, v.54, p.725-35, 2009.

COSTA, J.O.; FONSECA, K.C.; MAMEDE, C.C.N.M.; BELETTI, M.E.; SANTOS-FILHO, N.A.; SOARES, A.M.; ARANTES, E.C.; HIRAYAMA, S.N.S.; SELISTRE-DE-ARAÚJO, H.S.; FONSECA, F.; HENRIQUE-SILVA, F.; PENHA-SILVA, N.; OLIVEIRA, F. Bhalternin: Functional and structural characterization of a new thrombin-like enzyme from *Bothrops alternatus* snake venom. **Toxicon**, v.55, p.1365-1377, 2010a.

COSTA, J.O.; FONSECA, K.C.; GARROTE-FILHO, M.S.; CUNHA, C.C.; FREITAS, M.V.; SILVA, H.S.; ARAÚJO, R.B.; PENHA-SILVA, N.; OLIVEIRA, F. Structural and functional comparison of proteolytic enzymes from plant latex and snake venoms. **Biochimie**, v.92, p.1760-1765, 2010b.

DAMICO, D.C.S.; NASCIMENTO, J.M.; LOMONTE, B.; PONCE-SOTO, L.A.; JOAZEIRO, P.P.; NOVELLO, J.C.; MARANGONI, S.; COLLARES-BUZATO, C.B. Cytotoxicity of *Lachesis muta muta* snake (bushmaster) venom and its purified basic phospholipase A₂ (LmTX-I) in cultured cells. **Toxicon**, v.49, p.678-692, 2007.

DARDIK, R.; KAUFMANN, Y.; SAVION, N.; ROSENBERG, N.; SHENKMAN, B.; VARON, D. Platelets mediate tumor cell adhesion to the subendothelium under flow conditions: involvement of platelet GPIIb-IIIa and tumor cell α_v integrins. **International Journal of Cancer**, v.70, p.201-207, 1997.

DU, X.Y.; CLEMETSON, J.M.; NAVDAEV, A.; MAGNENAT, E.M.; WELLS, T.N.C.; CLEMETSON, K.J. Ophioluxin, a Convulxin-like C-type Lectin from *Ophiophagus hannah* (King Cobra) Is a Powerful Platelet Activator via Glycoprotein VI. **The Journal of Biological Chemistry**, v.277, p.35124-35132, 2002.

DU, X.Y.; SIM, D.S.; LEE, W.H.; ZHANG, Y. Blood cells as targets of snake toxins. **Blood Cells, Molecules, and Diseases**, v.36, p.414-421, 2006.

DUTRA, N.C.L.; TELLES, M.P.C.; DUTRA, D.L.; SILVA Jr., N.J. Genetic diversity in populations of the viper *Bothrops moojeni* Hoge, 1966 in Central Brazil using RAPD markers. **Genetics and Molecular Research**, v.7, p.603-613, 2008.

EBLE, J.A. Matrix biology meets toxinology. **Matrix Biology**, v.29, p.239-247, 2010.

EDITORIAL. 'Venomics' or: The venomous systems genome project. **Toxicon**, v.47, p.255-259, 2006.

FELDING-HABERMANN, B. Targeting Tumor Cell-Platelet Interaction in Breast Cancer Metastasis. **Pathophysiology of Haemostasis and Thrombosis**, v.33, p.56-58, 2003.

FENWICK, A.M.; GUTBERLET Jr., R.L.; EVANS, J.A.; PARKINSON, C.L. Morphological and molecular evidence for phylogeny and classification of South American pitvipers, genera *Bothrops*, *Bothriopsis*, and *Bothrocophias* (Serpentes: Viperidae). **Zoological Journal of the Linnean Society**, v.156, p.617-640, 2009.

FOX, J.W.; SERRANO, S.M.T. Structural considerations of the snake venom metalloproteinases, key members of the M12 reprotolysin family of metalloproteinases, **Toxicon**, v.45, p.969-985, 2005.

FOX, J.W.; SERRANO, S.M.T. Insights into and speculations about snake venom metalloproteinase (SVMP) synthesis, folding and disulfide bond formation and their contribution to venom complexity. **FEBS Journal**, v.275, p.3016-3030, 2008.

FOX, J.W.; SERRANO, S.M.T. Timeline of key events in snake venom metalloproteinase research. **Journal of Proteomics**, v.72, p.200-209, 2009.

FRANÇA, F.O.S.; MÁLAQUE, C.M.S. Acidente Botrópico. In: CARDOSO, J.L.C.; FRANÇA, F.O.S.; WEN, F.H.; MALAQUE, C.M.S.; HADDAD JUNIOR, V. **Animais Peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes**, 2003, p.72-86.

FRANCISCHETTI, I.M.B.; CASTRO, H.C.; ZINGALI, R.B.; CARLINI, C.R.; GUIMARÃES, J.A. *Bothrops* sp. Snake Venoms: Comparison of Some Biochemical and

Physicochemical Properties and Interference in Platelet Functions. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v.119C, p.21-29, 1998.

FULY, A.L.; SOARES, A.M.; MARCUSSI,S.; GIGLIO, J.R.; GUIMARÃES, J.A. Signal transduction pathways involved in the platelet aggregation induced by a D-49 phospholipase A₂ isolated from *Bothrops jararacussu* snake venom. **Biochimie**, v.86, p.731-739, 2004.

FUNASA- FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE. **Manual de Diagnóstico e Tratamento de Acidentes por Animais Peçonhentos**. 2ª ed. Brasília: Ministério da Saúde. 2001, 120p.

GACHET, C. The platelet P2 receptors as molecular targets for old and new antiplatelet drugs. **Pharmacology & Therapeutics**, v.108, p.180-192, 2005.

GAWAZ, M. Role of platelets in coronary thrombosis and reperfusion of ischemic myocardium. **Cardiovascular Research**, v.61, p.498-511, 2004.

GAY, C.C.; LEIVA, L.C.; MARUÑAK, S.; TEIBLER, P.; PÉREZ, O.A. Proteolytic, edematogenic and myotoxic activities of a hemorrhagic metalloproteinase isolated from *Bothrops alternatus* venom. **Toxicon**, v.46, p.546-554, 2005.

GENE, J.A., ROY, A., ROJAS, G., GUTIÉRREZ, J.M., CERDAS, L. Comparative study on coagulant, defibrinating, fibrinolytic and fibrinogenolytic activities of Costa Rican crotaline snake venoms and their neutralization by a polyvalent antivenom. **Toxicon**, v.27, p.841-848, 1989.

GOMES, M.E.W; FABRIS, C.; FILHO, J.L.B.; DREHER, R.; ROSITO, G.A. Antagonistas do receptor plaquetário GPIIb/IIIa. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v.46, p.255-264, 2000.

GOMES, M.S.R.; MENDES, M.M.; OLIVEIRA, F.; ANDRADE, R.M; BERNARDES, C.P.; HAMAGUCHI, A.; ALCÂNTARA, T.M.; SOARES, A.M.; RODRIGUES, V.M.; HOMSI-BRANDEBURGO, M.I. BthMP: a new weakly hemorrhagic metalloproteinase from *Bothrops moojeni* snake venom. **Toxicon**, v.53, p.24-32, 2009.

GOMES, M.S.R.; QUEIROZ, M.R.; MAMEDE, C.C.N; MENDES, M.M.; HAMAGUCHI, A.; HOMSI-BRANDEBURGO, M.I; SOUSA, M.V.; AQUINO, E.N.; CASTRO, M.S; OLIVEIRA, F.; RODRIGUES, V.M. Purification and functional characterization of a new metalloproteinase (BleucMP) from *Bothrops leucurus* snake venom. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part C**, v.153, p.290-300, 2011.

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, p.120-134, 2007.

GUTIÉRREZ, J.M.; RUCAVADO, A. Snake venom metalloproteinases: Their role in the pathogenesis of local tissue damage. **Biochimie**, v.82, p.841-850, 2000.

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

GUTIÉRREZ, J.M.; RUCAVADO, A.; CHAVES, F.; DÍAZ, C.; ESCALANTE, T. Experimental pathology of local tissue damage induced by *Bothrops asper* snake venom. **Toxicon**, v.54, p.958-975, 2009.

HANKEY, G.J.; EIKELBOOM, J.W. Aspirin resistance. **The Lancet**, v.367, p.606-617, 2006.

HOURANI, S.M.O.; CUSACK, N.J. Pharmacological receptors on blood platelets. **Pharmacological Reviews**, v.43, p.243-298, 1991.

ITZHAKI, R.F.; GILL, D.M. A micro-biuret method for estimating proteins. **Analytical Biochemistry**, v.9, p.401-410, 1964.

JURK, K.; KEHREL, B.E. Platelets: Physiology and Biochemistry. **Seminars in thrombosis and hemostasis**, v.31, p.381-392, 2005.

KAMIGUTI, A.S.; ZUZEL, M.; THEAKSTON, R.D.G. Snake venom metalloproteinases and disintegrins: interactions with cells. **Brazilian Journal of Medical Biological Research**, v.31, p.853-862, 1998.

KAMIGUTI, A.S. Platelets as targets of snake venom metalloproteinases. **Toxicon**, v.45, p.1041-1049, 2005.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v.227, p.680-689, 1970.

LAING, G.D.; MOURA-DA-SILVA, A.M. Jararhagin and its multiple effects on hemostasis. **Toxicon**, v.45, p.987-996, 2005.

LALLOO, D. Venomous bites and stings. **The Medicine Publishing Company Ltd**, v.33, p.74-76, 2005.

LOCK, B. Venomous Snake Restraint and Handling. **Journal of Exotic Pet Medicine**, v.17, p.273-284, 2008.

LOPES, P.H. **Alterações locais induzidas pela secreção tóxica de *Philodryas patagoniensis* (Girard, 1857) (Serpentes: Colubridae)**. Dissertação (Mestrado em Ciências, Fisiologia Geral) – Departamento de Fisiologia, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

LORDKIPANIDZÉ, M.; PHARAND, C.; PALISAITIS, D.A.; SCHAMPAERT, E.; DIODATI, J.G. Insights into the interpretation of light transmission aggregometry for evaluation of platelet aggregation inhibition by clopidogrel. **Thrombosis Research**, v.124, p.546-553, 2009.

LU, Q.; CLEMETSON, J.M.; CLEMETSON, K.J. Snake venoms and hemostasis. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v.3, p.1791-1799, 2005.

MAGALHÃES, A.; MAGALHÃES, H.P.B. RICHARDSON., M.; GONTIJO, S.; FERREIRA, R.N.; ALMEIDA, A.P.; SANCHEZ, E.F. Purification and properties of a

coagulant thrombin-like enzyme from the venom of *Bothrops leucurus*. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part A**, v.146, p.565-575, 2007.

MARCUSSI, S.; BERNARDES, C.P.; SANTOS-FILHO, N.A.; MAZZI, M.V.; OLIVEIRA, C.Z.; IZIDORO, L.F.M.; FULY, A.L.; MAGRO, A.J.; BRAZ, A.S.K.; FONTES, M.R.M.; GIGLIO, J.R.; SOARES, A.M. Molecular and functional characterization of a new non-hemorrhagic metalloprotease from *Bothrops jararacussu* snake venom with antiplatelet activity. **Peptides**, v.28, p.2328-2339, 2007.

MARKLAND, F.S. Snake venoms and the hemostatic system. **Toxicon**, v.36, p.1749-1800, 1998.

MARKLAND, F.S.; SHIEH, K.; ZHOU, Q.; GOLUBKOV, V.; SHERWIN R.P.; RICHTERS, V.; SPOSTO, R. A novel snake venom disintegrin that inhibits human ovarian cancer dissemination and angiogenesis in an orthotopic nude mouse model. **Haemostasis**, v.31, p.183-91, 2001.

MARSH, N.; WILLIAMS, V. Practical applications of snake venom toxins in haemostasis. **Toxicon**, v.45, p.1171-1181, 2005.

MARTINS, M., MARQUES, O.A.V. & SAZIMA, I. Ecological and phylogenetics correlates of feeding Habits in neotropical pitvipers of the Genus *Bothrops*. **Biology of the Vipers**. In: SCHUETT, G.W.; HÖGGREN, M.; DOUGLAS, M.E.; GREENE, H.W. (Org.). Eagle Mountain Publishing, Eagle Mountain, 2002, p.307-328.

MATSUI, T.; FUJIMURA, Y.; TITANI, K. Snake venom proteases affecting hemostasis and thrombosis. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1477, p.146-156, 2000.

MEBS, D.; OWNBY, C.L. Myotoxic components of snake venoms: their biochemical and biological activities. **Pharmacology & Therapeutics**, v.48, p.223-236, 1990.

MORINE, N.; MATSUDA, S.; TERADA, K.; ETO, A.; ISHIDA, I.; OKU, H. Neutralization of hemorrhagic snake venom metalloproteinase HR1a from *Protobothrops flavoviridis* by human monoclonal antibody. **Toxicon**, v.51, p.345-352, 2008.

NASCIMENTO, N.G.; SAMPAIO, M.C.; OLIVO, R.A.; TEIXEIRA, C. Contribution of mast cells to the oedema induced by *Bothrops moojeni* snake venom and a pharmacological assessment of the inflammatory mediators involved. **Toxicon**, v.55, p.343-352, 2010.

NIESWANDT, B.; VARGA-SZABO, D.; ELVERS, M. Integrins in platelet activation. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v.7, p.206-209, 2009.

NIKAI, T.; MORI, N.; KISHIDA, M.; SUGIHARA, H.; TU, A. T. Isolation and biochemical characterization of hemorrhagic toxin from the venom of *Crotalus atrox*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.321, p.309-319, 1984.

NOGUEIRA, C.; SAWAYA, R.J.; MARTINS, M. Ecology of the Pitviper, *Bothrops moojeni*, in the Brazilian Cerrado. **Journal of Herpetology**, v.37, p.653-659, 2003.

OLIVEIRA, F. **Novas proteases da peçonha de *Bothrops moojeni* (Caiçaca): Purificação de quatro isoformas de fibrinogenases (Bthas) e caracterização bioquímica da BthTl.** Tese (Doutorado em Ciências Biológicas – Biologia Molecular) - Universidade de Brasília, Brasília, 2001.

OLIVEIRA, D.G.L.; MURAKAMI, M.T.; CINTRA, A.C.O.; FRANCO, J.J.; SAMPAIO, S.V.; ARNI, R.K. Functional and structural analysis of two fibrinogen-activating enzymes isolated from the venoms of *Crotalus durissus terrificus* and *Crotalus durissus collilineatus*, **Acta Biochimica et Biophysica Sinica**, v.41, p.21-29, 2009.

QUEIROZ, M.R.; MAMEDE, C.C.; FONSECA, K.C.; CANABRAVA, L.C.M.N.; FRANÇA, L.V.; SILVA, M.C.; STANZIOLA, L.; BELETTI, M.E.; CANABRAVA, H.A.N.; OLIVEIRA, F. **The Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v.17, p.49-58, 2011.

RA, H.J.; PARKS, W.C. Control of matrix metalloproteinase catalytic activity. **Matrix Biology**, v.26, p.587-596, 2007.

RÁDIS-BAPTISTA, G. Integrins, cancer and snake toxins. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v.11, p.217-241, 2005.

RAMOS, O.H.P.; SELISTRE-DE-ARAÚJO, H.S. Snake venom metalloproteases - structure and function of catalytic and disintegrin domains. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part C**, v.142, p.328-346, 2006.

RANDALL, L.O, SELITTO, J.J. A method for measurement of analgesic activity of inflamed tissue. **Archives internationales de pharmacodynamie et de thérapie**, v.111, p.409-419, 1957.

RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M.; MOORE, P.K. **Farmacologia**. 5ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2004.

RODRIGUES, V.M.; SOARES, A.M.; GUERRA-SÁ, R.; RODRIGUES, V.; FONTES, M.R.M.; GIGLIO, J.R. Structural and Functional Characterization of Neuwiedase, a Nonhemorrhagic Fibrin(ogen)olytic Metalloprotease from *Bothrops neuwiedi* Snake Venom. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.381, p.213-224, 2000.

RODRIGUES, V.M.; SOARES, A.M.; ANDRIÃO-ESCARSO, S.H.; FRANCESCHI, A.M.; RUCAVADO, A.; GUTIÉRREZ, J.M.; GIGLIO, J.R. Pathological alterations induced by neuwiedase, a metalloproteinase isolated from *Bothrops neuwiedi* snake venom. **Biochimie**, v.83, 471-479, 2001.

RUSSELL, F.E. Venomous animal injuries. **Current Problems in Pediatrics**, v.3, p.3-47, 1973.

RUSSELL, F.E. The clinical problem of crotalid snake venom poisoning. In: LEE, C.Y. **Snake venoms. Handbook experimental pharmacology**, v.52, 1979, p.978-996.

SAJEVIC, T.; LEONARDI, A.; KRIZAJ, I. Haemostatically active proteins in snake venoms. **Toxicon**, v.57, p.627-645, 2011.

SANCHEZ, E.F.; SCHNEIDER, F.S.; YARLEQUE, A.; BORGES, M.H.; RICHARDSON, M.; FIGUEIREDO, S.G.; EVANGELISTA, K.S.; EBLE, J.A. The novel metalloproteinase atroxlysin-I from Peruvian *Bothrops atrox* (Jergón) snake venom acts both on blood vessel ECM and platelets. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.496, p.9-20, 2010.

SAVAGE, B.; CATTANEO, M.; RUGGERI, Z.M. Mechanisms of platelet aggregation. **Hemostasis and thrombosis**, v.8, p.270-276, 2001.

SAWAYA, R.J.; MARQUES, O.A.V.; MARTINS, M. Composição e história natural das serpentes de Cerrado de Itirapina, São Paulo, sudeste do Brasil. **Biota Neotropica**, v.8, p.127-149, 2008.

SCARBOROUGH, R.M.; ROSE, J.W.; HSU, M.A.; PHILLIPS, D.R.; FRIED, V.A.; CAMPBELL, A.M.; NANNIZZI, L.; CHARO, I.F. Barbourin. A GPIIb-IIIa-specific integrin antagonist from the venom of *Sistrurus m. barbouri*. **The Journal of Biological Chemistry**, v.266, p.9359-9362, 1991.

SELISTRE-DE-ARAÚJO, H.S.; PONTES, C.L.S.; MONTENEGRO, C.F.; MARTIN, A.C.B.M. Review: Snake Venom Disintegrins and Cell Migration. **Toxins**, v.2, p.2606-2621, 2010.

SERRANO, S.M.T.; MAROUN, R.C. Snake venom serine proteinases: sequence homology vs. substrate specificity, a paradox to be solved. **Toxicon**, v.45, p.1115-1132, 2005.

SHIMOKAWA, K.; JIA, L.G.; WANG, X.M.; FOX, J.W. Expression, activation and processing of the recombinant snake venom metalloproteinase, pro-atrolysin E. **Archives Biochemistry Biophysics**, v.335, p.283-294, 1996.

SHLANSKY-GOLDBERG, R. Platelet Aggregation Inhibitors for Use in Peripheral Vascular Interventions: What Can We Learn from the Experience in the Coronary Arteries? **Journal of vascular and Interventional Radiology**, v.13, p.229-246, 2002.

SILVA, M.B.; SCHATNER, M.; RAMOS, C.R.R.; JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO, I.L.M.; GUARNIERI, M.C.; LAZZARI, M.A.; SAMPAIO, C.A.M.; POZNER, R.G.; VENTURA, J.S.; HO, P.L.; CHUDZINSKI-TAVASSI, A.M. A prothrombin activator from *Bothrops erythromelas* (jararaca-da-seca) snake venom: characterization and molecular cloning. **Biochemical Journal**, v.369, p.129-139, 2003.

SINGLETERY, E.M.; ROCHMAN, A.S.; BODMER, J.C.A.; HOLSTEGE, C.P. Envenomations. **The Medical Clinics of North America**, v.89, p.1195-1224, 2005.

SOARES, A.M.; MARCUSSI, S.; STÁBELI, R.G.; FRANÇA, S.C.; GIGLIO, J.R.; WARD, R.J.; ARANTES, E.C. Structural and functional analysis of BmjMIP, a phospholipase A₂ myotoxin inhibitor protein from *Bothrops moojeni* snake plasma. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.302, p.193-200, 2003.

SOARES, A.M.; SESTITO, W.P.; MARCUSSI, S.; STÁBELI, R.G.; ANDRIÃO-ESCARSO, S.H.; CUNHA, O.A.B.; VIEIRA, C.A.; GIGLIO, J.R. Alkylation of myotoxic phospholipases A₂ in *Bothrops moojeni* venom: a promising approach to an enhanced antivenom production. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v.36, p.258-270, 2004.

STÁBELI, R.G.; AMUI, S.F.; SANT'ANA, C.D.; PIRES, M.G.; NOMIZO, A.; MONTEIRO, M.C.; ROMÃO, P.R.T.; GUERRA-SÁ, R.; VIEIRA, C.A.; GIGLIO, J. R.; FONTES, M.R.M.; SOARES, A.M. *Bothrops moojeni* myotoxin-II, a Lys49-phospholipase A₂ homologue: an example of function versatility of snake venom proteins. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v.142, p.371-381, 2006.

STROKA, A.; DONATO, J.L.; BON, C.; HYSLOP, S.; ARAÚJO, A.L. Purification and characterization of a hemorrhagic metalloproteinase from *Bothrops lanceolatus* (Fer-de-lance) snake venom. **Toxicon**, v.45, p.411-420, 2005.

SWENSON, S.; MARKLAND JR., F. S. Snake venom fibrin(ogen)olytic enzymes. **Toxicon**, v.45, p.1021-1039, 2005.

TEIXEIRA, C.F.P; LANDUCCI, E.C.T.; ANTUNES, E.; CHACUR, M.; CURY, Y. Inflammatory effects of snake venom myotoxic phospholipases A₂. **Toxicon**, v.42, p.947-962, 2003.

TEIXEIRA, C.; CURY, Y.; MOREIRA, V.; PICCOLO, G.; CHAVES, F. Inflammation induced by *Bothrops asper* venom. **Toxicon**, v.54, p.67-76, 2009.

TOPOL, E.J.; BYZOVA, T.V.; PLOW, E.F. Platelet GPIIb-IIIa blockers. **The Lancet**, v.353, p.227-231, 1999.

TORRES, F.S. **Purificação e caracterização bioquímica parciais de uma fração fibrinogenolítica presente na peçonha da serpente Bothrops moojeni (HOGE, 1965; Viperidae)**. Dissertação (Mestrado em Bioquímica e Imunologia) - Departamento de Bioquímica e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2007.

TÖRÜNER, M. Aspirin and gastrointestinal toxicity. **The Anatolian Journal of Cardiology**, v.7, p.27-30, 2007.

VERSTRAETE, M.; ZOLDHELYI, P. Novel antithrombotic drugs in development. **Drugs**, v.49, p.856-884, 1995.

VILCA-QUISPE, A.; PONCE-SOTO, L.A.; WINCK, F.V.; MARANGONI, S. Isolation and characterization of a new serine protease with thrombin-like activity (TLBm) from the venom of the snake *Bothrops marajoensis*. **Toxicon**, v.55, p.745-753, 2010.

WARD, C.M.; ANDREWS, R.K.; SMITH, A.I.; BERNDT, M.C. Mocarhagin, a Novel Cobra Venom Metalloproteinase, Cleaves the Platelet von Willebrand Factor Receptor Glycoprotein Iba. Identification of the Sulfated Tyrosine/Anionic Sequence Tyr-276-Glu-282 of Glycoprotein Iba as a Binding Site for von Willebrand Factor and α -Thrombin. **Biochemistry**, v.35, p.4929-4938, 1996.

WIJEYEWICKREMA, L.C.; BERNDT, M.C.; ANDREWS, R.K. Snake venom probes of platelet adhesion receptors and their ligands. **Toxicon**, v.45, p.1051-1061, 2005.

YANG, R.S.; TANG, C.H.; CHUANG, W.J.; HUANG, T.H.; PENG, H.C.; HUANG, T.F.; FU, W.M. Inhibition of tumor formation by snake venom disintegrin. **Toxicon**, v.45, p.661-669, 2005.

ZHOU, Q.; DANGELMAIER, C.; SMITH, J.B. The hemorrhagin Catrocollastatin inhibits collagen-induced platelet aggregation by binding to collagen via its disintegrin-like domain. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.219, p.720-726, 1996.

ZHU, L.; YUAN, C.; CHEN, Z.; WANG, W.; HUANG, M. Expression, purification and characterization of recombinant Jerdonitin, a P-II class snake venom metalloproteinase comprising metalloproteinase and disintegrin domains. **Toxicon**, v.55, p.375-380, 2010.

ZUG, G.R.; VITT, L.J.; CALDWELL, J.P. **Herpetology - An introductory biology of amphibians and reptiles**. 2^a ed. San Diego: Academic Press. 2001, 645p.

ZYCHAR, B.C.; DALE, C.S.; DEMARCHI, D.S.; GONÇALVES, L.R.C. Contribution of metalloproteases, serine proteases and phospholipases A₂ to the inflammatory reaction induced by *Bothrops jararaca* crude venom in mice. **Toxicon**, v.55, p.227-234, 2010.