

MATHEUS PHILIPPE TEIXEIRA DE SENA

**CARACTERIZAÇÃO CINÉTICA DA PROTEASE
TROMBICA PRESENTE NO VENENO DE *Bothrops
leucurus*: LEUCUROBINA.**

**BELO HORIZONTE
FACULDADE DE FARMÁCIA/UFMG**

2006

MATHEUS PHILIPPE TEIXEIRA DE SENA

CARACTERIZAÇÃO CINÉTICA DA PROTEASE TROMBICA PRESENTE NO
VENENO DE *Bothrops leucurus*: LEUCUROBINA

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação, em Ciências Farmacêuticas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Henrique Pimenta Barroso Magalhães

Belo Horizonte
Faculdade de Farmácia - UFMG
2006

S474c Sena, Matheus Philippe Teixeira de.
Caracterização cinética da protease trombica presente no veneno de *Bothrops leucurus* : leucurobina / Matheus Philippe Teixeira de Sena. – 2006.
106 f. : il.

Orientador: Prof. Dr. Henrique Pimenta Barroso Magalhães.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Farmácia.

1. Cinética de enzimas – Teses. 2. Sangue – Coagulação – Teses. 3. Enzimas – Análise – Teses. 4. Venenos - Análise – Teses.
I. Título. II. Magalhães, Henrique Pimenta Barroso. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Farmácia.

CDD: 616.15

**À VIDA e tudo o que a envolve: a sua origem,
a química, a física, o universo, o tempo, tudo
que faz deste mundo um mistério delicioso.**

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Henrique Pimenta Barroso Magalhães, meu orientador, que se mostrou aberto e confiante em meu trabalho desde o primeiro momento.

À minha mãe, Farid, que sempre sofria quando eu saía sozinho para atravessar estas estradas de Minas.

Ao meu pai, Nelsinho, que, mesmo silenciosamente, admirou o meu esforço e determinação nesta empreitada.

Aos dois, conjuntamente, por nunca faltarem para mim e por sempre me deixarem ir onde meus anseios me levavam.

Ao meu irmão, Túlio, meu camarada, de tapas e beijos, por tudo, mas principalmente pelo modelo de tranqüilidade.

À minha irmãzinha querida, Manuela, pela risada deliciosa, que passou pelo mesmo que eu, com um agravante: estava longe de casa.

À Bruna, que apareceu de repente, sem avisar, me tomou o coração e que agora caminha comigo.

À Professora Airmária Teixeira, do UnilesteMG, minha colega de trabalho, que tristemente nos deixou, e que sempre me deu suporte para concluir este trabalho.

Aos amigos todos, que são muitos, pelas curtições, pelas risadas, pelas cervejas, etc...

À Rose, minha amiga da Secretaria de Pós-Graduação, pessoa de extrema boa vontade e que torce bastante por todos os alunos que por lá passam.

À Professora Maria das Graças Carvalho, do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da FAFAR-UFMG, sempre muito solícita, e quem primeiro me incentivou a cursar esta pós-graduação.

Aos professores e colegas de Curso, que dividiram comigo seu espaço e seu tempo.

E por último, à Universidade Federal de Minas Gerais, que já me acolhe desde 1994, onde cresci, aprendi e vivi grandes experiências.

SENA, M. P. T. Caracterização cinética da protease trombica presente no veneno de *Bothrops leucurus*: leucurobina. 2006. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de Minas Gerais

RESUMO

Neste trabalho foram obtidos mais dados sobre a leucurobina, enzima semelhante à trombina presente no veneno de *Bothrops leucurus*, serpente muito comum no Nordeste brasileiro. Foram determinados parâmetros cinéticos (K_M , k_{cat} , k_{cat}/K_M) sobre diversos substratos cromogênicos do tipo peptidil-pNA. Além disto foi avaliada a atividade coagulante da leucurobina sobre plasma humano e sobre fibrinogênio bovino purificado. A leucurobina apresentou atividade amidásica sobre substratos contendo um resíduo de Arg em P1. O melhor substrato cromogênico testado foi D-Phe-L-Pro-L-Arg-pNA. A atividade amidásica da leucurobina sobre D-Phe-L-Pro-L-Arg-pNA foi inibida por sódio, potássio, cálcio e magnésio. A leucurobina apresentou forte atividade coagulante *in vitro* sobre plasma humano citratado e sobre fibrinogênio bovino purificado. A atividade coagulante sobre fibrinogênio bovino foi inibida na presença de sódio e potássio, mas não na presença de cálcio e magnésio. A fração glicídica da leucurobina nativa não interferiu na sua atividade amidásica nem na sua atividade coagulante *in vitro*.

Palavras-chave: caracterização cinética; substratos sintéticos, protease trombica, coagulação, *Bothrops leucurus*.

SENA, M. P. T. Kinetic characterization of snake venom thrombin-like from *Bothrops leucurus*: leucurobin. 2006. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de Minas Gerais

ABSTRACT

It was obtained in this work more data about leucurobin, a snake venom thrombin-like enzyme from *Bothrops leucurus*, very common in Brazilian Northeast. The kinetic parameters K_M , k_{cat} , k_{cat}/K_M over p-nitroanilin chromogenic substrates was determined. The coagulant activity over citrated human plasma and purified bovine fibrinogen was evaluated. Leucurobin has amidasic activity over substrates with L-Arg in P1 position. The best chromogenic substrate was D-Phe-L-Pro-L-Arg-pNA. The amidasic activity over D-Phe-L-Pro-L-Arg-pNA was inhibited in presence of Na^+ , K^+ , Ca^{+2} and Mg^{+2} . Leucurobin has strong coagulant activity *in vitro* over citrated human plasma and purified bovine fibrinogen. The coagulant activity *in vitro* over bovine fibrinogen was inhibited in presence of Na^+ and K^+ , but not in presence of Ca^{+2} and Mg^{+2} .

Key-words: Snake venom thrombin-like enzymes; coagulation; kinetic characterization; *Bothrops leucurus*; synthetic substrates.

LISTA DE ABREVIATURAS

FBA	Fibrinopeptídeo A
FPB	Fibrinopeptídeo B
FI, FII...FXIII	Fatores da coagulação (Fator I, Fator II, ..., Fator XIII)
FX-BP's	Proteínas ligadoras de Fator X (FX – binding proteins)
LM-TL	Enzima semelhante à trombina do veneno de <i>Lachesis muta</i> (<i>Lachesis muta</i> thrombin-like enzyme)
PTLM	Protease trombica de <i>Lachesis muta</i>
SVTLE's	Enzimas semelhantes à trombina provenientes de venenos de serpentes (snake venom thrombin-like enzymes)
t-PA	Ativador de plasminogênio humano endógeno (Tissue plasminogen activator)
TSV-PA	Ativador de plasminogênio do veneno de <i>Trimeresurus stejnegeri</i> (<i>Trimeresurus stejnegeri</i> venom plasminogen activator)

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1 - Fatores da coagulação sanguínea e seus sinônimos	05
Tabela 2 - Absorvância em 405 nm em função da concentração de p-Nitroanilina	46
Tabela 3 - Parâmetros cinéticos da leucurobina para os substratos cromogênicos trabalhados	47
Tabela 4 - Valores de K_m para D-Phe-L-Pro-L-Arg-pNA das proteases β -tripsina, trombina bovina e leucurobina	48

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 01 – Cascata da coagulação sanguínea	07
Figura 02 – Serpente <i>Bothrops leucurus</i>	25
Figura 03 – Mimetização de uma seqüência de aminoácidos de um substrato natural por um substrato do tipo peptidil-pNA	29
Figura 04 – Variação da absorvância a 405 nm em função da concentração molar de p-Nitroanilida	46
Figura 05 – Atividade relativa da leucurobina sobre D-Phe-L-Pro-L-Arg-pNA em função da concentração de íons potássio	49
Figura 06 – Atividade relativa da leucurobina sobre D-Phe-L-Pro-L-Arg-pNA em função da concentração de íons sódio	49
Figura 07 – Atividade relativa da leucurobina sobre D-Phe-L-Pro-L-Arg-pNA em função da concentração de íons cálcio	50
Figura 08 – Atividade relativa da leucurobina sobre D-Phe-L-Pro-L-Arg-pNA em função da concentração de íons magnésio	50
Figura 09 – Atividade relativa da leucurobina deglicosilada sobre D-Phe-L-Pro-L-Arg-pNA	51
Figura 10 – Tempos de formação de coágulo de fibrina em plasma humano citratado após adição de leucurobina nativa e leucurobina deglicosilada	52
Figura 11 – Tempos de formação de coágulo de fibrina em solução de fibrinogênio após adição de leucurobina nativa e leucurobina deglicosilada	52
Figura 12 – Tempo de formação de coágulo de fibrina em solução de fibrinogênio bovino após adição de leucurobina nativa em função da concentração de íons potássio	53
Figura 13 – Tempo de formação de coágulo de fibrina em solução de fibrinogênio bovino após adição de leucurobina nativa em função da concentração de íons sódio	53
Figura 14 – Tempo de formação de coágulo de fibrina em solução de fibrinogênio bovino após adição de leucurobina nativa em função da concentração de íons cálcio	54
Figura 15 – Tempo de formação de coágulo de fibrina em solução de fibrinogênio bovino após adição de leucurobina nativa em função da concentração de íons magnésio	54
Figura 16 – Estrutura tridimensional da L-Prolina	59
Figura 17 – Estrutura tridimensional de L-Prolina e L-Leucina	60
Figura 18 – Estrutura tridimensional de L-Leucina e L-Histidina	61
Figura 19 – Estrutura tridimensional de L-Fenilalanina e do grupo Acetil	62
Figura 20 – Estrutura tridimensional de L-Alanina e L-Prolina	63
Figura 21 – Estrutura tridimensional dos grupos Benzoil e Acetil	64
Figura 22 – Estrutura tridimensional de L-Prolina e L-Leucina	66

Figura 23	– Estrutura tridimensional de L-Leucina e L-Histidina	67
Figura 24	– Estrutura tridimensional de L-Alanina e L-Prolina	68
Figura 25	– Estrutura tridimensional de D-Fenilalanina e do grupo acetil	69
Figura 26	– Estrutura tridimensional dos grupos benzoil e acetil	70
Figura 27	– Estrutura tridimensional do substrato cromogênico D-Phe-L-Pro-L-Arg-pNA	73
Figura 28	– Estrutura tridimensional do substrato cromogênico D-Phe-L-Leu-L-Arg-pNA	77
Figura 29	– Interação entre Arg situada em P1 e Asp situado em S1	80
Figura 30	– Etapas da formação do coágulo de fibrina	88

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	III
LISTA DE TABELAS	IV
LISTA DE FIGURAS	V
1 INTRODUÇÃO	01
1.1 Serpentes venenosas	02
1.2 Hemostasia	03
1.3 Atividade sobre a hemostasia de componentes proteicos de venenos de serpente	10
1.4 Venenos de serpente como ferramentas diagnósticas e terapêuticas	16
1.5 Enzimas semelhantes à trombina provenientes de venenos de serpentes	18
1.6 Serpente <i>Bothrops leucurus</i>	24
1.7 Caracterização cinética de proteases trombicas	29
2 JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS	33
3 MATERIAL E MÉTODOS	36
3.1 Material	37
3.2 Equipamentos	39
3.3 Reagentes	39
3.4 Metodologia	41
4 RESULTADOS	45
4.1 Obtenção do coeficiente de extinção molar da p-Nitroanilida a 405 nm	46
4.2 Parâmetros cinéticos da leucurobina obtidos frente aos diversos substratos cromogênicos	47

4.3	Parâmetros cinéticos de β -tripsina, trombina bovina e leucurobina sobre D-Phe-L-Pro-L-Arg-pNA	48
4.4	Atividade amidásica da leucurobina sobre D-Phe-L-Pro-L-Arg-pNA na presença de cátions mono e divalentes	49
4.5	Atividade amidásica da leucurobina deglicosilada sobre D-Phe-L-Pro-L-Arg-pNA	51
4.6	Atividade coagulante da leucurobina nativa e deglicosilada sobre plasma humano citratado	52
4.7	Atividade coagulante da leucurobina nativa e deglicosilada sobre fibrinogênio bovino purificado	52
4.8	Atividade coagulante da leucurobina sobre fibrinogênio bovino na presença de cátions mono e divalentes	53
5	DISCUSSÃO	55
5.1	Considerações acerca das preferências da leucurobina em P1	56
5.2	Considerações sobre os valores de Km obtidos para os diversos substratos	58
5.3	Considerações sobre os valores de Kcat obtidos para os diversos substratos	65
5.4	Considerações gerais sobre os parâmetros cinéticos encontrados para os diversos substratos	70
5.5	D-Phe-L-Pro-L-Arg-pNA é o substrato com maior constante de especificidade (Kcat/Km) para a leucurobina dentre os testados	71
5.6	D-Phe-L-Leu-L-Arg-pNA é o substrato com a segunda maior constante de especificidade (Kcat/Km) para a leucurobina dentre os testados	76
5.7	Considerações acerca da atividade da leucurobina sobre D-Phe-L-Pro-L-Arg-pNA na presença de cátions Na ⁺ , K ⁺ , Mg ⁺² e Ca ⁺²	78

5.8	Considerações a respeito da atividade amidásica da leucurobina deglicosilada	81
5.9	Considerações acerca da atividade coagulante da leucurobina sobre plasma humano citratado	82
5.10	Considerações acerca da atividade coagulante da leucurobina sobre fibrinogênio humano	84
5.11	Considerações finais acerca do centro ativo da leucurobina	90
6	CONCLUSÕES	93
6.1	Quanto à interação S2 - P2	94
6.2	Quanto à interação S3 – P3	94
6.3	Quanto à atividade da leucurobina sobre substratos cromogênicos do tipo peptidil-pNA	94
6.4	Quanto à atividade coagulante in vitro da leucurobina sobre plasma humano citratado	95
6.5	Quanto à atividade coagulante in vitro da leucurobina sobre fibrinogênio bovino purificado	95
6.6	Quanto à semelhança da leucurobina com a trombina	96
6.7	Quanto à semelhança da leucurobina com a batroxobina	96
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	97

1 INTRODUÇÃO

1.1 SERPENTE VENENOSAS

1.1.1 Distribuição Geográfico-Epidemiológica

As serpentes são amplamente distribuídas pelos diversos continentes terrestres, com exceção da Antártida. Os acidentes causados por picadas de serpentes venenosas de diversos gêneros atingem anualmente por volta de 2,5 milhões de pessoas, causando mais de 100.000 mortes (White, 2005; Chippaux, 1998). A maior parte dos acidentes, fatais ou não, ocorrem nas zonas rurais de países tropicais (Lalloo et al., 1995; Laing et al., 1995; Warrell et al., 1999).

São conhecidas mais de 200 espécies de serpentes venenosas, classificadas em diversas famílias: Elapidae, Crotalidae, Hydrophidae e Colubridae (Lu et al., 2005).

1.1.2 Atividades Biológicas dos Venenos de Serpentes

Os venenos de serpentes são fontes riquíssimas de diversas substâncias com atividade biológica. Podemos enumerar dentre elas: histamina e outro alérgenos, poliaminas, alcalóides, bem como diversas proteínas bioativas, dentre elas as serinoproteases, metaloproteinases, fosfolipases A₂, nucleotidases, desintegrinas, lectinas tipo C, além de peptídeos bioativos (Perales et al., 2005; Lu et al., 2005; Calvete et al., 2005). Os venenos destas serpentes são produzidos e acondicionados em glândulas veneníferas especiais, sendo injetados no organismo das vítimas por presas afiadas diferenciadas ligadas às glândulas secretoras e causam danos à vítima de diversas formas (Lu et al., 2005).

Os venenos de serpente atuam especialmente no sistema hemostático, através de proteínas, com atividade enzimática ou não, freqüentemente levando à hemorragia após inoculação na vítima (Marsh et al., 2005; Marsh et al., 1995; Kamiguti et al., 1996). As toxinas destes venenos também podem causar aumento da permeabilidade tissular a neurotoxinas, que levam a bloqueio da junção neuro muscular e citotoxinas e fosfolipases, que induzem necrose muscular. Outros danos teciduais que podem ser causados por venenos de serpente são problemas renais, ou mesmo falência renal, cardiotoxicidade, paralisia flácida e miólise sistêmica (White, 2004a). Todos estes efeitos atuam de forma sinérgica e em certos casos podem levar à morte.

Neurotoxinas são tipicamente encontradas em venenos de serpentes das famílias Hydrophidae, Elapidae e Crotalidae. Já os componentes atuantes sobre o sistema hemostático se concentram em venenos das serpentes da família Crotalidae (Lu et al., 2005).

1.2 HEMOSTASIA

Segundo Guyton et al., 1997, o termo hemostase significa prevenção da perda de sangue. Ocorrendo lesão ou rompimento de um vaso sanguíneo a hemostase é alcançada através de alguns mecanismos: espasmo vascular, formação de um tampão plaquetário, formação de um coágulo sanguíneo e eventual crescimento de tecido fibroso para dentro do coágulo sanguíneo com o intuito de fechar permanentemente a lesão no vaso, ou ainda pode ocorrer o que é denominado de fibrinólise, a dissolução do coágulo por proteólise.

Portanto, ocorre ao mesmo tempo no interior dos vasos um equilíbrio entre um sistema procoagulante e um sistema anticoagulante, sendo cada sistema dependente da atividade de seus componentes, seja enzimática, como cofator ou ainda como sítio de atuação, como no caso do fibrinogênio. Para facilitar a compreensão destes mecanismos estes componentes foram denominados fatores da coagulação e numerados de I a XII, de acordo com a ordem em que foram sendo descritos (Tabela 1). Estes fatores se encontram em sua maioria na sua forma inativada e, quando ativados, são representados pelo algarismo romano seguido da letra a (Ex: Fator V_a).

O processo de coagulação conta com a participação de mais de 50 substâncias, procoagulantes e anticoagulantes. O caminho básico pela qual este processo se inicia é caracterizado pela ativação de um fator, que uma vez ativado participa da ativação do fator subsequente e assim por diante. Como alguns participantes são enzimas, originalmente na forma de zimogênios, uma vez clivadas e na forma ativa podem catalisar a reação seguinte diversas vezes, levando a uma amplificação do sinal inicial . Todo este processo é um dos mais fabulosos sistemas bioquímicos encontrados em seres vivos.

1.2.1 Mecanismo Geral da Coagulação Sanguínea

A coagulação sanguínea ocorre em três etapas essenciais segundo Guyton et al. (1996): (1) em resposta à ruptura de um vaso (via extrínseca) ou dano ao próprio sangue ou contato deste com colágeno (via intrínseca), ocorre uma cascata complexa de reações químicas no sangue, envolvendo mais de uma dúzia de

Tabela 1 – Fatores da coagulação sanguínea e seus sinônimos

Fator de coagulação	Sinônimos
Fibrinogênio	Fator I
Protrombina	Fator II
Fator tecidual	Fator III, tromboplastina tecidual
Cálcio	Fator IV
Fator V	Pró-acelerina; fator lábil; Ac-globulina (Ac-G)
Fator VII	Acelerador sérico da conversão de protrombina (SPCA); pró-convertina; fator estável
Fator VIII	Fator anti-hemofílico (AHF); globulina anti-hemofílica (AHG); fator A anti-hemofílico
Fator IX	Componente plasmático da tromboplastina (PTC); fator Christmas; Fator B anti-hemofílico
Fator X	Fator Stuart ou Stuart-Prower
Fator XI	Antecedente plasmático da tromboplastina (PTA); Fator C anti-hemofílico
Fator XII	Fator Hageman
Fator XIII	Fator estabilizante da fibrina
Pré-caliceína	Fator de Fletcher
Cininogênio de alto peso molecular	Fator Fitzgerald; HMWK
Plaquetas	

substâncias, o que resulta na formação de um complexo de substâncias ativadas (complexo ativador de protrombina); (2) o ativador de protrombina catalisa a conversão de protrombina em trombina; e (3) a trombina age então enzimaticamente sobre o fibrinogênio, liberando quatro peptídeos por proteólise, convertendo-o em monômeros de fibrina que posteriormente se organizam numa rede que envolve plaquetas, hemácias, leucócitos e o plasma formando assim o coágulo (Figura 1).

As plaquetas exercem papel importante na hemostasia. É função das plaquetas formar o chamado tampão plaquetário, responsável pelo tamponamento dos vasos sanguíneos lesionados, principalmente em lesões pequenas. Em lesões maiores o tamponamento é feito com a participação conjunta do coágulo formado. As

plaquetas, uma vez ativadas por contato com o colágeno subendotelial ou células do endotélio lesadas, mudam sua conformação e liberam substâncias (Tromboxano A₂ e ADP) que ativam mais plaquetas, promovendo aglutinação plaquetária no local lesado. Ocorre liberação também de fosfolipídeos plaquetários que exercem papel fundamental na formação do complexo ativador de protrombina e do fator X_a, o que mostra a importância das plaquetas no processo de coagulação. Além disto, as plaquetas são responsáveis pelo processo de retração do coágulo, importante para aproximação das bordas da lesão, o que se deve à ativação da trombostenina, de actinas e miosinas, proteínas contráteis intraplaquetárias e à liberação do fator estabilizador de fibrina.

Uma vez iniciado o desenvolvimento do coágulo sanguíneo este se prolonga para o interior do vaso rapidamente, em poucos minutos. Isto é, o coágulo inicia um ciclo de retroalimentação positiva do processo (feedback positivo). Isto se deve principalmente ao fato de que a trombina, com sua ação proteolítica, não age apenas sobre o fibrinogênio. A trombina também atua sobre a protrombina, formando mais trombina, e também sobre diversos outros fatores da coagulação responsáveis pela formação do complexo ativador de protrombina (Fatores V, VIII, IX, X, XI, XII e da agregação plaquetária). Uma vez formada uma quantidade crítica de trombina um ciclo contínuo se desenvolve, levando à formação de mais coágulo, até que algum fator detenha seu crescimento.

Via Intrínseca

Via extrínseca

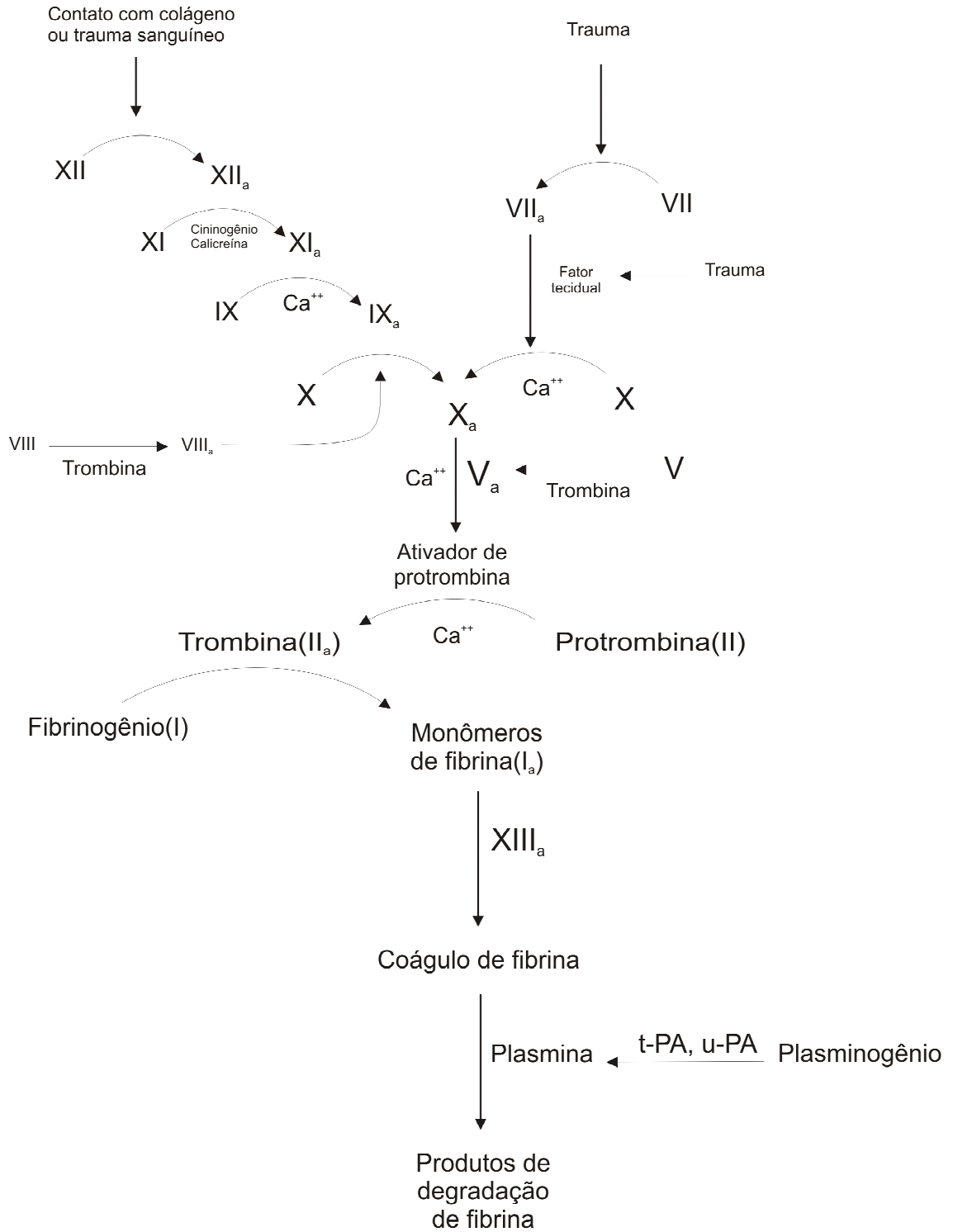


Figura 1 – Cascata da coagulação sanguínea

1.2.2 Prevenção da Coagulação no Sistema Vascular Normal

Não é interessante que o processo de coagulação sanguínea, uma vez iniciado, se dissemine por todo o sistema vascular do organismo. Alguns fatores são importantes para que isto não aconteça. Os mais importantes fatores relacionados à superfície do endotélio são:

- Superfície lisa do endotélio: evita a ativação por contato do sistema intrínseco da coagulação;
- Glicocálice endotelial: este mucopolissacarídeo repele os fatores da coagulação e plaquetas;
- Trombomodulina: esta proteína ligada à membrana endotelial se liga à trombina, retardando a coagulação. O complexo trombomodulina-trombina ativa uma proteína plasmática, proteína C, que atua como anticoagulante inativando os fatores V e VII ativados.

O endotélio lesado perde a sua superfície lisa e a camada trombomodulina-glicocálice, o que ativa tanto o fator XII quanto as plaquetas, o que desencadeia a via intrínseca da coagulação. O contato do fator XII e plaquetas com o colágeno subendotelial leva a uma ativação mais poderosa.

Os fatores plasmáticos importantes na prevenção da coagulação são:

- Antitrombina III: é uma alfa globulina que se liga à trombina, bloqueando seu efeito sobre o fibrinogênio
- Ação antitrombínica da fibrina: durante a formação do coágulo, cerca de 90% da trombina formada é adsorvida à fibrina, o que impede a disseminação da trombina pelo sistema vascular.

- Heparina: é um conjugado polissacarídico que aumenta em até 1000 vezes a ação da antitrombina III sobre a trombina. Além disso, o complexo heparina-antitrombina III remove outros fatores da coagulação (fatores XII, XI, IX e X ativados) o que aumenta a eficácia da anticoagulação. A heparina é produzida principalmente por mastócitos basofílicos localizados no tecido conjuntivo do capilar sanguíneo e também em pequena quantidade pelos basófilos plasmáticos.
- Alfa₂-Macroglobulina: é uma grande proteína tetramérica (720 Kda) e provavelmente desempenha um papel na prevenção da coagulação sanguínea, já que tem a capacidade de se combinar a vários fatores proteolíticos da coagulação, evitando a atuação destes até inativação por outros meios.

1.2.3 Fibrinólise

Há no plasma sanguíneo uma euglobulina denominada plasminogênio, ou profibrinolisinina que, quando ativada, se transforma numa enzima proteolítica cuja denominação mais comum é plasmina. A plasmina se assemelha à tripsina e digere as fibras de fibrina do coágulo bem como outros fatores da coagulação, fibrinogênio, fatores V, VIII e XII, além da protrombina.

O plasminogênio se incorpora ao coágulo em grande quantidade logo que este é formado. Um potente fator denominado ativador tecidual de plasminogênio (t-PA) é lentamente liberado pelos tecidos e endotélio lesados, o que em um dia ou mais converte o plasminogênio em plasmina ativa, levando à remoção do coágulo do vaso.

A plasmina é constantemente formada no sangue em pequenas quantidades, o que poderia levar a um estado de hipocoagulabilidade, não fosse a presença de um inibidor natural denominado alfa₂-antiplasmina.

1.3 ATIVIDADE SOBRE A HEMOSTASIA DE COMPONENTES PROTEICOS DE VENENOS DE SERPENTE

As proteínas presentes em venenos de serpentes que atuam sobre o sistema hemostático podem, segundo Clemetson et al. (2005), ser classificadas como procoagulantes, anticoagulantes ou ativadoras de fibrinólise. No grupo dos procoagulantes estão incluídos os ativadores do fator V, ativadores do fator X e ativadores de protrombina, além de várias enzimas semelhantes à trombina. Inibidores de fatores IX/X, ativadores de proteína C, inibidores de trombina e fosfolipases A₂ exibem propriedades anticoagulantes. Atuantes sobre o sistema fibrinolítico estão aquelas proteínas com atividade proteolítica sobre a fibrina e os ativadores de plasminogênio.

1.3.1 Ativadores do Fator V

O fator V é uma glicoproteína multifuncional de 330 kDa com atividade sobre o sistema coagulante e anticoagulante. É ativada naturalmente pela trombina por clivagem nos aminoácidos 709, 1018 e 1545, formando o fator V_a, um heterodímero com uma cadeia polipeptídica de 105 kDa e outra de 72/74 kDa. O fator V_a atua como cofator do fator X_a na ativação da protrombina, aumentando em mais de 1000

vezes a conversão da protrombina em trombina. Sua atividade como cofator é regulada pela proteína C ativada e também atua como cofator na inativação do fator VIII mediada pela proteína C ativada (Mann et al., 2003). Proteases ativadoras do fator V foram encontrados em venenos de *Bothrops atrox*, *Vipera russelli*, *Vipera lebetina*, *Vipera ursine*, *Naja naja oxiana* e *Naja nigricollis nigricollis* (Rosing et al., 2001).

1.3.2 Ativadores do fator X

Ativadores do fator X, tanto serinoproteases quanto metaloproteases, foram encontrados em serpentes das famílias Viperidae e Elapidae (Tans, 2001). O mais importante ativador de fator X descrito foi denominado RVV-X, encontrado em venenos de serpentes da espécie *Vipera russelli*. Ativadores de fator X foram encontradas em outros venenos e compartilham de estruturas similares à RVV-X e, provavelmente, do mesmo mecanismo catalítico (Takeya et al., 1993; Lindquist et al., 1978).

1.3.3 Ativadores de protrombina

Ativadores de protrombina estão presentes numa grande variedade de venenos de serpentes, podendo converter a protrombina em trombina ou meizotrombina (Rosing e Tans, 1992). Baseando nas características estruturais, funcionais ou cofatores requeridos pode-se dividir os ativadores de protrombina em quatro grupos. São eles: grupo A, metaloproteinases que ativam a protrombina sem necessidade de

cofatores; grupo B, dependentes de Ca^{2+} , compostos por uma metaloproteinase e uma lectina do tipo C ligados de forma não-covalente; grupo C, serinoproteases dependentes de Ca^{2+} e fosfolípidos carregados negativamente, mas não de fator V_a ; e grupo D, com características iguais ao grupo C, porém dependentes de fator V_a .

1.3.4 Inibidores dos fatores IX e X

Algumas proteínas semelhantes às lectinas do tipo C, que interagem com os fatores IX e X foram isoladas de diversas espécies (Morita, 2004). Podem ser classificadas em proteínas ligadoras de fatores IX e X, FIX/X-BPs (blood coagulation FIX/X binding proteins), proteínas ligadoras de fator IX, que não se ligam ao fator X (FIX-BPs) e proteínas ligadoras de fator X (FX-BPs), que se ligam predominantemente ao fator X.

1.3.5 Ativadores de Proteína C

A proteína C é um zimógeno de duas cadeias polipeptídicas ativada naturalmente pela trombina, sendo dependente da vitamina K para o exercício de sua função que é a de degradar os fatores V_a e VIII_a . Tem atividade anticoagulante portanto. A maioria dos ativadores de proteína C descritos foram isolados de venenos de *Agkistrodon* e outros de *Bothrops*, *Trimeresurus* e *Cerastes* (Gempeler-Messina et al., 2001).

1.3.6 Inibidores da Trombina

Inibidores de trombina foram encontrados em *Bothrops* (*B. alternatus* e *B. jararaca*) e *Lachesis* (*L. muta*). Botrojaracina é um exemplo de inibidor de trombina, com massa de 27 kDa, semelhante à lectina do tipo C (Monteiro *et al.*, 2001). Esta toxina se liga aos sítios secundários I e II da trombina, formando um complexo não-covalente. Porém não interage com o sítio catalítico desta enzima. Esta interação da botrojaracina com a trombina prejudica a ligação desta com seus substratos, daí suas propriedades anticoagulantes.

1.3.7 Proteínas com atividade de Fosfolipase A₂

Enzimas com atividade de fosfolipase A₂ com propriedades anticoagulantes foram descritas em todos os grupos de serpentes. Segundo Clemetson *et al.* (2005), primeiramente foi sugerido que a atividade anticoagulante das fosfolipases A₂ é devida à sua atividade hidrolítica sobre fosfolípidos, que são procoagulantes. Porém, a alta afinidade por fosfolípidos aniônicos verificada para algumas fosfolipases A₂ sugere que as propriedades anticoagulantes destas enzimas podem ser devidas também à competição com os fatores da coagulação pela ligação com os fosfolípidos.

1.3.8 Enzimas fibrinolíticas

Atividade proteolítica sobre fibrinogênio e fibrina foi descrita em venenos de serpentes das famílias Crotalidae, Viperidae e Elapidae (Markland, 1991). Enzimas

com estas propriedades podem ser metaloproteases ou serinoproteases (Matsui et al., 2000). A maioria das enzimas do primeiro grupo são caracterizadas como zinco-metaloproteases que atuam sobre a cadeia A α do fibrinogênio, enquanto o segundo grupo é composto por serinoproteases, mais específicas para a cadeia B β do fibrinogênio. Porém, há diversas exceções e a generalização para esta especificidade não é adequada. A maioria das metaloproteases são fibrinolíticas, enquanto algumas serinoproteases são fibrinolíticas e fibrinogenolíticas (Braud et al., 2000).

1.3.9 Ativadores de Plasminogênio

Enzimas com atividade proteolítica ativadoras do plasminogênio foram descritas em venenos de *Trimeresurus stejnegeri* (Zhang et al., 1995), *Lachesis muta muta* (Sanchez et al., 2000) e também em *Agkistrodon halys* (Park et al., 1998). A TSV-PA, isolada de *T. stejnegeri* é uma proteína de 33 kDa que cliva o plasminogênio entre os aminoácidos Arg561-Val562, a mesma ligação clivada pelo t-PA (ativador natural). Porém, diferentemente do que acontece com o t-PA, a ativação do plasminogênio pela TSV-PA não é acentuada pela presença de fragmentos de fibrina. Além disto, a TSV-PA não ativa o fator X nem a proteína C, e não degrada fibrina ou fibrinogênio na ausência de plasminogênio (Zhang et al., 1995).

1.3.10 Proteínas atuantes sobre o endotélio vascular (Hemorraginas)

As hemorraginas induzem hemorragias através de um efeito direto sobre a parede de vasos sanguíneos (Hutton et al., 1993). Os mecanismos de ação das hemorraginas variam e incluem danos às células endoteliais, mionecrose e ruptura de fibras de colágeno e da membrana basal. Estes efeitos podem ser exacerbados por outros componentes do veneno ou por outras ações devidas a uma única hemorragina, o que inclui (1) fibrinólise, por fibrinogenases, (2) inibição da função plaquetária (desintegrinas) ou (3) trombocitopenia, por ativação de agregação plaquetária. Além disto, as células lesadas liberam ativador tissular do plasminogênio (t-PA), levando a um aumento da fibrinólise. O resultado final é um aumento da permeabilidade vascular com extravasamento de líquido intersticial, o que leva a edema, ou de células sanguíneas, levando a equimose, púrpura ou sangramento, o que depende do grau de envenenamento.

Muitas das hemorraginas descritas são zinco-metaloproteases (Markland,1998). Podem ser classificadas em dois grupos principais (Hutton et al., 1993), de acordo com o tamanho e mecanismo de ação. Um grupo é composto de moléculas relativamente pequenas (20 a 25 kDa) e possuem geralmente propriedades hemorrágicas e fibrin(ogen)olíticas. Um segundo grupo é composto de proteínas maiores (50 a 90 kDa), freqüentemente possuindo uma região semelhante às desintegrinas em sua estrutura, o que lhes confere atividade antiagregante sobre as plaquetas, pelo bloqueio da ligação do fibrinogênio às proteínas plaquetárias. Foi relatado também que certas desintegrinas podem inibir a angiogênese, através da inibição de integrinas (Clemetson et al., 2005).

1.4 VENENOS DE SERPENTE COMO FERRAMENTAS DIAGNÓSTICAS E TERAPÊUTICAS

A atividade de venenos de serpente sobre fatores da coagulação estimulou estudos sobre a viabilidade de utilização destes como agentes terapêuticos e como ferramentas diagnósticas, sendo que nos dias atuais já são comercializados para estes fins diversos materiais isolados de venenos de várias espécies.

Diversos ensaios de fatores da coagulação que se utilizam de constituintes de venenos de serpente foram desenvolvidos. Dentre os mais importantes estão:

- Ensaios de protrombina: ativadores de protrombina disponíveis comercialmente incluem aqueles provenientes das espécies *Echis carinatus* (Ecarin, Pentapharm), *Notechis scutatus* (Noscarin, Pentapharm), entre outros (Marsh & Willians, 2005).
- Ensaios do Fator V: o veneno de *Daboia russelli* (víbora de Russel) contém uma serinoprotease que ativa o fator V e é disponível comercialmente (RVV-V[®], Pentapharm) para ensaios diversos envolvendo este fator (Marsh & Willians, 2005).
- Ensaios do Fator X: o veneno de *Daboia russelli* contém um ativador de fator X (RVV-X[®], Pentapharm) utilizado em ensaios para medida do fator X (Bachmann et al., 1958), para distinguir entre deficiências dos fatores VII e X (Quick, 1971) e em ensaios de lúpus anticoagulante (Thiagarajan et al., 1986).
- Ensaios de proteína C: o veneno de *Agkistrodon c. contortrix* contém um ativador potente de proteína C que é disponível comercialmente para ensaios de Proteína C (Protac[®], Pentapharm) segundo Marsh & Willians (2005).

- Ensaio do Fator de von Willebrand: espécies do gênero *Bothrops* contêm uma proteína que ativa agregação plaquetária, que exige como cofator o fator de von Willebrand (Read et al., 1983; Brinkhous et al., 1988; Marsh & Willians, 2005), propriedade interessante para ensaios deste fator e é disponível comercialmente (Botrocetin[®], Pentapharm)
- Ensaio de fibrinogênio: serinoproteases semelhantes a trombina são disponíveis comercialmente para ensaios de fibrinogênio. A mais bem estabelecida é proveniente de *Bothrops atrox* (Batroxobin, Reptilase[®], Pentapharm). O Tempo de Reptilase é utilizado em lugar do Tempo de Trombina em amostras de pacientes tratados com heparina, já que esta não inibe a atividade sobre o fibrinogênio desta enzima, não ocorrendo o mesmo com a trombina (Funk et al., 1971; Marsh & Willians, 2005).

Componentes de venenos de serpente têm sido muito estudados e são bastante promissores como ferramentas diagnósticas e terapêuticas. Desintegrinas e lectinas do tipo C, moduladores de função plaquetária, certamente serão utilizadas no futuro para diversos fins, diagnósticos e/ou terapêuticos (Ouyang et al., 1992; Andrews & Berndt, 2000; Wisner et al., 2002).

Desintegrinas também tem sido avaliadas como agentes úteis no tratamento de neoplasias, uma vez que inibem a adesão de células metastáticas, impedindo a formação de novos tumores (Yang et al., 2005).

Outros componentes de venenos de serpente, tais como metaloproteases e serinoproteases (enzimas semelhantes à trombina), que atuam sobre o fibrinogênio e sobre fibrina tem potencial para uso terapêutico, em pacientes com doenças oclusivas ou com alto potencial para desenvolvimento de trombos (Marsh & Willians, 2005). Dentre as enzimas semelhantes à trombina disponíveis comercialmente para

este uso terapêutico está a denominada ancrod (Knoll Laboratories), proveniente de *Agkistrodon rhodostoma* (Marsh & Willians, 2005; Sherman, 2002). Além desta temos batroxobina, reptilase, crotalase e uma SVTLE proveniente de *Agkistrodon contortrix* (Castro et al., 2004)

1.5 ENZIMAS SEMELHANTES À TROMBINA PROVENIENTES DE VENENOS DE SERPENTES

Dentre os componentes dos venenos de serpente, as enzimas semelhantes à trombina (SVTLE's) estão entre os mais estudados. São serinoproteases (compartilham do mecanismo de catálise da tripsina) e são assim denominadas devido ao fato de apresentarem atividade sobre o fibrinogênio análoga à trombina (Pirkle, 1998). Aproximadamente 100 SVTLE's foram descritas (Marsh & Willians, 2005), sendo que 88 destas encontradas em 35 espécies foram revistas (Pirkle, 1998), e a seqüência primária foi determinada parcialmente ou totalmente para 21 SVTLE's.

Segundo Pirkle (1998) as SVTLE's estão distribuídas em vários gêneros da subfamília Crotalinae, incluindo *Agkistrodon* (*A. acutus*, *A. bilineatus*, *A. c. contortrix*, *A. rodhostoma*, etc), *Bothrops* (*B. asper*, *B. atrox*, *B. jararaca*, etc), *Crotalus* (*C. adamanteus*, *C. atrox*, etc), *Lachesis* (*L. muta*, *L. muta muta*, *L. m. noctívaga*, etc), *Trimeresurus* (*T. flavoviridis*, *T. gramineus*, etc), bem como em outras subfamílias, Viperinae (*Cerastes cerastes*, *Cerastes vipera* e *Bitis gabonica*) e Colubrinae (*Dipholidus typus*). Desde então várias SVTLE's foram descritas na literatura, inclusive em outras espécies destes mesmos gêneros ou de um gênero diferente, *Gloydius* (*G. ussuriensis* e *G. shedaonensis*) (Yang et al., 2002; Yang et al., 2003).

1.5.1 Características das SVTLE's

Os genes que expressam as SVTLE's são membros da família da tripsina/caliceína, compostos por cinco éxons e quatro íntrons, sendo a enzima em sua forma madura codificada pelo éxons 2 até 5, com a tríade catalítica sendo codificada por éxons diferentes (Itoh et al., 1988).

Análise comparativa da seqüência primária de diversas SVTLE's com serinoproteases clássicas, tais como quimotripsina, caliceína, trombina e tripsina mostra esta relação genética (Castro et al., 2004):

- a tríade catalítica clássica das serinoproteases (His57, Asp102, Ser195, tomando como base a seqüência da quimotripsina) é bastante conservada nas SVTLE's. A trombina e a quimotripsina apresentam baixos graus de similaridade com as SVTLE's na seqüência primária (26-33% e 24-31% respectivamente) mas ainda são funcionalmente análogas a estas;
- as SVTLE's são mais semelhantes à caliceína e a tripsina (34-40% e 31-44% de semelhança estrutural, respectivamente). Compartilham não só a tríade, mas também cinco pontes dissulfeto topologicamente equivalentes;
- a estrutura secundária das SVTLE's contém estruturas do tipo folhas beta, estrutura bastante encontrada em outras serinoproteases relacionadas à quimotripsina (Perona and Craik, 1997; Krem et al., 2000).

As SVTLE's apresentam entre si, com apenas uma exceção descrita (Wang et al., 2001), 12 resíduos de cisteína nas mesmas posições, que perfazem 6 pontes dissulfeto (provavelmente 22-157, 42-58, 91-250, 136-201, 168-182 e 191-220), uma vez que não há grupos tíois livres (Amiconi et al., 2000; Nikai et al., 1995; Parry et al., 1998). Estas pontes dissulfeto se mostraram essenciais para a atividade

catalítica destas enzimas, uma vez que o tratamento com agentes redutores como β -mercaptoetanol ou ditioneitol (DTT) as inativam, como descrito para flavoridiobina, originada de *Trimeresurus flavoviridis* (Pirkle et al., 1998; Tatematsu et al., 2000).

As SVTLE's são inibidas por moléculas inibidoras clássicas de serinoproteases, tais como DFP (fluorofosfato de diisopropil) e PMSF (fluoreto de fenilmetilsulfonil), o que confirma a função de serinoprotease destas enzimas. Porém, dois inibidores de tripsina são ineficientes para algumas SVTLE's (Pirkle, 1998).

As SVTLE's são compostas por uma única cadeia polipeptídica ou, mais raramente, duas. A maioria apresenta glicosilações em resíduos de asparagina, mas não em posições conservadas. O conteúdo de carboidratos ligados varia largamente (0 a 30% do peso), tendo participação, às vezes, no reconhecimento de substratos pela enzima e, principalmente, na estabilização da estrutura terciária destas enzimas (Castro et al., 2004).

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

Já foi reconhecida a presença de um sítio de ligação de sódio na molécula de trombina (Di Cera et al., 1995; De Filipis et al., 2005). Foi demonstrado que o sódio tem a propriedade de regular alostericamente a atividade da trombina. A atividade da trombina sobre fatores procoagulantes, tais como PAR1 e fibrinogênio, é dependente de sódio, enquanto a atividade sobre fatores anticoagulantes (proteína C) não o é. Portanto, a disponibilidade de sódio no meio dita a especificidade de ação da molécula de trombina (Dang et al., 1995).

Estudos têm demonstrado que as SVTLE's não são reguladas alostericamente por íons sódio (Castro et al., 2001), devido ao fato de não apresentarem este sítio de ligação de sódio. Nas SVTLE's, aparece Pro225 (assim como na tripsina), diferente portanto da trombina, que apresenta Tyr225. A tirosina na posição 225 é essencial para a estruturação do sítio de ligação do sódio na trombina e, conseqüentemente, a regulação de sua atividade por estes íons (Castro et al., 2004; Guinto et al., 1999).

Sabe-se também que a trombina apresenta sobre sua superfície duas regiões carregadas positivamente (subsítios secundários I e II) e uma região de natureza hidrófoba que são importantes na ligação da trombina com seus substratos e inibidores (Castro et al., 2004). A maioria das SVTLE's apresenta uma região hidrófoba semelhante à trombina, mas não apresenta os sítios carregados positivamente.

O subsítio secundário I é essencial para a interação da trombina (e subsequente catálise) através de atração eletrostática com seus substratos naturais. Fibrinogênio, receptores de plaquetas (PAR-1 e PAR-3, glicoproteína Ib plaquetária – GPIb), porção C-terminal da hirudina (inibidor natural de trombina derivado de sanguessugas) e trombomodulina interagem com trombina através desta região. O subsítio secundário II é responsável pela interação da heparina com a trombina.

Conseqüentemente, alguns inibidores de trombina são ineficientes para SVTLE's. Outra conseqüência destas diferenças estruturais entre trombina e SVTLE's é a diferença de comportamento frente ao fibrinogênio. A trombina cliva o fibrinogênio em duas ligações Arg-Gly, uma na cadeia A α (liberando FPA) e outra na cadeia B β (liberando FPB). Algumas SVTLE's clivam o fibrinogênio em ambas as cadeias, mas a maioria delas cliva o fibrinogênio em apenas uma cadeia (A α ou B β). As SVTLE's podem então ser classificadas de acordo com sua atividade sobre fibrinogênio: SVTLE's FP-A ou venombin A (clivam preferencialmente a cadeia A α liberando FP-A), SVTLE's FP-B ou venobim B (clivam preferencialmente a cadeia B β liberando FP-B) e SVTLE's FP-AB ou venobim AB (Kornalik, 1990; Markland, 1997). A clivagem do fibrinogênio em apenas uma cadeia leva à formação de monômeros de fibrina anormais, que se polimerizam, porém numa frágil rede que não é reconhecida pelo fator XIII (responsável pelo fortalecimento da rede de fibrina) e, conseqüentemente, é facilmente disperso pela corrente sanguínea e são facilmente susceptíveis à plasmina. Isto leva a um quadro de hipofibrinogenemia e hipocoagulabilidade, ação contrária, portanto, à da trombina sobre a coagulação (Castro e al., 2004).

Algumas SVTLE's, induzem agregação plaquetária pela proteólise de receptores plaquetários (PAR1 e PAR4), porém com atividade bem menor do que a trombina (Castro et al., 2004). Esta propriedade pode levar ao uso destas enzimas para estudos sobre plaquetas.

SVTLE's geralmente não atuam sobre outros fatores da coagulação que não o fibrinogênio. Mas existem algumas exceções. SVTLE's que ativam o Fator XIII foram descritas nos gêneros *Agkistrodon*, *Bitis*, *Bothrops*, *Cerastes* e *Trimeresurus* (Pirkle, 1998). Uma serinoprotease que ativa o Fator V foi descrita em *Agkistrodon contortrix*

contortrix (contortrixobina) (Amiconi et al., 2000), com atividade 250 a 500 vezes menor que a trombina (Rosing et al., 2001). Em *Bothrops jararaca* e *Bothrops atrox* (botrombina e trombocitina, respectivamente) foram descritas SVTLE's que ativam fator VIII (Niewiarowski et al., 1979; Nishida et al., 1994). Foi descrita para cerastocitina (Marrakchi et al., 1995) a propriedade de ativar o fator X.

Dentre as propriedades das SVTLE's totalmente distintas da trombina estão algumas atividades sobre sistema nervoso descritas. LM-TL, proveniente de *Lachesis muta*, exibiu uma interessante propriedade: quando injetada na corrente sanguínea de ratos induziu episódio temporários de rotação em torno do eixo longitudinal do corpo do animal (Silveira et al., 1989; Da Silva et al., 1989). Batroxobin, de *Bothrops atrox*, mostrou atividade neuroprotetora em ratos com desordem de memória espacial por isquemia do lobo temporal esquerdo. Mostrou também atividade interferente sobre a expressão de c-Jun, NCAM (neural cell adhesion molecule), HSP32 e HSP70 (Wu et al, 2001; 2000a; 2000b).

Várias SVTLE's exibem atividade semelhante à calicreína, liberando cininas (principalmente bradicinina) através de proteólise de cininogênios plasmáticos, o que leva a um efeito hipotensor (Matsui et al., 2000; Komori and Nikai, 1998; Markland et al., 1982).

Outra atividade biológica foi verificada em uma SVTLE proveniente de *Trimeresurus flavoviridis*, flavoxobina. Esta enzima mostrou atividade sobre o sistema do complemento, ativando C3 (atividade de C3 convertase) por clivagem da ligação Arg726-Ser727 (Yamamoto et al., 2002).

1.6 SERPENTE *Bothrops leucurus*

A espécie *Bothrops leucurus* (Wagler, 1824) pertence à família Viperidae, segundo Campbell & Lamar (1989). É popularmente conhecida como jararaca-do-rabo-branco e/ou caiçara (quando filhote) e malha-de-sapo, cabeça de capanga, jaracuçu, jararacuçu, jaracuçu-de-quatro-ventas, caiçaca, patrona e jararaca (quando adulta).

É uma espécie terrícola, noturna e habita as Florestas Tropicais Caducifólias e Subcaducifólias, áreas de tensão ecológica (entre cerrado e Florestas Tropicais Caducifólias e Subcaducifólias, entre a restinga e a Floresta Tropical Atlântica nos seus diferentes níveis de degradação), campos rupestres remanescentes da Floresta Tropical Atlântica, incluindo áreas de forte ação antrópica, urbanizadas e campos cultivados (Porto & Teixeira, 1995).

A *B. leucurus* (Porto & Teixeira, 1995) apresenta um par de fossetas loreais (órgão termorreceptor), um olho e uma narina de cada lado de sua cabeça, daí sua denominação popular de cobra de “quatro-ventas”. A dentição é do tipo solenóide (1 par de dentes anteriores modificados em presas inoculadoras de veneno, grandes, móveis, totalmente canaliculadas e recobertas por uma bainha protetora). A cabeça é triangular (figura 02), com numerosas escamas pequenas e irregulares no topo e a cauda tem escamas lisas, sem nenhum tipo de modificação. É uma espécie de médio porte (28 a 187 cm) que possui vários padrões de coloração. Diferenças mais marcantes podem ser encontradas entre indivíduos adultos e jovens. Geralmente apresentam um padrão dorsal cinza ou amarronzado, com manchas negras em formato de “V” invertido. Apresentam também uma faixa pós-ocular bem definida e um ventre enxadrezado de coloração cinza e amarelada.

A dieta desta serpente (Lira-da-Silva, 1996a) é composta por pequenos lagartos e anfíbios (filhotes) e roedores (adultos). A parte distal da cauda em machos jovens

tem a cor amarelada ou branca, servindo de engodo caudal para atrair presas



Figura 2 – Serpente *Bothrops leucurus*

insetívoras (lagartos e anfíbios). Nesta fase do desenvolvimento fica fácil a distinção sexual, já que as fêmeas jovens tem a parte distal da cauda acinzentada.

É uma espécie vivípara (Lira-da-Silva et al, 1994b), sendo a primavera (setembro e outubro) a época preferencial para a corte e o verão (janeiro a março) para o nascimento dos filhotes. O período de gestação é, portanto, algo em torno de 5 meses. Em cada ninhada ocorrem em média 12 nascimentos (40% fêmeas e 60% machos), com os filhotes pesando entre 2 e 7 gramas.

1.6.1 Distribuição Geográfico-Epidemiológica

A espécie *Bothrops leucurus* ocorre do Ceará, no Nordeste brasileiro até o espírito Santo, na região Sudeste (Lira-da-Silva et al, 1996b), em ambientes úmidos ou secos, em altitudes de até 500 metros. Na Bahia, esta espécie ocorre em todo o

estado com exceção do Vale do Rio São Francisco (caatinga) e extremo-oeste (cerrado).

Dos acidentes por picadas de serpentes venenosas registrados na Bahia (Lira-da-Silva et al, 1996c; 1994a; 1993) no período de 1982 a 1992, 94% foram causados por *Bothrops leucurus* e ocorreram na região metropolitana de Salvador.

1.6.2 Efeitos Biológicos do Veneno de *Bothrops leucurus*

O veneno de *Bothrops leucurus* ainda é muito pouco estudado, tendo sido alvo de pouquíssimos trabalhos publicados. Mas alguns destes trabalhos mostram que os efeitos biológicos devidos ao envenenamento por *Bothrops leucurus* tem perfil semelhante àqueles apresentados por outras serpentes do gênero *Bothrops*, dentre elas *B. jararaca* (Sanchez et al., 1992), ou seja, atividade coagulante sobre o fibrinogênio *in vitro*, hemorragia, edema, necrose tecidual, falência renal *in vivo*.

Prianti, Jr, A.C.G. et al. (2003), comparando a concentração protéica (Lowry, 1951) e as atividades de fosfolipase A₂ (Holzer and Mackessy, 1996) e proteolítica sobre caseína (Kunitz, 1947) dos venenos de *B. jararaca* e *B. leucurus* verificou que, quanto à concentração protéica, o veneno de *B. leucurus* apresentou 92.7 % do seu peso seco em proteínas, enquanto o veneno de *B. jararaca* apresentou 79.9 % do seu peso seco em proteínas; quanto à atividade de fosfolipase A₂ foi de 2.84 (A_{425nm}/mg) para o veneno de *B. leucurus* e de 0.30 (A_{425nm}/mg) para o veneno de *B. jararaca*. Quanto à atividade proteolítica sobre caseína verificaram 94.4 (U/mg) para o veneno de *B. leucurus* e 60.5 (U/mg) para o veneno de *B. jararaca*. Dos resultados experimentais destes autores podemos observar que o veneno de *B. leucurus* é 1.16 vezes mais concentrado em proteínas se comparado ao veneno

de *B. jararaca*. Quanto à atividade de fosfolipase A₂ é 9.5 vezes mais ativo e quanto à atividade proteolítica sobre caseína é 1.6 vezes mais ativo. Neste mesmo trabalho foram descritas mais algumas atividades importantes do veneno de *B. leucurus*:

- após prévia incubação com o veneno, uma preparação neuromuscular de ave teve diminuição na resposta à acetilcolina e potássio, demonstrada por diminuição na contratibilidade muscular, irreversível após lavagem. Isto se dá provavelmente devido a ação de proteases do veneno, que podem hidrolisar proteínas componentes dos receptores nicotínicos e proteínas das fibras musculares e de membrana;
- o veneno causou alterações histológicas importantes na preparação muscular tais como, presença de vacuolização celular, escuras células compactadas, membranas lesadas, degradação de miofibrilas, além de hipercontratura das fibras musculares;
- o veneno mostrou atividade liberadora de creatinoquinase (CK) pela preparação após incubação, o que também indica dano celular.

Um outro trabalho (Mise et al., 2003) também mostrou haver dano em tecidos musculares, através da medida de creatinoquinase sérica após injeção intramuscular do veneno.

Prianti (2004), num trabalho mais recente, descreveu a atividade edematogênica do veneno de *B. leucurus* em patas de rato frente a diversas substâncias (inibidores de ciclooxigenase, inibidores da síntese de óxido nítrico e anti-histamínicos) e concluiu que o veneno causa edema em patas de ratos mediado por óxido nítrico, histamina e metabólitos formados a partir do ácido araquidônico pela ação das ciclooxigenases.

1.6.3 Enzima Semelhante à Trombina Presente no Veneno da Serpente *Bothrops leucurus*

Segundo Magalhães et al. (2004) a leucurobina é uma glicoproteína monomérica com massa molecular de 35 kDa que decresce para 29 kDa após deglicosilação com N-glicosidase F (PNGase F). Neste trabalho os autores sequenciaram aproximadamente 98% da protease após digestão por endoproteases e obtenção dos fragmentos de peptídeos. Observou-se quase 100% de identidade sequencial com a batroxobina do veneno de *Bothrops atrox*. Na sua atividade sobre o fibrinogênio hidrolisa mais rapidamente a cadeia α do fibrinogênio liberando rapidamente o fibrinopeptídeo A, e mais lentamente o fibrinopeptídeo B por hidrólise lenta da cadeia β do fibrinogênio. A atividade coagulante específica é de 198 unidades NIH/mg do fibrinogênio humano. A leucurobina não ativa o fator XIII da coagulação nem libera cininas de plasma bovino tratado pelo calor. Na caracterização cinética da leucurobina, utilizou-se quatro substratos do tipo tripeptidil-pNA a saber: D-Val-Leu-Arg-pNA (substrato de calicreína glandular); D-Pro-Phe-Arg-pNA (substrato de calicreína plasmática); Bz-Phe-Val-Arg-pNA (substrato de trombina) e D-Val-Leu-Lys-pNA (substrato de plasmina). Para estes substratos utilizados, a leucurobina apresentou uma maior especificidade (maior valor de k_{cat}/K_M) para o substrato D-Val-Leu-Arg-pNA.

Neste trabalho, ficou demonstrado que a leucurobina apresenta uma constante de especificidade 16 vezes maior para D-Val-L-Leu-L-Arg-pNA, em comparação com D-Val-L-Leu-L-Lys-pNA, indicando uma elevada preferência por Arg em P1, em detrimento de Lys. Determinou-se também a constante de inibição para a benzamidina ($K_i = 2.4$ mM), utilizando como substrato Bz-L-Arg-pNA.

1.7 CARACTERIZAÇÃO CINÉTICA DE PROTEASES TROMBICAS

Para o estudo das características bioquímicas de proteases (SVTLE's entre elas) pode-se lançar mão de diversas ferramentas experimentais. Para a caracterização cinética, uma das ferramentas mais utilizadas é a obtenção de parâmetros cinético-enzimáticos da enzima a ser estudada (K_M , k_{cat} , k_{cat}/K_M) para substratos cromogênicos sintéticos.

A utilização de substratos sintéticos é justificada tendo em vista a alta dificuldade de se obter os substratos naturais em quantidades apreciáveis e graus de pureza aceitáveis. Em um trabalho de Friberger (1982) sobre o uso de substratos peptídicos cromogênicos, tais como os peptidil-pNA's, foi verificada a superioridade do uso destes substratos sobre os substratos naturais e substratos sintéticos (ésteres de lisina e arginina). Os substratos cromogênicos do tipo peptidil-pNA mimetizam sequências curtas de aminoácidos dos substratos naturais e permitem o acompanhamento da hidrólise destas ligações peptídicas por leitura espectrofotométrica, facilitando enormemente a obtenção dos parâmetros cinéticos

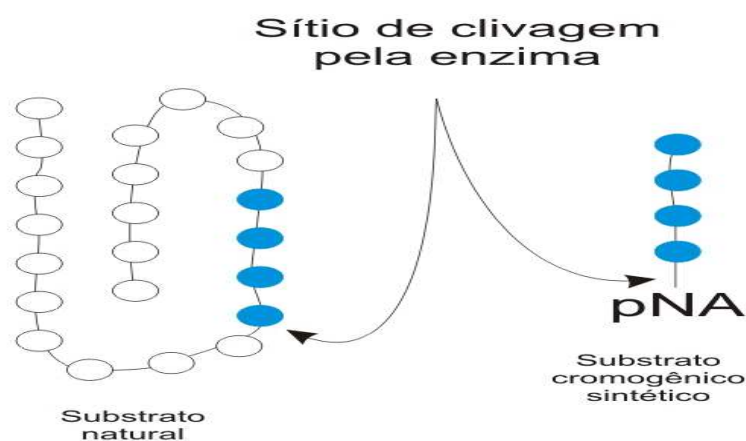


Figura 3 – Mimetização de uma sequência de aminoácidos de um substrato natural por um substrato do tipo peptidil-pNA (4-Nitroanilidas)

das enzimas que clivam estas ligações. Outra vantagem do uso destes substratos é o fato de que se pode sintetizar sequências específicas de aminoácidos (Figura 3), o que permite verificar a influência da seqüência peptídica do substrato na atividade catalítica da enzima.

Estes parâmetros podem ser utilizados devido aos seus significados termodinâmicos, segundo Stryer (1996):

Constante de Michaelis (K_M) – o K_M é a concentração de substrato na qual uma determinada enzima trabalha com metade de sua velocidade máxima. No caso de hidrólise de amidas catalizadas por serinoproteases, como é o caso da atividade da leucurobina sobre os substratos do tipo peptidil-pNA, o valor de K_M é bastante próximo do valor da constante de ligação enzima-substrato, e o seu inverso ($1/K_M$) nos dá uma idéia da afinidade que a enzima apresenta pelo respectivo substrato, o que depende da estrutura tridimensional e da natureza química dos substratos e do centro ativo da leucurobina. Temos portanto que quanto menor o valor de K_M , maior será a afinidade que a leucurobina apresentará pelo substrato. Mas apenas o grau de afinidade ($1/K_M$) de uma enzima por um determinado substrato não nos diz muita coisa acerca da atividade enzimática. A velocidade do ciclo de catálise também é importante, como descrito à frente.

Constante catalítica (k_{cat}) – o k_{cat} é a quantidade de ciclos catalíticos que cada unidade de enzima ativa processa por unidade de tempo, geralmente expresso em s^{-1} . Sabe-se que as enzimas aceleram reações por que reduzem a energia de ativação destas. As enzimas causam redução da energia de ativação por que se ligam ao estado ativado dos seus substratos, estabilizando-os e reduzindo assim seu nível energético. Portanto, assim como

o K_M , o k_{cat} depende da estrutura tridimensional e da natureza química dos substratos e do centro ativo da leucurobina. Da mesma forma que o K_M , o valor de k_{cat} isolado é de pouca informação. Daí ser calculada a constante de especificidade para cada substrato.

Constante de especificidade (k_{cat}/K_M) - a relação k_{cat}/K_M conjuga os dois parâmetros anteriores e dá uma idéia da eficiência catalítica de uma enzima pelo respectivo substrato. Bons substratos são aqueles que são rapidamente processados e que se ligam bem à enzima. Estes apresentam portanto alta relação k_{cat}/K_M . Como podemos ver, um substrato que se liga muito bem, mas tem um ciclo de catálise longo não apresentará uma boa relação k_{cat}/K_M . Da mesma forma ocorre com aquele substrato que é rapidamente processado, ou seja, tem um ciclo catalítico rápido, mas que não apresenta um grau de afinidade adequado com a enzima. Substratos que não se ligam bem e são lentamente processados apresentarão valores de k_{cat}/K_M ainda mais baixos, significando que a atividade da enzima sobre eles é baixa.

Desta forma, a obtenção destes parâmetros de uma determinada enzima para substratos que diferem em sua seqüência de aminoácidos, pode revelar informações importantes acerca da estrutura tridimensional do centro ativo desta enzima, bem como de suas preferências com relação aos substratos naturais sobre os quais tal enzima age.

A linguagem utilizada nos trabalhos científicos voltados para este tipo de estudo geralmente leva em conta a nomenclatura sugerida por Schechter e Berger (1967). Nesta nomenclatura os aminoácidos na porção N-terminal da ligação peptídica clivada pela protease são enumerados de acordo com sua posição na cadeia partindo da ligação (**P1**, **P2**, **P3** e assim por diante). Os aminoácidos da porção

C-terminal são enumerados como **P1'**, **P2'**, **P3'**, etc. Já os subsítios da enzima (um ou mais aminoácidos) que interagem com os substratos são enumerados como **S1**,... ou **S1'**,... de acordo com o aminoácido do substrato com o qual interage. Portanto, o aminoácido em **P1** interage principalmente com **S1** (subsítio 1) na enzima, o aminoácido em **P2** interage com **S2** e assim por diante.

Os valores dos parâmetros cinéticos se tornam bastante úteis como fonte de análise da estrutura do centro ativo de uma enzima quando se comparam substratos semelhantes na sua seqüência polipeptídica, mas que diferem em uma posição. Por exemplo, um substrato do tipo Leu-Pro-Phe-Arg-pNA e outro semelhante Leu-Pro-Phe-Lys-pNA. Perceba que estes substratos só se diferem na posição P1, adjacente à ligação peptídica clivada. Enquanto o primeiro tem Arg em P1, o segundo apresenta um resíduo de Lys. Os valores de K_M e k_{cat} que estes substratos apresentarão para uma determinada enzima serão diferentes, e estas diferenças se deverão à natureza do grupo que ocupa P1 no substrato e de como este grupo interage com a região S1 na enzima. Como esta interação é de natureza química, conhecendo as seqüências peptídicas dos substratos podemos tecer algumas considerações a respeito do centro ativo da enzima e de seus subsítios S1, S2, S3, etc.

2 JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

O estudo das proteases ativas na hemostasia pode trazer, sem sombra de dúvidas, um melhor entendimento dos mecanismos bioquímicos que estão envolvidos na coagulação.

Além disto, estas proteases tem potencial para serem utilizadas como reagentes laboratoriais e como agentes terapêuticos.

Os venenos das serpentes do gênero *Bothrops* têm se mostrado como fontes ricas destas proteases e apresentam como efeito típico “in vivo” um intenso sangramento, resultado da interação destas enzimas com os diversos fatores da coagulação, o que leva a uma desordem no equilíbrio hemostático, podendo provocar a morte da vítima por sangramento extensivo.

Entre os venenos das serpentes do gênero *Bothrops*, foi escolhido como objeto do presente estudo o veneno da serpente brasileira *Bothrops leucurus*, por ser ainda um veneno pouco estudado.

O objetivo geral deste trabalho é a caracterização de algumas propriedades da leucurobina, uma SVTLE presente neste veneno, por estudos com substratos cromogênicos sintéticos e com fibrinogênio purificado ou em plasma humano, que é um substrato natural para esta enzima.

Em trabalho anterior de Magalhães et al. (2004), com a intenção de purificar enzimas de venenos de serpentes, desenvolveu-se o sistema de purificação por cromatografia: filtração em gel de Sephacryl S-200 seguida por coluna da afinidade em Sepharose-Agmatina e coluna de troca-iônica.

Obteve-se, utilizando deste método, a leucurobina na sua forma pura, evidenciada por revelação de banda única em eletroforese em gel de poliacrilamida.

Em outro trabalho, Magalhães et al. (1992) obteve a constante de especificidade (k_{cat} / K_M) da enzima Protease Trombica *L. muta muta* (PTLM) para os quatro

substratos citados acima além do K_i para a benzamidina. De acordo com estes dados podemos ver que a k_{cat}/K_M de PTLM é da ordem de 100 vezes maior sobre os substratos testados em comparação com os dados obtidos para leucurobina. A benzamidina mostrou ter uma potência de inibição também da ordem de 100 vezes maior para PTLM em comparação com a leucurobina.

Considerando que a leucurobina não apresentou uma atividade enzimática tão pronunciada como a PTLM para os substratos e inibidores já testados, faz-se necessário a ampliação dos estudos cinéticos com substratos com aminoácidos distintos daqueles já testados, no sentido de identificar os melhores substratos do tipo peptidil-pNA para esta protease ainda não adequadamente caracterizados do ponto de vista cinético.

Para isto foram escolhidos no banco de substratos do Laboratório de Bioquímica Clínica da Universidade Federal de Minas Gerais 11 substratos com sequências de aminoácidos diferentes dos substratos previamente estudados e foi feita a determinação dos parâmetros cinéticos (K_M , $V_{máx}$, k_{cat} e k_{cat}/K_M) de todos eles a partir da determinação das velocidades iniciais de hidrólise em tempo fixo. Posteriormente testou-se a atividade da enzima sobre o substrato que apresentou maior relação k_{cat}/K_M na presença de crescentes concentrações de alguns cátions mono e divalentes. Foi testada também a atividade de trombina humana e betatripsina bovina sobre este substrato, enzimas cujos centros ativos já foram bastante descritos. Além disto foi verificada a atividade da leucurobina deglicosilada sobre o substrato cromogênico e, finalmente, testou-se a atividade da leucurobina nativa e deglicosilada sobre plasma humano citratado e sobre fibrinogênio humano purificado.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MATERIAL

3.1.1 SOLUÇÃO DE LEUCUROBINA

Partindo de uma amostra já purificada da leucurobina fornecida pela Fundação Ezequiel Dias, foi preparada uma solução de trabalho com concentração de 1 mg/mL de leucurobina em solução de NaCl 0,9% p/v, não tamponada. Esta solução foi então subdividida em 15 alíquotas de 1,0 mL, que foram então estocadas em refrigerador a 18°C negativos para uso posterior.

3.1.2 SOLUÇÃO DE LEUCUROBINA DEGLICOSILADA

Uma solução de leucurobina com concentração de 0,903 mg de proteína/mL foi tratada pela enzima PNGase para que fosse retirada a fração glicídica da enzima. Uma outra alíquota desta mesma solução não foi tratada e foi usada em teste paralelo. Ambas soluções foram fornecidas pela Fundação Ezequiel Dias.

3.1.3 SOLUÇÕES DE CÁTIOS MONO E DIVALENTES

Foram preparadas soluções de NaCl, KCl, MgCl₂ e CaCl₂ com concentração de 1,0M em água destilada. Os reagentes utilizados foram de grau de pureza para análise.

3.1.4 SOLUÇÕES DE SUBSTRATOS CROMOGÊNICOS

Foram preparadas soluções de 11 substratos orgânicos do tipo peptidil-pNA enumerados à frente, pela solubilização do substrato em dimetilformamida a 10% v/v em solução NaCl 0,9% p/v.

3.1.5 SOLUÇÃO TAMPÃO TRIS-HCl pH 8,0

A solução tampão TRIS-HCl 0,1M pH 8,0 foi preparada pela solubilização do Tris-Hidroximetil-Aminometano em água destilada a 0,1 mol/L, sendo posteriormente corrigido o pH com HCl 0,1 mol/L pelo acompanhamento com um pHmetro digital.

3.1.6 SOLUÇÃO DE FIBRINOGÊNIO BOVINO PURIFICADO

A solução de fibrinogênio bovino foi preparada na concentração de 4,0 mg/mL em tampão TRIS-HCl 0,1M pH 8,0.

3.1.7 PLASMA HUMANO CITRATADO

O plasma humano foi obtido por centrifugação de sangue de paciente com parâmetros hemostáticos normais. O sangue foi colhido por punção venosa de paciente em jejum e adicionado de citrato de sódio para anticoagulação.

3.2 EQUIPAMENTOS

Espectrofotômetro Semi-automático BTR-310 (Fabricante: Biotron)

Coagulômetro Semi-Automático Coagutimer III (Fabricante: Inlab)

Balança Analítica

Banho-Maria com controle de temperatura

Cronômetro

Micropipetas de volumes diversos

3.3 REAGENTES

Tris-hidroximetil-aminometano

Dimetilformamida

Leucurobina purificada nativa e deglicosilada

β -Tripsina Bovina

Trombina Humana 100NIH (Human Diagnostics)

Fibrinogênio Bovino purificado

p-Nitroanilida pura (Merck)

PNGase

Cloreto de Sódio P.A.

Cloreto de Magnésio P.A.

Cloreto de Potássio P.A.

Cloreto de Cálcio P.A.

Citrato de sódio

Substratos cromogênicos do tipo peptidil-4-Nitroanilidas utilizados no trabalho:

AC-L-Leu-L-Arg-pNA

AC-L-His-L-Arg-pNA

AC-L-Ala-L-Phe-L-Arg-pNA

D-Phe-L-Pro-L-Arg-pN

BZ-L-Gly-L-Pro-L-Arg-pNA

AC-L-Pro-L-Phe-L-Arg-pNA

BZ-L-Pro-L-Phe-L-Arg-pNA

D-Phe-L-Leu-L-Arg-pNA

BZ-L-Ile-L-Glu-L-Gly-L-Arg-pNA

D-Ile-L-His-L-Pro-L-Arg-pNA

Os substratos utilizados foram gentilmente fornecidos pelo Laboratório de Síntese de Peptídeos do Departamento de Biofísica da Escola Paulista de Medicina – UNIFESP.

3.4 METODOLOGIA

3.4.1 Determinação dos parâmetros cinéticos da leucurobina para os substratos cromogênicos do tipo peptidil-pNA

Os parâmetros cinéticos da leucurobina para cada substrato foram obtidos pela medida da velocidade inicial de hidrólise em pH 8,0 em 7(sete) concentrações diferentes do substrato, com concentração fixa de enzima. As medidas foram feitas em duplicatas e tratadas estatisticamente segundo metodologia proposta por JUNQUEIRA e MARES-GUIA (1990), a qual nos fornece os valores de K_M e $V_{m\acute{a}x}$, permitindo posteriormente, a partir da concentração molar da leucurobina na solução de reação, a obtenção dos valores de k_{cat} e k_{cat}/K_M . A técnica de medida da velocidade inicial foi padronizada em espectrofotômetro da marca Biotron BTR-310. O equipamento faz leituras de absorvância em tempos fixos programáveis, o que permite o acompanhamento a 405nm do andamento da reação e cálculo da velocidade inicial pelo uso do coeficiente de extinção molar obtido para a p-nitroanilida ($8.793 M^{-1}.cm^{-1}$) no presente trabalho.

O coeficiente de extinção molar da paranitroanilida foi obtido por uma curva de calibração feita no equipamento, para a qual para a qual foi utilizada p-Nitroanilina pura como padrão.

Paralelamente à obtenção dos parâmetros cinéticos da leucurobina para o substrato em análise, obteve-se a atividade enzimática da alíquota em uso para uma certa concentração do substrato Bz-L-Arg-pNA, o que permitiu acompanhar se a atividade enzimática estava sendo mantida ao longo dos dias de obtenção dos dados, o que foi verificado.

3.4.2 Obtenção dos valores de K_M de D-Phe-L-Pro-L-Arg-pNA para β -Tripsina e Trombina Humana

Os valores de K_M de D-Phe-L-Pro-L-Arg-pNA para β -tripsina bovina e trombina humana foram obtidos da mesma forma que para a leucurobina, ou seja, através da medida da velocidade inicial de hidrólise deste substrato em 07 (sete) concentrações diferentes do substrato, compreendidas entre 5 a 225 μ M. Os valores obtidos foram tratados pelo software de Cinética Enzimática SICEB.

3.4.3 Verificação do efeito de cátions mono e divalentes sobre a atividade amidásica da leucurobina

Utilizando do substrato D-Phe-L-Pro-L-Arg-pNA, que foi o que apresentou a maior relação k_{cat}/K_M , fez-se a medida da atividade amidásica da enzima em diferentes concentrações dos seguintes cátions: sódio, potássio, magnésio e cálcio, todos na forma de cloretos, mantendo-se a concentração do substrato e da enzima fixas em $0,15 \times 10^{-3}$ M e $2,0 \times 10^{-2}$ mg/mL respectivamente. As concentrações salinas na solução de reação variaram de 0 a 0,15 M.

3.4.4 Verificação da atividade amidásica da leucurobina deglicosilada frente ao substrato cromogênico de maior constante de especificidade

Uma solução de leucurobina de 0,90 mg/mL, deglicosilada pela ação de uma PNGase, teve sua atividade verificada frente ao substrato cromogênico do tipo peptidil-pNA de maior constante de especificidade dentre os testados neste trabalho.

A enzima deglicosilada foi testada em paralelo com outra solução de leucurobina nativa com a mesma concentração de enzima ativa (0,90 mg de proteína/mL). Foi medida a velocidade inicial de hidrólise do substrato pelo acompanhamento da variação de absorvância a 405 nm causada pela liberação de p-nitroanilina no meio de reação. A concentração inicial do substrato foi de $8,8 \times 10^{-4}$ M e as medidas foram feitas em triplicata, estando a concentração de enzima também fixa no meio de reação.

3.4.5 Verificação da atividade coagulante da leucurobina nativa e deglicosilada sobre plasma humano citratado

Para verificar a atividade coagulante da leucurobina nativa e deglicosilada sobre plasma humano citratado foi utilizada a medida do tempo de formação de coágulo de fibrina no plasma após a adição da leucurobina. O tempo de coagulação foi medido através de um coagulômetro semi-automático, sendo as medidas feitas em triplicata. Para este experimento utilizou-se das mesmas soluções de leucurobina, nativa e deglicosilada, utilizadas no experimento anterior. Estas soluções apresentavam iguais concentrações de proteína em peso (0,90 mg de proteína/mL). O experimento consistiu na adição de 10 μ L de leucurobina (nativa ou deglicosilada) a 200 μ L de plasma humano citratado e medida do tempo de formação do coágulo.

3.4.6 Verificação da atividade coagulante da leucurobina nativa e deglicosilada sobre fibrinogênio bovino purificado

A verificação da atividade coagulante da leucurobina nativa e deglicosilada sobre fibrinogênio bovino purificado foi feita de forma semelhante ao experimento anterior. O equipamento utilizado, bem como as soluções de leucurobina nativa e deglicosilada, foram os mesmos. A solução de fibrinogênio bovino tinha a concentração de 4,0 mg/mL. O protocolo experimental seguido foi idêntico ao do item 3.4.5, com a substituição do plasma humano pelo mesmo volume da solução de fibrinogênio bovino preparada.

3.4.7 Verificação da atividade coagulante da leucurobina sobre fibrinogênio na presença de cátions mono e divalentes

A verificação da atividade coagulante da leucurobina sobre fibrinogênio na presença de cátions mono e divalentes foi feita também pela contagem do tempo de formação do coágulo de fibrina após adição de leucurobina purificada nativa em solução aquosa de fibrinogênio bovino purificado contendo concentrações crescentes de íons sódio, potássio, cálcio e magnésio.

Nas soluções de reação a concentração de leucurobina foi de 0,034 mg/mL e de fibrinogênio bovino foi de 3,25 mg/mL.

O tempo de coagulação foi medido em triplicata em soluções de reação contendo um dos cátions enumerados anteriormente em diferentes concentrações: 0 (zero) a 0,15 M.

4 RESULTADOS

4.1 OBTENÇÃO DO COEFICIENTE DE EXTINÇÃO MOLAR DA p-NITROANILIDA A 405 nm

Tabela 2 : Absorvância em 405 nm em função da concentração de p-Nitroanilina

[pNA] M (x 10 ⁻⁶)	Abs _(405 nm)
11,077	0,095
22,154	0,197
44,307	0,403
88,615	0,791
110,769	1,002
132,922	1,168
177,230	1,546
221,537	1,937

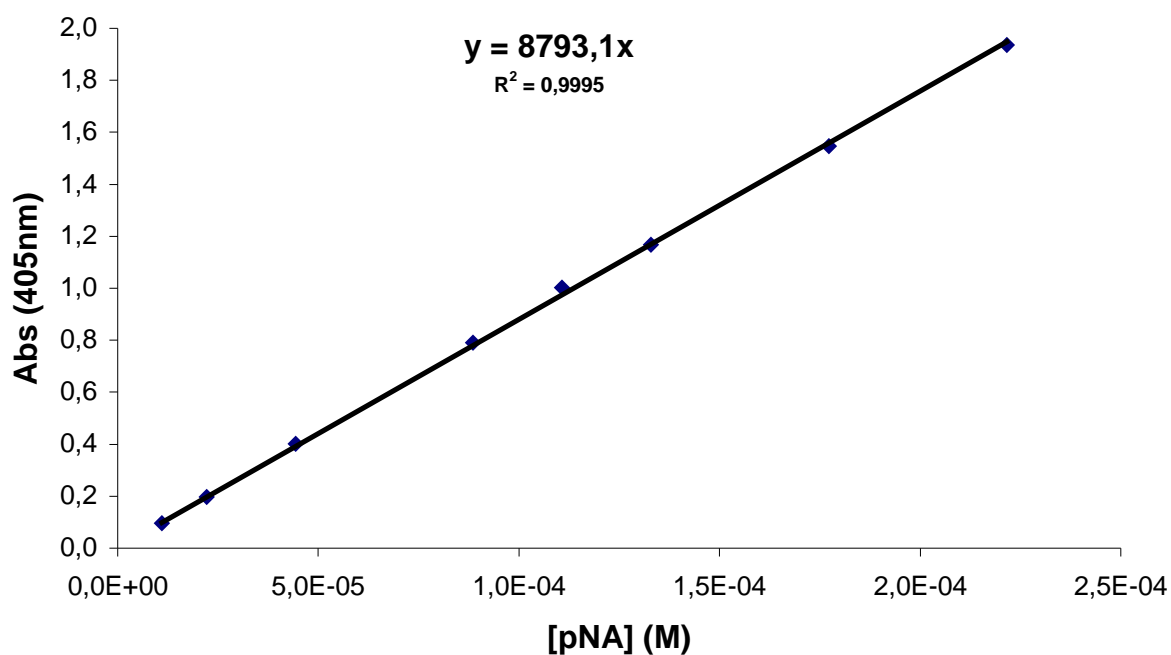


Figura 4 – Variação da absorvância a 405 nm em função da concentração molar de p-Nitroanilida

Coeficiente de extinção molar obtido a 405 nm : $8793,1 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$

4.2 PARÂMETROS CINÉTICOS DA LEUCUROBINA OBTIDOS FRENTE AOS DIVERSOS SUBSTRATOS CROMOGÊNICOS

Tabela 3 – Parâmetros cinéticos da leucurobina para os substratos cromogênicos trabalhados.

Posição relativa do aminoácido					K_M (M).10 ⁻⁶	k_{cat} (s ⁻¹)	k_{cat}/K_M (s ⁻¹ . M ⁻¹)
P ₅	P ₄	P ₃	P ₂	P ₁			
		D-Phe	L-Pro	L-Arg	15,2 ± 1,0	0,359	23.618
		D-Phe	L-Leu	L-Arg	45,2 ± 5,6	0,815	18.031
	L-Ile	L-His	L-Pro	L-Arg	23,6 ± 5,7	0,087	3.686
		AC	L-Leu	L-Arg	842,1 ± 244,3	2,823	3.352
	AC	L-Ala	L-Phe	L-Arg	532,6 ± 59,4	1,723	3.235
	Bz	L-Gly	L-Pro	L-Arg	54,5 ± 12,5	0,161	2.954
BZ	L-Ile	L-Glu	L-Gly	L-Arg	27,8 ± 10,5	0,036	1.295
	AC	L-Pro	L-Phe	L-Arg	189,3 ± 33,4	0,241	1.273
		AC	L-His	L-Arg	209,5 ± 66,3	0,171	816
			BZ	L-Arg	145,9 ± 19,3	0,113	775
	BZ	L-Pro	L-Phe	L-Arg	371,8 ± 78,3	0,273	734

4.3 CONSTANTE DE MICHAELIS (K_M) DE β -TRIPSINA, TROMBINA BOVINA E LEUCUROBINA SOBRE D-Phe-L-Pro-L-Arg-p NA

Tabela 4 – Valores de K_M para D-Phe-L-Pro-L-Arg-pNA das proteases β -tripsina, trombina bovina e leucurobina

Enzima	K_M (M). 10^{-6}
Leucurobina	15,2 \pm 1,0
β -Tripsina	21,5 \pm 4,5
Trombina bovina	41,2 \pm 5,6

4.4 ATIVIDADE AMIDÁSICA DA LEUCUROBINA SOBRE D-Phe-L-Pro-L-Arg-pNA NA PRESENÇA DE CÁTIONS MONO E DIVALENTES

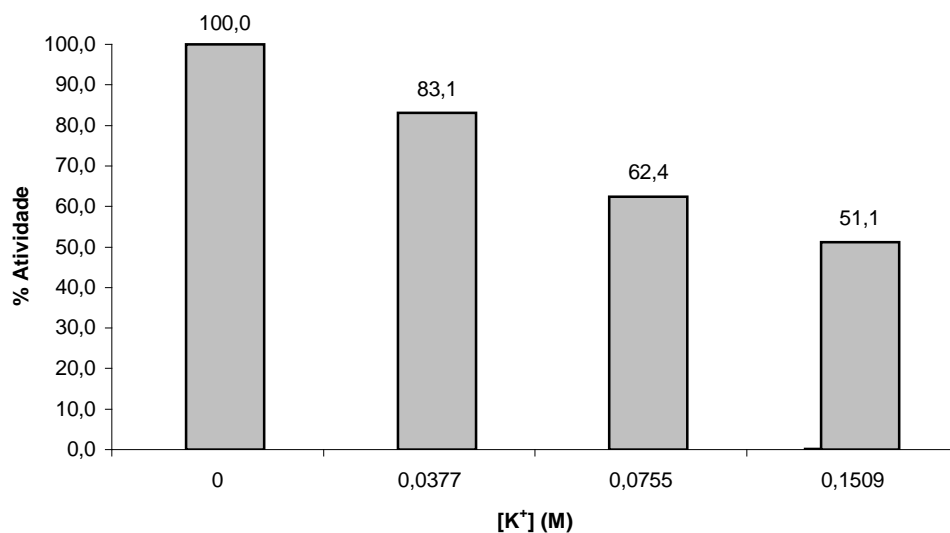


Figura 5 – Atividade relativa da leucurobina sobre D-Phe-L-Pro-L-Arg-pNA em função da concentração de íons potássio

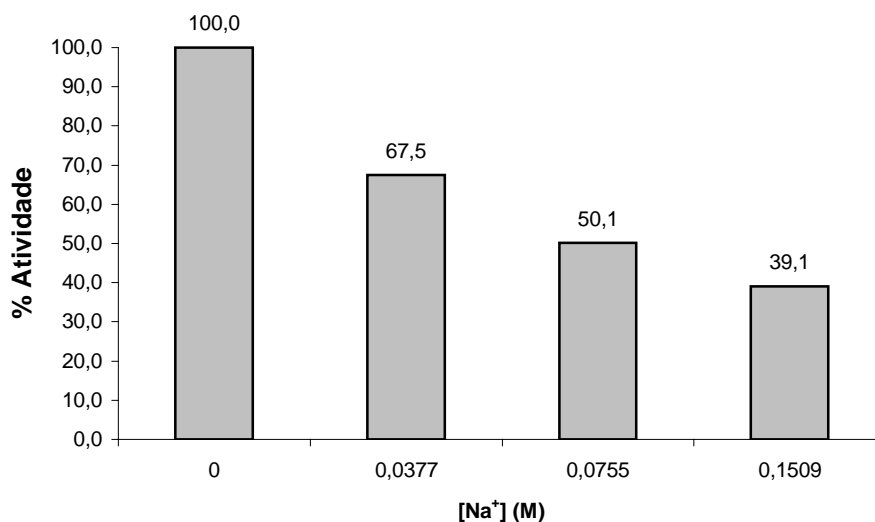


Figura 6 – Atividade relativa da leucurobina sobre D-Phe-L-Pro-L-Arg-pNA em função da concentração de íons sódio

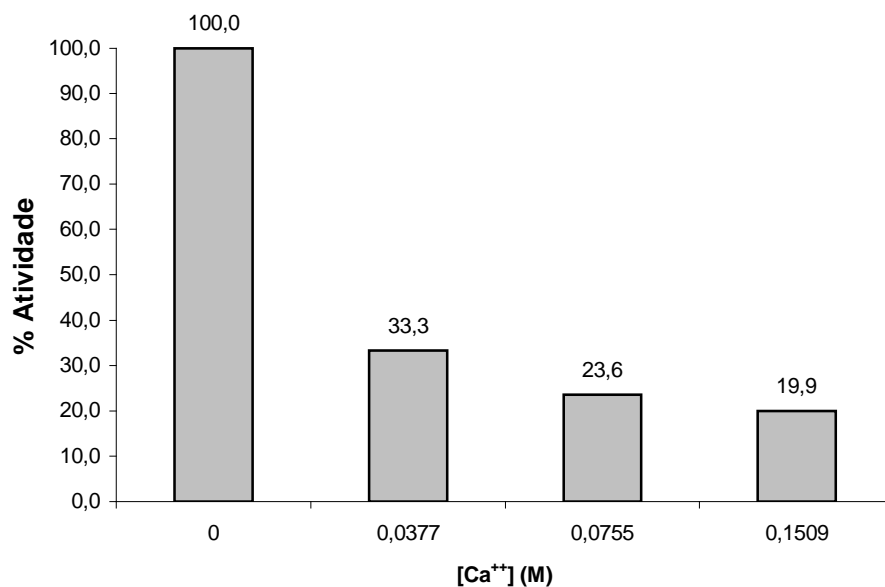


Figura 7 – Atividade relativa da leucurobina sobre D-Phe-L-Pro-L-Arg-pNA em função da concentração de íons cálcio

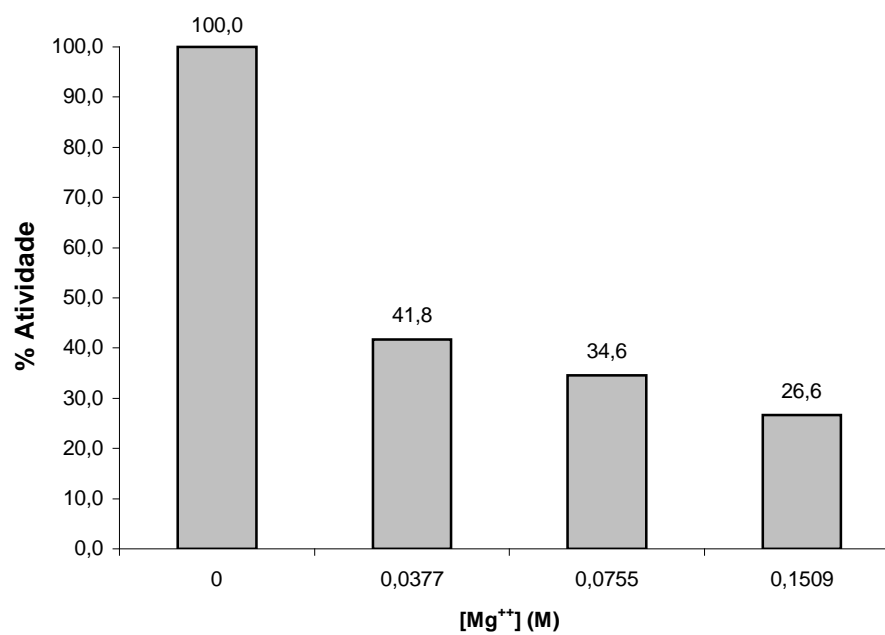


Figura 8 – Atividade relativa da leucurobina sobre D-Phe-L-Pro-L-Arg-pNA em função da concentração de íons magnésio

4.5 ATIVIDADE AMIDÁSICA DA LEUCUROBINA DEGLICOSILADA SOBRE D-Phe-L-Pro-L-Arg-pNA

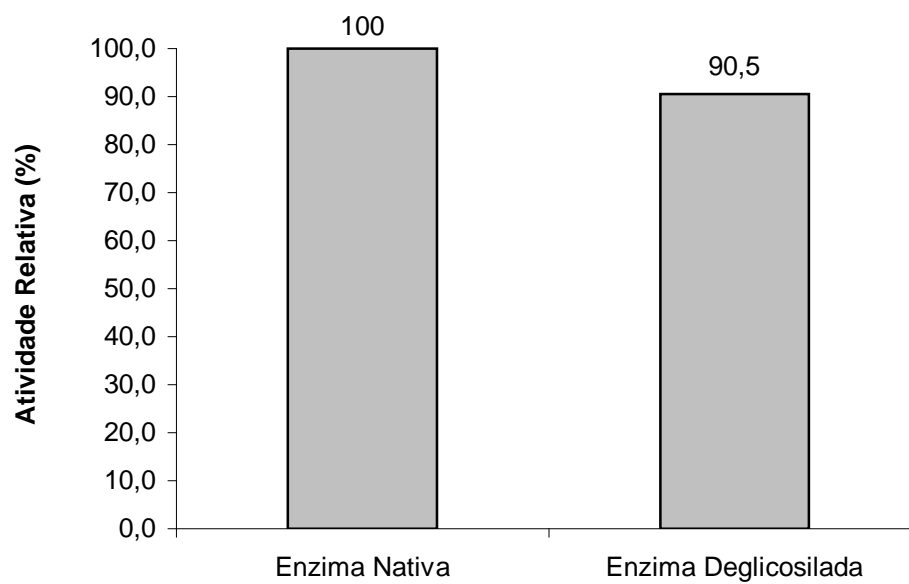


Figura 9 – Atividade relativa da leucurobina deglicosilada sobre D-Phe-L-Pro-L-Arg-pNA

4.6 ATIVIDADE COAGULANTE DA LEUCUROBINA NATIVA E DEGLICOSILADA SOBRE PLASMA HUMANO CITRATADO

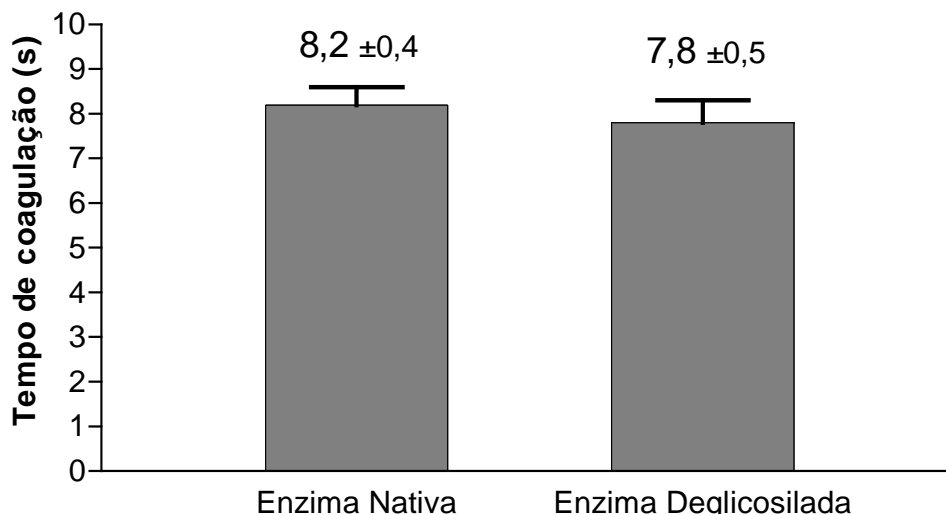


Figura 10 – Tempo de formação de coágulo de fibrina em plasma humano citratado após adição de leucurobina nativa e leucurobina deglicosilada (Média ± 1 Desvio-padrão).

4.7 ATIVIDADE COAGULANTE DA LEUCUROBINA NATIVA E DEGLICOSILADA SOBRE FIBRINOGÊNIO BOVINO PURIFICADO

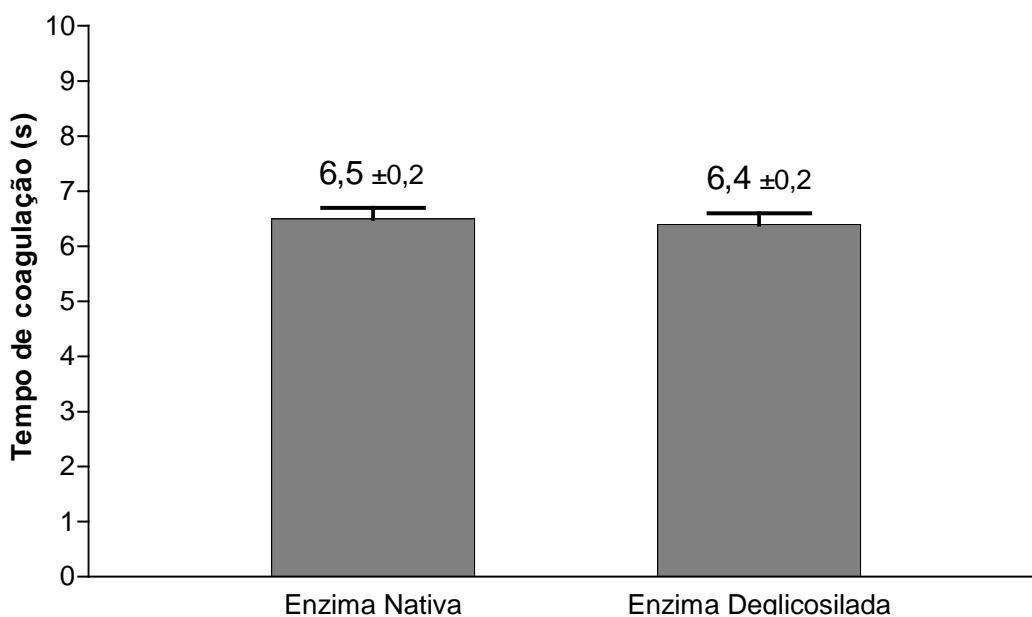


Figura 11 – Tempos de formação de coágulo de fibrina em solução de fibrinogênio bovino após adição de leucurobina nativa e leucurobina deglicosilada (Média ± 1 Desvio-padrão).

4.8 ATIVIDADE COAGULANTE DA LEUCUROBINA SOBRE FIBRINOGÊNIO BOVINO NA PRESENÇA DE CÁTIONS MONO E DIVALENTES

4.8.1 Atividade sobre fibrinogênio na presença de potássio

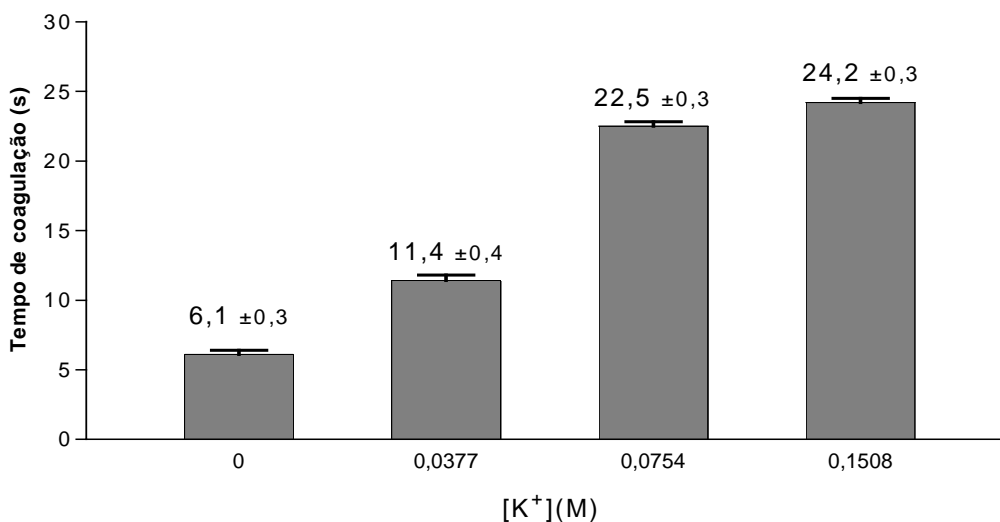


Figura 12 – Tempo de formação de coágulo após adição de leucurobina nativa em função da concentração de íons potássio (Média ± 1 Desvio-padrão).

4.8.2 Atividade sobre fibrinogênio na presença de sódio

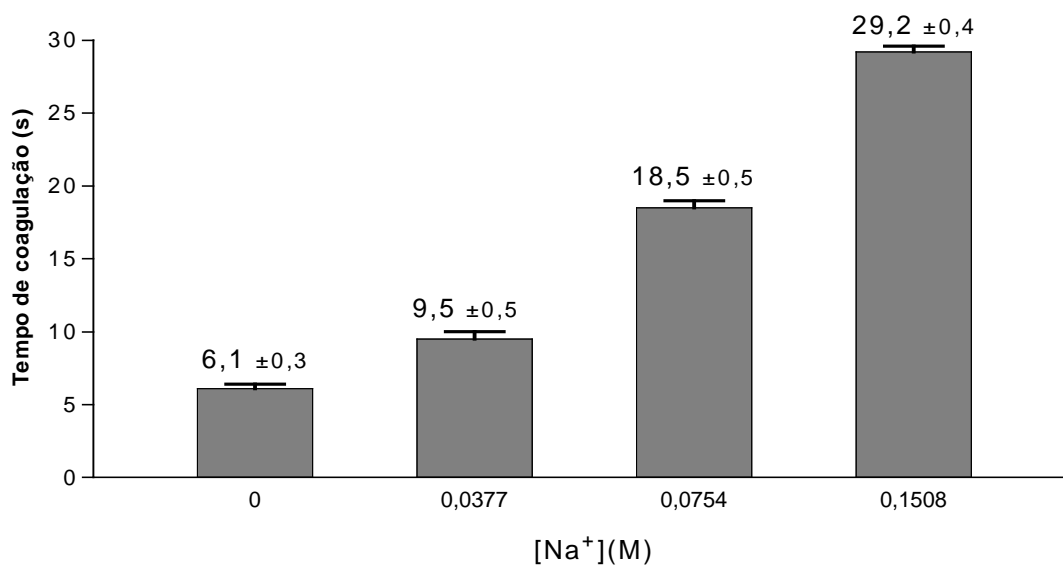


Figura 13 – Tempo de formação de coágulo após adição de leucurobina nativa em função da concentração de íons sódio (Média ± 1 Desvio-padrão).

4.8.3 Atividade sobre fibrinogênio na presença de cálcio

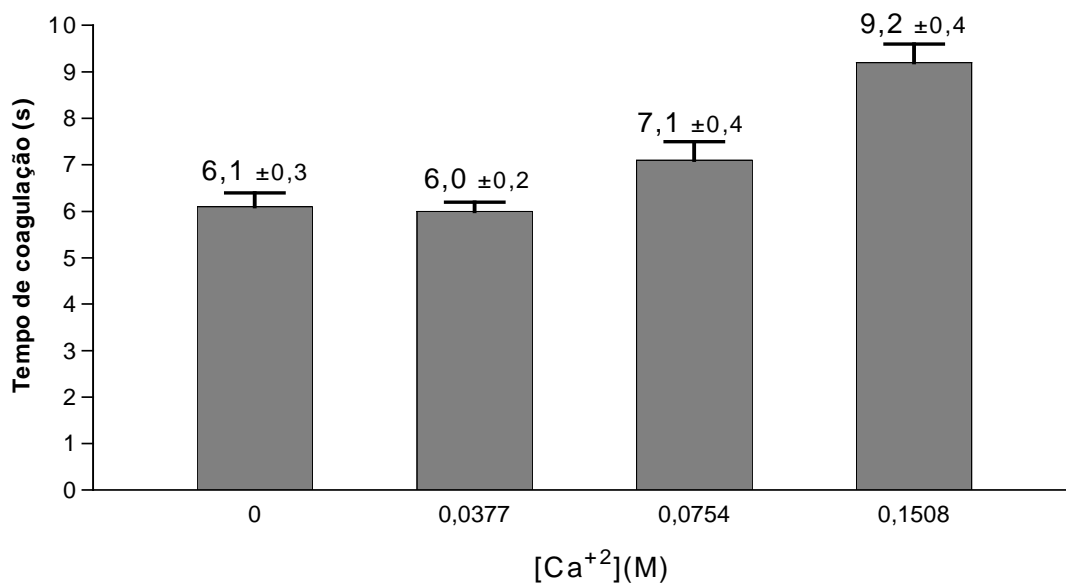


Figura 14 – Tempo de formação de coágulo após adição de leucurobina nativa em função da concentração de íons cálcio (Média ± 1 Desvio-padrão).

4.8.4 Atividade sobre fibrinogênio na presença de magnésio

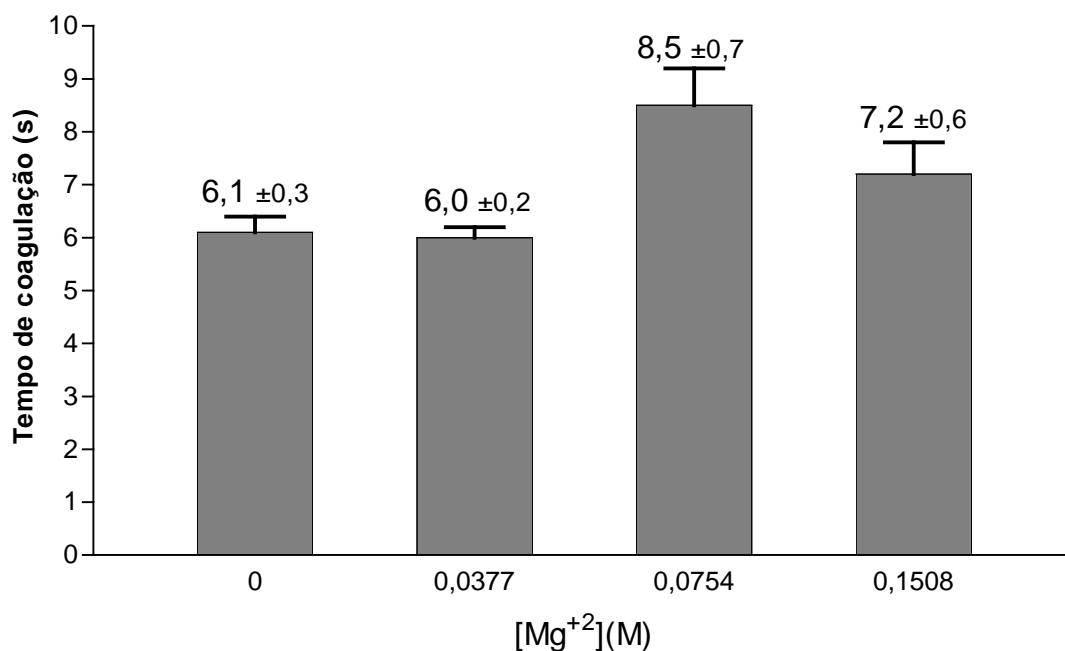


Figura 15 – Tempo de formação de coágulo após adição de leucurobina nativa em função da concentração de íons magnésio (Média ± 1 Desvio-padrão).

5 DISCUSSÃO

Para uma melhor sistematização da discussão sobre a atividade enzimática da leucurobina sobre os substratos cromogênicos sintéticos, os valores de K_M e k_{cat} da leucurobina para os diversos substratos com certo grau de semelhança serão comparados, com o intuito de verificar a influência da natureza química e da estrutura tridimensional destes na ligação à enzima e na catálise. A nomenclatura utilizada está de acordo com o trabalho de Schechter e Berger (1967).

5.1 CONSIDERAÇÕES ACERCA DAS PREFERÊNCIAS DA LEUCUROBINA EM P1

Todos os substratos testados no presente trabalho apresentavam um resíduo de Arg em P1 de tal forma que a discussão sobre as preferências da leucurobina em P1 terão como base dados obtidos do trabalho de Magalhães et al., (2006).

Como foi demonstrado neste trabalho, a leucurobina apresenta uma constante de especificidade 16 vezes maior para D-Val-L-Leu-L-Arg-pNA, em comparação com D-Val-L-Leu-L-Lys-pNA, o que indica forte preferência por Arg em P1, em detrimento de Lys. Analisando os dados mais de perto observa-se que o K_M para D-Val-L-Leu-L-Lys-pNA é 1,7 vezes menor do que para D-Val-L-Leu-L-Arg-pNA (57,1 μM e 99,0 μM , respectivamente). Portanto, apesar da constante de especificidade para Arg em P1 ser maior do que para Lys, a Lys em P1 resulta num K_M menor, ou seja, há maior afinidade na ligação enzima-substrato. A preferência por Arg se deve então ao fato de que o k_{cat} para D-Val-L-Leu-L-Arg-pNA é cerca de 28 vezes maior do que para D-Val-L-Leu-L-Lys-pNA. Temos portanto a seguinte situação: a Lys em P1 leva a um aumento da afinidade da enzima pelo substrato, mas Arg em P1 colabora para que os ciclos catalíticos ocorram com maior

velocidade, o que mostra que não é apenas a afinidade de uma enzima pelo seu substrato que governa a atividade enzimática.

Tal fato se deve provavelmente à cadeia lateral destes aminoácidos. Apesar de Arg e Lys serem resíduos com cadeia lateral básica, a natureza química destes aminoácidos é diferente. A Arg tem um radical maior, com dois átomos de nitrogênio a mais que Lys. Ambos contêm uma carga positiva em pH 8,0, o que leva à interação eletrostática com o Asp⁸⁶ carregado negativamente presente em S1 do centro ativo de serinoproteases e dita a especificidade desta família de enzimas por Arg e Lys em P1 (Perona et al., 1995). Portanto, percebe-se que a interação destes aminoácidos em P1 com S1 não depende apenas da carga negativa de suas cadeias laterais. Podem ser razões para esta preferência por Arg em P1 a sua conformação espacial, tamanho ou ainda um componente resultante do fato de que na arginina, a presença de dois átomos de nitrogênio a mais, não carregados, disponibiliza dois pares de elétrons na extremidade de sua cadeia lateral, o que não ocorre com lisina, que não disponibiliza nenhum par eletrônico na extremidade de sua cadeia lateral, uma vez que o átomo de nitrogênio está carregado. A Lys em P1 interage com o Asp⁸⁶ provavelmente através de uma molécula de água como ponte, o que também pode ser importante.

Como se viu, a presença de Arg em P1 aumenta bastante a especificidade da leucurobina por um determinado substrato, quando comparada à presença de Lys em P1. No entanto, como ocorre com outras enzimas semelhantes à trombina, a especificidade catalítica da leucurobina sobre seus substratos depende também dos aminoácidos presentes em P2, P3, P4, etc, bem como dos aminoácidos em P1', P2', P3', etc. Tais substratos, para que sofram ação efetiva da leucurobina, devem conter seqüências de aminoácidos que interajam favoravelmente com os subsítios S1, S2,

S3, etc. No caso de substratos que são cadeias polipeptídicas mais longas, como é o caso dos substratos naturais, a atividade enzimática também depende das interações que porventura existam entre aminoácidos da cadeia polipeptídica do substrato que estão mais distantes da ligação clivada e regiões da enzima mais distantes do centro ativo. Na discussão a seguir, já que os substratos testados são cadeias polipeptídicas curtas, serão consideradas as interações entre os subsítios da enzima que estão bem próximos ao centro ativo e aminoácidos próximos à ligação clivada pela leucurobina.

5.2 CONSIDERAÇÕES SOBRE OS VALORES DE K_M OBTIDOS PARA OS DIVERSOS SUBSTRATOS

Observando os valores de K_M para os diversos substratos apresentados na tabela 03 podem-se tecer alguns comentários.

5.2.1 Interação S2 - P2

Os 03 (três) substratos testados contendo Pro em P2, apresentam baixos valores de K_M . Os dois substratos com menor valor de K_M , D-Phe-L-Pro-L-Arg-pNA (15,2 μ M) e L-Ile-L-His-L-Pro-L-Arg-pNA (23,6 μ M) contém Pro em P2. O outro substrato contendo Pro em P2 é o BZ-L-Gly-L-Pro-L-Arg-pNA com K_M de 54,5 μ M.

Aí cabem algumas considerações a respeito da natureza química da prolina. Por apresentar um anel fechado, no qual estão contidos o carbono α e o grupo amino, a prolina se caracteriza por ser um aminoácido rígido, já que a ligação covalente entre o nitrogênio do grupo amino e o carbono α é impossibilitada de girar sobre seu eixo.

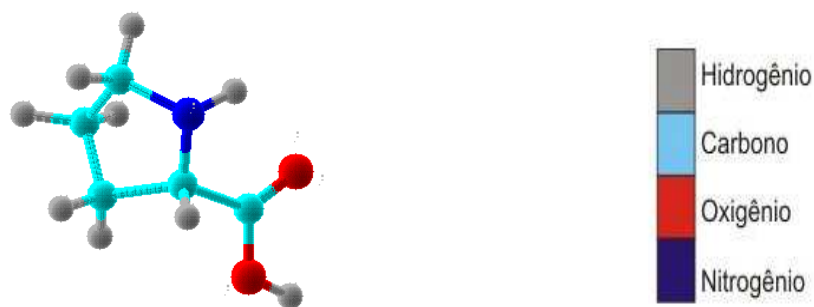


Figura 16: Estrutura tridimensional da L-Prolina

Além da rigidez, devemos salientar a natureza apolar da cadeia lateral deste aminoácido, uma vez que só contém grupos metileno.

Estas duas características da prolina parecem resultar numa conformação tridimensional do substrato mais favorável à interação e encaixe do substrato com a enzima, daí os baixos valores de K_M apresentados por estes substratos. A prolina parece ser importante neste encaixe principalmente quando está em P2, o que mostra que o sítio S2 tem uma estrutura tal que interage mais facilmente com a prolina, quando comparamos com substratos que apresentam outro grupo em P2.

Verificando outros substratos observou-se que o tamanho do resíduo em P2 parece exercer influência na ligação enzima-substrato. Nota-se ao analisar a tabela 03 que os substratos contendo L-Phe em P2 apresentam valores de K_M maiores que aqueles substratos contendo resíduos também apolares, mas de menor tamanho. Ou seja, um resíduo mais volumoso em P2 parece estar prejudicando a ligação enzima-substrato, reduzindo a afinidade, o que leva a um valor de K_M maior portanto. No entanto, para esta análise ser mais conclusiva, seria necessário testar dois substratos semelhantes, diferindo apenas em P2, um contendo um aminoácido apolar volumoso nesta posição e o outro contendo um aminoácido apolar de cadeia lateral curta. Tal teste não foi feito no nosso trabalho.

Porém foram obtidos os parâmetros cinéticos para dois pares de substratos que diferem apenas em P2: D-Phe-L-Pro-L-Arg-pNA e D-Phe-L-Leu-L-Arg-pNA, além de AC-L-His-L-Arg-pNA e AC-L-Leu-L-Arg-pNA.

Os valores de K_M obtidos para o primeiro par foram, respectivamente, 15,2 μM e 45,2 μM . Ou seja, Pro no lugar de L-Leu em P2 leva a um ganho de afinidade na ligação enzima-substrato, o K_M reduz em 03 (três) vezes. O caráter rígido da prolina leva a um ajuste tridimensional mais adequado, o que permite uma ligação mais forte. Como os dois aminoácidos, L-Pro e L-Leu, são de tamanhos relativamente parecidos e ambos são de natureza apolar, é bastante provável que o fator mais importante a favorecer o ganho de afinidade seja mesmo o caráter rígido da prolina.

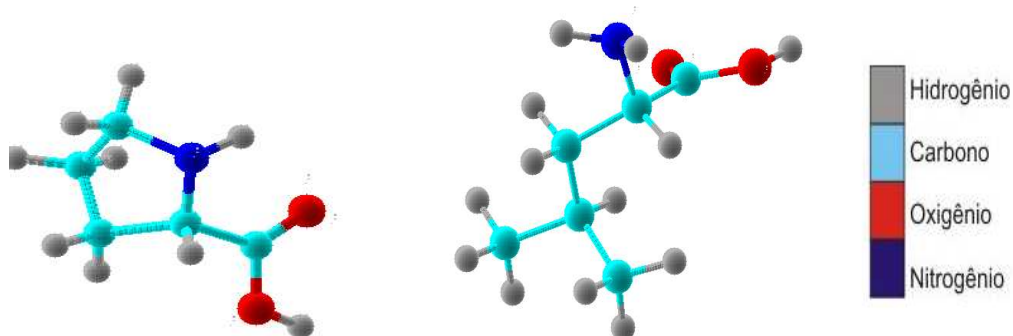


Figura 17: Estrutura tridimensional de L-Prolina (esq.) e L-Leucina (dir.)

Para o segundo par os valores de K_M são 209,5 μM para AC-L-His-L-Arg-pNA e 842,1 μM para AC-L-Leu-L-Arg-pNA. A presença de L-His em P2, quando comparado com L-Leu em P2 aumenta a afinidade da leucurobina pelo substrato, uma vez que o K_M é cerca de 4 (quatro) vezes menor.

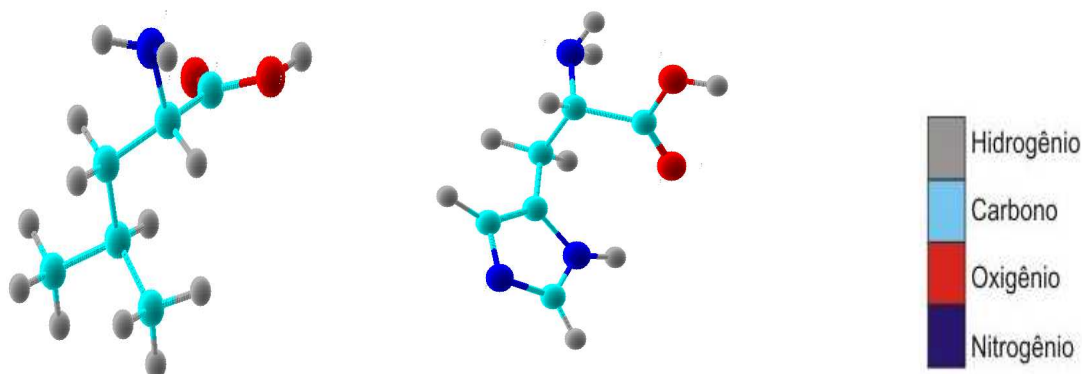


Figura 18: Estrutura tridimensional de L-Leucina (esq.) e L-Histidina (dir.)

Estes valores de K_M são um achado intrigante. A histidina tem natureza polar, enquanto a leucina é de natureza apolar. À primeira vista, estes valores de K_M nos indicam que o sítio S2 da leucurobina se liga melhor a um aminoácido polar, no caso a histidina, do que num aminoácido apolar, leucina no caso. No entanto, no presente trabalho apenas um substrato testado tinha um grupo de natureza polar. Tal fato nos impede de chegar a uma melhor definição das preferências da leucurobina em P2, principalmente no que é concernente à afinidade da ligação enzima-substrato. A histidina difere da leucina também em relação à rigidez (é mais rígida) e quanto ao tamanho (é um pouco maior), o que também pode contribuir para esta diferença de comportamento.

5.2.2 Interação S3 - P3

Os valores de K_M de quatro substratos testados poderão servir de base para a discussão sobre a interação S3-P3 e, conseqüentemente, para obtermos informações acerca do sítio S3 da leucurobina.

Ao compararmos os valores de K_M de dois substratos, AC-L-Leu-L-Arg-pNA e D-Phe-L-Leu-L-Arg-pNA podemos observar os seguintes pontos. Estes dois substratos são diferentes em P3, o primeiro apresentando uma D-Phe e o outro com um grupo acetil.

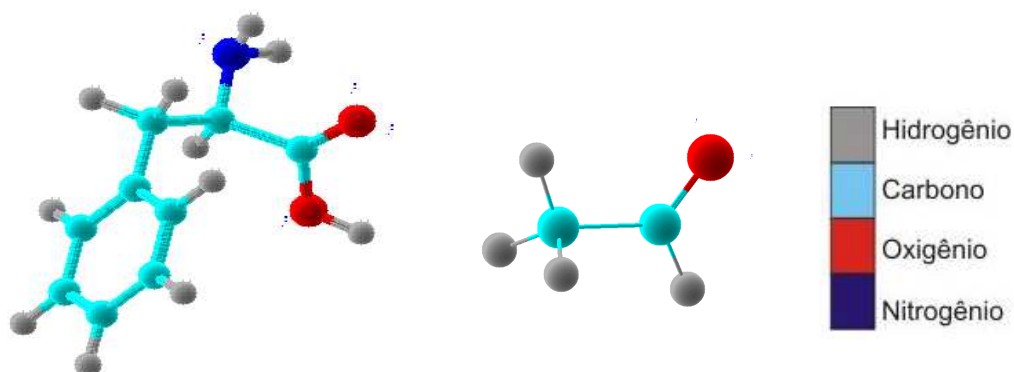


Figura 19: Estrutura tridimensional de L-Fenilalanina (esq.) e do grupo Acetil (dir.)

O substrato AC-L-Leu-L-Arg-pNA apresenta um K_M cerca de 19 vezes maior do que D-Phe-L-Leu-L-Arg-pNA, 842,1 μM e 45,2 μM respectivamente. Isto significa que o substrato contendo um resíduo de D-Phe em P3 se liga muito melhor à enzima quando comparado com aquele com acetil em P3. A presença de um aminoácido apolar volumoso em P3 favorece a interação com S3 da enzima e aumenta a afinidade, reduzindo portanto o K_M várias vezes. É de se pensar que o sítio S3 contém um orifício profundo e hidrofóbico, de tal forma que a fenilalanina se encaixa muito bem, favorecendo então o acoplamento do substrato ao centro ativo da enzima.

Outros dois substratos podem servir de base para tecermos algumas considerações acerca do subsítio S3, AC-L-Pro-L-Phe-L-Arg-pNA e AC-L-Ala-L-Phe-L-Arg-pNA. Estes substratos também se diferem em P3, um com L-Pro e o outro com L-Ala. AC-L-Pro-L-Phe-L-Arg-pNA apresentou um K_M quase três vezes menor que AC-L-Ala-L-

Phe-L-Arg-pNA, 189,3 μM e 532,6 μM respectivamente. É clara a preferência da leucurobina por um resíduo de Pro em P3, em detrimento da Ala.

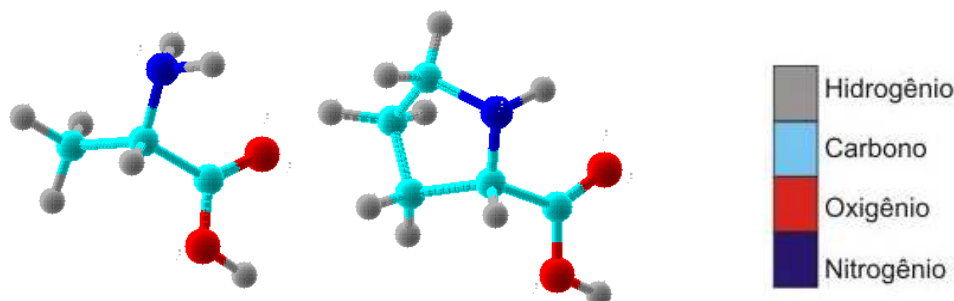


Figura 20: Estrutura tridimensional de L-Alanina (esq.) e L-Prolina (dir.)

Tal diferença de comportamento perante estes substratos se deve ao fato de que a alanina é diferente da prolina tanto em tamanho quanto na configuração espacial. Pro, como se vê, tem dois grupos metil a mais que Ala. Além disto, como dito anteriormente a prolina é um aminoácido que confere rigidez à cadeia peptídica em que está contida. Tais características da prolina parecem resultar num substrato que se encaixa de forma mais adequada no centro ativo da enzima, levando a um valor de K_M menor.

5.2.3 Interação S4 - P4

Algumas hipóteses podem ser levantadas sobre o subsítio S4 da leucurobina a partir da análise dos valores de K_M para substratos testados que diferem apenas em P4. Ao se comparar o K_M obtido para Bz-L-Pro-L-Phe-L-Arg-pNA, 371,8 μM , com o valor obtido para AC-L-Pro-L-Phe-L-Arg-pNA, 189,3 μM , verifica-se que o segundo se liga com mais afinidade à enzima, já que tem um K_M cerca de duas vezes menor.

Provavelmente isto se deve ao fato de que os grupos acetil e benzoil, presentes em P4 destes substratos, tem natureza química diferente. Estes dois grupos apresentam uma carbonila em sua estrutura, que é um grupo polar. Porém, a presença de um anel benzênico no benzoil reduz caráter polar deste grupo, o que não ocorre com o acetil, que tem apenas um grupo metila ligado à carbonila. O acetil tem maior momento dipolo do que o benzoil, portanto.

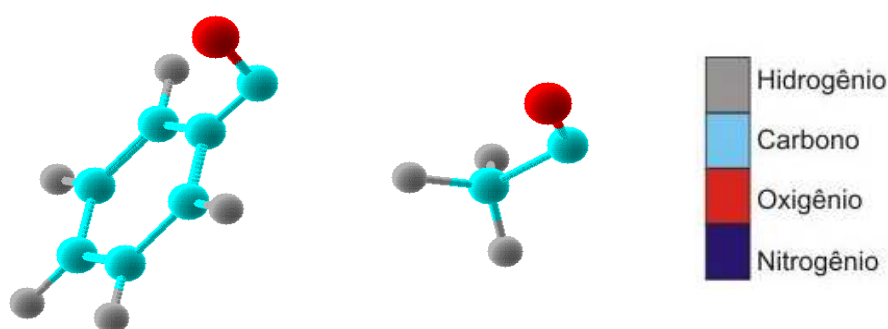


Figura 21: Estrutura tridimensional dos grupos Benzoil (esq.) e Acetil (dir.)

Estes grupamentos também diferem no tamanho, sendo o grupo benzoil consideravelmente maior (contém 05 átomos de carbono a mais que o acetil).

Portanto, dois fatores podem ser responsáveis pelas diferentes afinidades apresentadas por estes dois substratos, Bz-L-Pro-L-Phe-L-Arg-pNA e AC-L-Pro-L-Phe-L-Arg-pNA:

- a maior polaridade do acetil pode favorecer a ligação enzima substrato, enquanto o menor caráter polar do benzoil parece desfavorecer a ligação;
- a diferença de tamanho entre estes grupos, acetil e benzoil, também pode ser um fator, talvez mais importante. A carbonila é comum aos dois grupos e, portanto, poderia intermediar uma ligação de hidrogênio com S4 em ambos os substratos, mas o grupo benzênico do benzoil, devido ao seu tamanho, pode

dificultar o acoplamento enzima-substrato. O acetil, por ser um grupo menos volumoso, apresentaria menor dificuldade.

Tais observações sugerem ser S4 um sítio não muito profundo, o que dificulta o encaixe enzima-substrato de substratos com grupos mais volumosos em P4. Daí observarmos um menor valor de K_M (maior afinidade) para AC-L-Pro-L-Phe-L-Arg-pNA, com acetil em P4, quando comparado com BZ-L-Pro-L-Phe-L-Arg-pNA, que apresenta um benzoil nesta posição.

O caráter polar provavelmente é menos importante, uma vez que os dois grupos contêm uma carbonila.

5.3 CONSIDERAÇÕES SOBRE OS VALORES DE k_{cat} OBTIDOS PARA OS DIVERSOS SUBSTRATOS

Como se sabe, a obtenção experimental do valor exato de k_{cat} depende de conhecermos a concentração molar de enzima ativa. Neste trabalho a obtenção dos parâmetros cinéticos foi feita utilizando de uma mesma solução de enzima que foi dividida em alíquotas quando preparada e durante todo o tempo necessário para a conclusão deste experimento foi acondicionada em congelador e manteve a sua atividade sobre BZ-L-Arg-pNA constante. Desse modo, os valores obtidos de k_{cat} podem ser comparados.

A discussão seguinte sobre os valores de k_{cat} obtidos no presente trabalho será conduzida da mesma forma que com os valores de K_M , através da comparação deste parâmetro para os diversos substratos testados. Os dados de k_{cat} para todos os substratos testados estão na tabela 04.

5.3.1 Interação S2 – P2

A análise de dois pares de substratos poderão nos fornecer algumas informações sobre a influência que o grupo que ocupa P2 exerce na velocidade de um ciclo catalítico. São eles: D-Phe-L-Pro-L-Arg-pNA e D-Phe-L-Leu-L-Arg-pNA, bem como AC-L-Leu-L-Arg-pNA e AC-L-His-L-Arg-pNA.

Analisando os valores encontrados para o primeiro par temos que D-Phe-L-Pro-L-Arg-pNA teve um k_{cat} obtido de $0,359\text{ s}^{-1}$, enquanto D-Phe-L-Leu-L-Arg-pNA apresentou um k_{cat} de $0,815\text{ s}^{-1}$, ou seja, o ciclo catalítico do segundo substrato é mais de 2 (duas) vezes mais rápido do que o primeiro. Percebe-se então que L-Leu em P2 favorece a velocidade da catálise em maior grau que L-Pro na mesma posição no substrato.

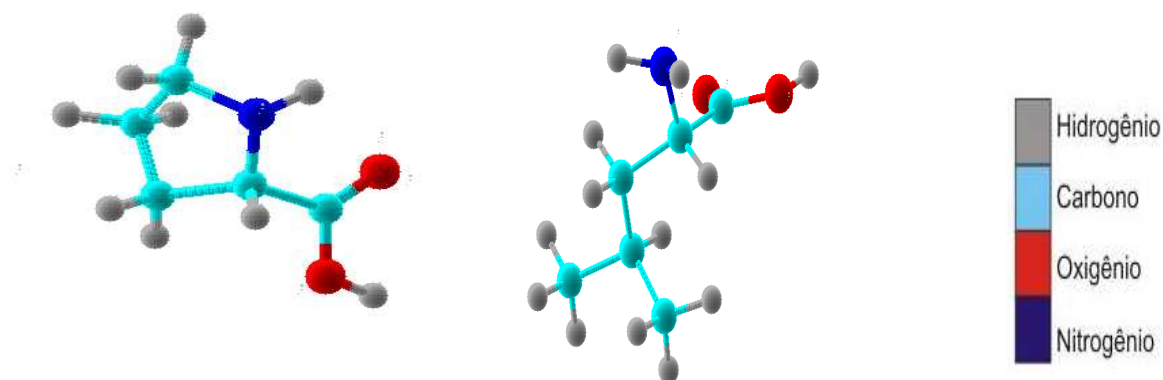


Figura 22: Estrutura tridimensional de L-Prolina (esq.) e L-Leucina (dir.)

A L-Leu em P2, quando comparado com L-Pro nesta posição, parece resultar numa estrutura tridimensional que resulta numa interação com o centro ativo da leucurobina mais favorável a um ciclo catalítico mais rápido. É digno de nota que apesar de que L-Leu em P2 favorece mais a velocidade do ciclo catalítico, L-Pro em

P2 favorece mais a ligação enzima-substrato, como já vimos na discussão sobre os valores de K_M .

O outro par de substratos a ser analisado é AC-L-His-L-Arg-pNA, com k_{cat} de $0,171\text{ s}^{-1}$, e AC-L-Leu-L-Arg-pNA, com k_{cat} de $2,823\text{ s}^{-1}$. Percebe-se que L-Leu em

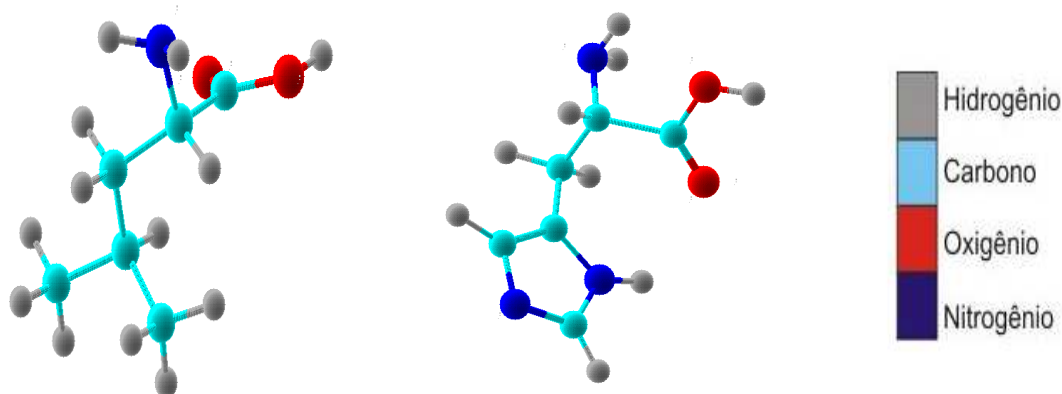


Figura 23: Estrutura tridimensional de L-Leucina (esq.) e L-Histidina (dir.)

P2, em comparação com L-His nesta posição, resulta num ciclo catalítico mais de 16 (dezesesseis) vezes mais rápido.

Aqui fica claro que a presença de L-Leu em P2 ajuda em muito na velocidade com que o ciclo catalítico ocorre quando comparada com L-His, na mesma posição. É de se notar também que, de acordo com o que foi discutido sobre os valores de K_M para estes dois substratos, é L-His que contribui mais para a ligação, quando comparado com L-Leu em P2. Aqui percebemos que, como ocorreu com a interação S1-P1, já discutida anteriormente, a troca de um determinado grupo na posição P2 por outro grupo pode melhorar a afinidade (e causar uma redução no K_M) ao mesmo passo em que causa um aumento do tempo de duração de um ciclo catalítico, reduzindo portanto o valor de k_{cat} .

5.3.2 Interação S3 – P3

Para analisar a participação da interação S3-P3 na velocidade de um ciclo catalítico serão discutidos principalmente os valores de dois pares de substratos trabalhados. Em cada par a diferença de um substrato pelo outro reside na troca de um grupo por outro em P3. São eles: AC-L-Pro-L-Phe-L-Arg-pNA e AC-L-Ala-L-Phe-L-Arg-pNA, além de D-Phe-L-Leu-L-Arg-pNA e AC-L-Leu-L-Arg-pNA.

Verificando os dados obtidos para o primeiro par vemos que AC-L-Pro-L-Phe-L-Arg-pNA tem um k_{cat} de $0,241 \text{ s}^{-1}$ enquanto AC-L-Ala-L-Phe-L-Arg-pNA apresentou um k_{cat} de $1,723 \text{ s}^{-1}$. A L-Ala em P3, quando comparada com L-Pro na mesma posição resulta numa diminuição do tempo de duração de um ciclo catalítico de cerca de 7 (sete) vezes.

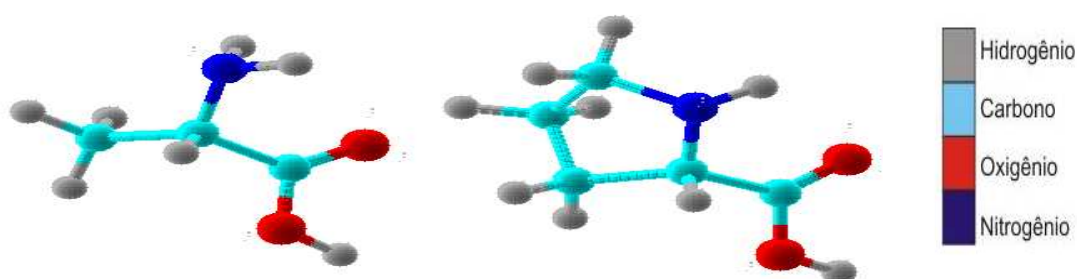


Figura 24: Estrutura tridimensional de L-Alanina (esq.) e L-Prolina (dir.)

Aqui temos novamente a situação em que a troca de um aminoácido numa determinada posição leva a um aumento na afinidade pela enzima, mas causa um aumento no tempo de duração do ciclo catalítico. A L-Pro em P3, quando comparada com L-Ala na mesma posição, causa uma diminuição no K_M de quase 3

(três) vezes, um aumento da afinidade portanto, ao mesmo passo em que o k_{cat} cai cerca de 7 (sete) vezes.

D-Phe-L-Leu-L-Arg-pNA e AC-L-Leu-L-Arg-pNA são outro par que permite inferir algumas informações acerca da interação S3-P3. Os valores obtidos de k_{cat} foram

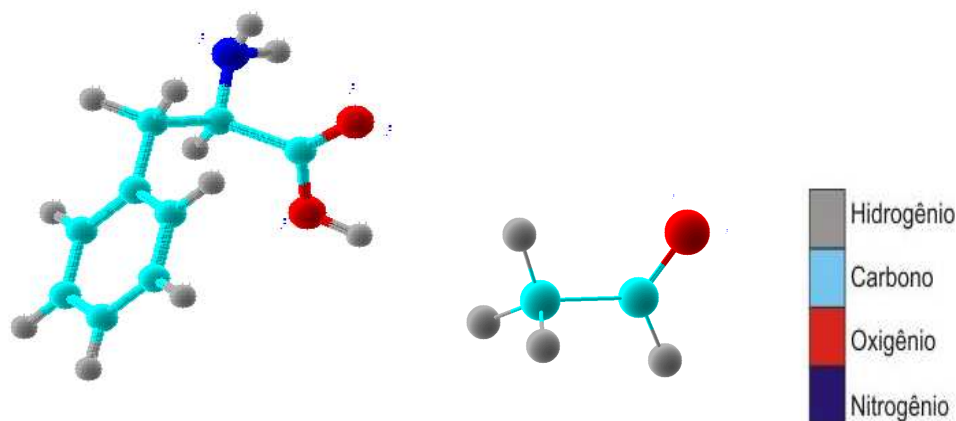


Figura 25: Estrutura tridimensional de D-Fenilalanina (esq.) e do grupo acetil (dir.)

respectivamente $0,815 \text{ s}^{-1}$ e $2,823 \text{ s}^{-1}$, ou seja, a permuta de D-Phe por um grupo acetil em P3 levou a uma diminuição de 3,5 vezes no período de duração de um ciclo catalítico. Aqui novamente a seguinte situação: D-Phe em P3 resultou numa estrutura que se liga com mais afinidade à enzima (K_M caiu mais de 18 vezes), mas o tempo de duração da catálise aumentou mais de três vezes. Percebe-se aqui que D-Phe em P3 colabora com a ligação mas prejudica o ciclo de catálise. A natureza química de D-Phe, bem como sua configuração espacial é diferente do acetil, o que certamente influencia neste comportamento.

5.3.3 Interação S4 – P4

Apenas um par de substratos testados pode servir de base para levantarmos algumas considerações sobre a influência da interação S4-P4 nos valores de k_{cat} . Os substratos são BZ-L-Pro-L-Phe-L-Arg-pNA com um k_{cat} de $0,273 \text{ s}^{-1}$ e AC-L-Pro-L-Phe-L-Arg-pNA com k_{cat} de $0,241 \text{ s}^{-1}$.

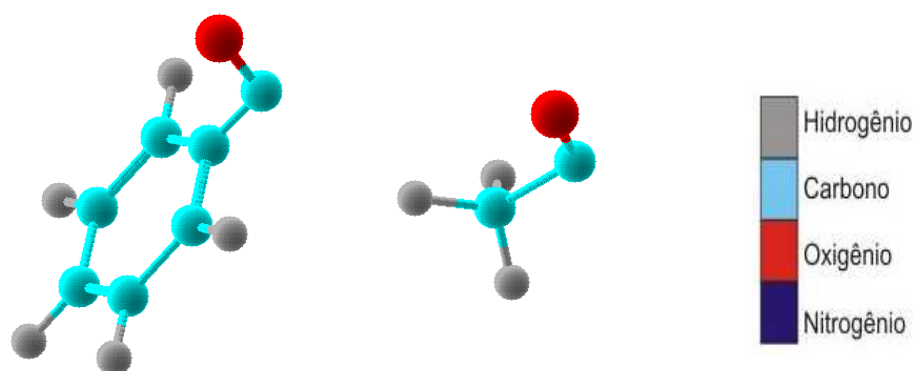


Figura 26: Estrutura tridimensional dos grupos benzóil (esq.) e acetil (dir.)

Aqui percebe-se que apesar da permuta de um grupo polar em P4 por um grupo apolar, não ocorreu variação significativa no k_{cat} .

Tal fato provavelmente se deve a que o grupo em P4 está mais afastado da ligação clivada e, por isto, uma mudança em P4 não leva a grandes alterações estruturais na região espacial onde ocorre a clivagem. Mais testes com substratos variando apenas em P4 poderiam fornecer mais informações.

5.4 CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE OS PARÂMETROS CINÉTICOS ENCONTRADOS PARA OS DIVERSOS SUBSTRATOS

Os parâmetros cinéticos obtidos neste trabalho fornecem várias informações acerca do comportamento da leucurobina frente aos diversos substratos testados. Fica claro, por exemplo, que os valores de K_M e k_{cat} isolados não indicam necessariamente se a leucurobina é pouco ou muito ativa sobre determinado substrato. Um determinado grupo que auxilia na ligação pode prejudicar o ciclo catalítico e outro que prejudica a ligação pode favorecer a redução do tempo de duração do ciclo catalítico. Fica clara portanto a importância da constante de especificidade, que é a relação existente entre o k_{cat} e o K_M . Assim temos uma grandeza que permite uma melhor estimativa da atividade de uma enzima sobre determinado substrato. A combinação portanto de uma alta afinidade (baixo K_M) com um rápido ciclo catalítico (alto k_{cat}) faz com que uma enzima seja muito ativa sobre seu substrato. O substrato que melhor conjuga K_M com k_{cat} de forma a resultar numa alta constante de especificidade é o D-Phe-L-Pro-L-Arg-pNA.

5.5 D-Phe-L-Pro-L-Arg-pNA É O SUBSTRATO COM MAIOR CONSTANTE DE ESPECIFICIDADE (k_{cat}/K_M) PARA A LEUCUROBINA DENTRE OS TESTADOS

D-Phe-L-Pro-L-Arg-pNA mostrou-se o substrato com maior afinidade pela leucurobina dentre aqueles que foram testados. Este substrato contém uma L-Arg em P1, uma L-Pro em P2 e uma D-Phe em P3. Estes aminoácidos estão numa seqüência ótima para que ocorra uma ligação de alta afinidade com a leucurobina.

Como visto na discussão anterior sobre os valores de K_M e sobre as preferências da leucurobina em P1, podemos ver que:

- a leucurobina se liga bem àqueles substratos contendo grupos básicos em P1, principalmente Arg e Lys, interação que é de origem eletrostática, devida à presença de um resíduo de Asp no centro ativo da enzima, em S1
- a leucurobina se liga bem (tem baixos valores de K_M) àqueles substratos contendo prolina em P2;
- a leucurobina mostrou aceitar bem um grupo apolar volumoso em P3

Estas observações nos permitem verificar que D-Phe-L-Pro-L-Arg-pNA preenche mais completamente os requisitos necessários para uma boa ligação com a leucurobina. Devido a isto D-Phe-L-Pro-L-Arg-pNA é o substrato com maior afinidade com a leucurobina e tem, portanto, o menor valor de K_M dentre os substratos testados (15,1 μM).

O valor de k_{cat} para este substrato é de 0,359 s^{-1} , o quarto maior k_{cat} dentre os obtidos neste trabalho.

A leucurobina apresentou constante de especificidade portanto de 23.618 $\text{s}^{-1}.\text{M}^{-1}$ para o substrato D-Phe-L-Pro-L-Arg-pNA nas condições de trabalho utilizadas, a maior dentre os substratos já testados. Sobre este substrato algumas considerações serão levadas adiante.

D-Phe-L-Pro-L-Arg-pNA é bastante parecido com D-Phe-Pip-Arg-pNA, um substrato que mimetiza a seqüência clivada pela trombina ao ativar o fator XIII. A diferença reside apenas no anel do pipercolil que contém um grupo metil a mais que a prolina.

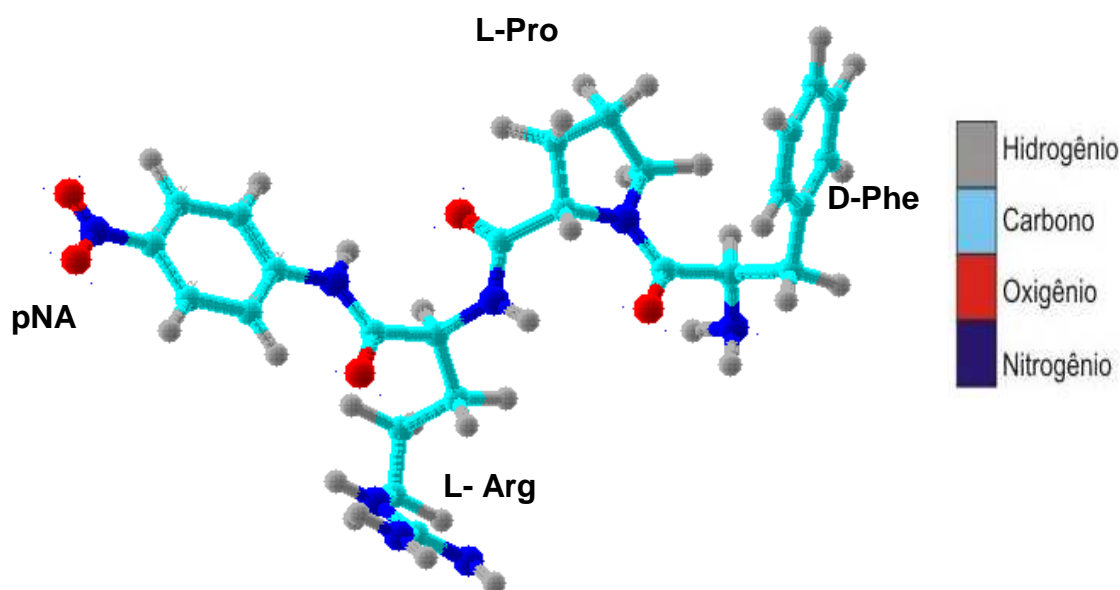


Figura 27 – Estrutura tridimensional do substrato cromogênico D-Phe-L-Pro-L-Arg-pNA

Além disto, esta seqüência de aminoácidos (D-Phe-L-Pro-L-Arg) é a mesma apresentada por um importante inibidor irreversível de trombina, D-Phe-L-Pro-L-Arg-CO-CH₂-Cl. Diversos inibidores de trombina que mimetizam esta seqüência de aminoácidos estão disponíveis sendo que outros com este mesmo motivo estão sendo investigados (Bode et al., 1992; Lange et al., 2003; Marinko et al., 2004).

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

do substrato (ou inibidor) ser complementar ao centro ativo permite um alto grau de interação e, conseqüentemente, grande afinidade.

A partir disto podem-se fazer as seguintes considerações:

- o fato de que D-Phe-L-Pro-L-Arg-CO-CH₂-Cl ser inibidor irreversível de trombina indica que esta molécula tem estrutura tridimensional complementar ao sítio ativo desta enzima;
- o fato de que D-Phe-L-Pro-L-Arg-pNA é substrato para trombina indica que esta molécula também tem um certo grau de complementaridade com o centro ativo desta enzima.

A leucurobina demonstrou ter boa atividade sobre D-Phe-L-Pro-L-Arg-pNA, indicando que seu centro ativo se encaixa bem com este substrato. De fato, o K_M da leucurobina encontrado para este substrato (15,1 μ M) é o mais baixo dentre todos os substratos testados, indicando haver forte ligação. A trombina também mostrou baixo K_M para este substrato (41,2 μ M), da mesma ordem de grandeza. Juntando a isto o fato da trombina apresentar um baixo K_i para o inibidor irreversível D-Phe-L-Pro-L-Arg-CO-CH₂-Cl, pode-se inferir que tanto a trombina quanto a leucurobina contém um centro ativo que se liga muito bem com a sequência de aminoácidos D-Phe-L-Pro-L-Arg. Isto nos leva a inferir que há um alto grau de semelhança entre os centros ativos de trombina e leucurobina.

No entanto, a leucurobina, apesar de exibir boa atividade liberadora de fibrinopeptídeo A (FPA) do fibrinogênio, não exibiu o mesmo perfil de atividade da trombina sobre os substratos naturais desta última: a leucurobina não apresenta atividade considerável sobre a cadeia B β do fibrinogênio, pois libera fibrinopeptídeo B (FPB) muito lentamente e não ativa o fator XIII (Magalhães et al., 2006).

Apesar de apresentar um centro ativo semelhante, o fato da leucurobina não exibir o mesmo perfil de atividade que a trombina sobre os substratos naturais desta não pode ser considerado uma contradição. Sabe-se que a trombina possui dois subsítios de reconhecimento (*do inglês exosites I e II*) que estão próximos ao sítio catalítico e que são importantes, dentre outros fatores, para a ligação da trombina com seus substratos naturais. Estes sítios de ligação não estão presentes nas SVTLE's, o que explica em parte este aparente paradoxo entre atividades parecidas da leucurobina e trombina perante substratos pequenos e diferentes perante substratos naturais.

Outra enzima semelhante à trombina que também é inibida por D-Phe-L-Pro-L-Arg-CO-CH₂-Cl é a batroxobina, proveniente de *Bothrops atrox*. Stürzebecher e cols. (1986) descreveu que este substrato inibe a atividade da batroxobina de forma irreversível, o que sugere ligação de altíssima afinidade. Pode-se inferir portanto que, da mesma forma que com a trombina, a leucurobina tem um centro ativo de topografia semelhante à batroxobina.

No trabalho de Magalhães e cols. (2006) foi descrita a sequência primária quase completa (96%) da leucurobina e ficou observado que esta enzima apresenta sua sequência primária quase idêntica à da batroxobina. Tal observação reforça a suspeita de que haja um alto grau de semelhança entre estas duas enzimas.

Esta é uma inferência importante, haja vista que a batroxobina já é utilizada como ferramenta diagnóstica para verificação do teor de fibrinogênio em pacientes heparinizados, uma vez que a batroxobina não é inibida pela heparina, diferentemente da trombina. Este teste diagnóstico é comercializado sob o nome de Reptilase[®], sendo fabricado pela American Diagnóstica Inc. Testes sobre a atividade coagulante da leucurobina sobre fibrinogênio na presença de heparina são

necessários para verificar se a leucurobina se comporta da mesma forma que a batroxobina.

5.6 D-Phe-L-Leu-L-Arg-pNA É O SUBSTRATO COM A SEGUNDA MAIOR CONSTANTE DE ESPECIFICIDADE (k_{cat}/K_M) PARA A LEUCUROBINA DENTRE OS TESTADOS

O substrato D-Phe-L-Leu-L-Arg-pNA apresentou uma constante de especificidade de $18.031 \text{ s}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$, a segunda maior dentre os substratos testados. Esta observação merece alguns comentários.

Este substrato difere do melhor substrato da série apenas em P2, com L-Leu no lugar de L-Pro. Esta permuta levou a uma diminuição da afinidade (K_M aumentou de 15,1 para 45,2 μM), mas causou uma diminuição no período de duração de um ciclo catalítico (k_{cat} aumentou de 0,359 s^{-1} para 0,815 s^{-1}). O que se tira disto é que L-Leu em P2, quando comparado com L-Pro, levou a uma diminuição da afinidade, mas causa uma aceleração no ciclo catalítico.

A menor constante de especificidade apresentada por D-Phe-L-Leu-L-Arg-pNA em comparação com D-Phe-L-Pro-L-Arg-pNA ($18.031 \text{ s}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$ contra $23.618 \text{ s}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$) é devida, portanto, à menor afinidade que a leucurobina apresentou por este substrato.

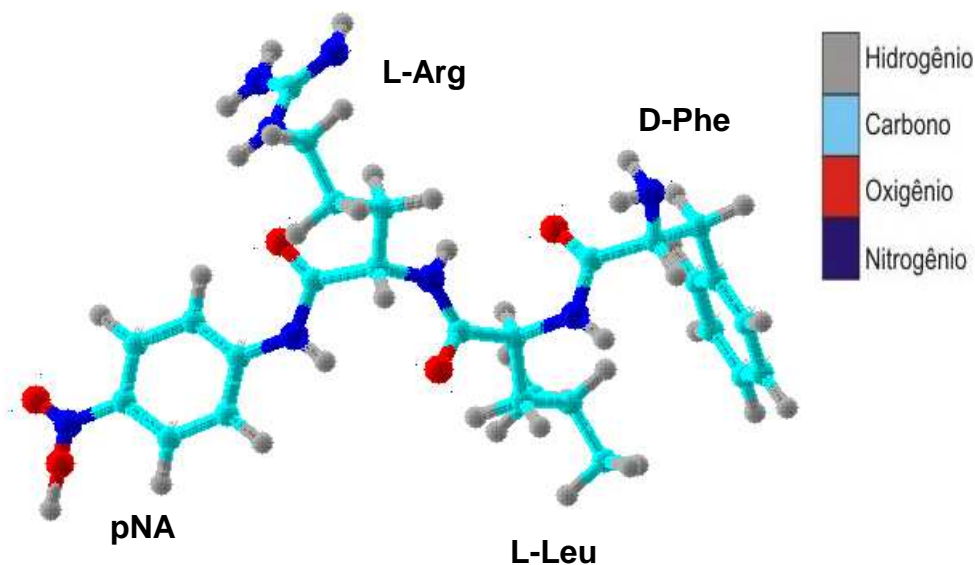


Figura 28 – Estrutura química do substrato cromogênico D-Phe-L-Leu-L-Arg-pNA

No entanto, esta diferença de especificidade não é tão grande e pode-se dizer que a leucurobina tem boa atividade por ambos substratos, ao contrário dos outros substratos testados, cujas constantes de especificidade foram bem mais baixas. De fato, as características destes dois substratos são semelhantes, o que explica esta situação. Ambos os substratos, como já dito, apresentam os mesmos resíduos em P1 e P3. A leucina, apesar de diferente da prolina no que se refere à rigidez apresentada por este último, também é de natureza apolar e seu tamanho não é muito diferente (apresenta um grupo metil a mais).

5.7 CONSIDERAÇÕES ACERCA DA ATIVIDADE DA LEUCUROBINA SOBRE D-Phe-L-Pro-L-Arg-pNA NA PRESENÇA DE CÁTIONS Na^+ , K^+ , Mg^{+2} E Ca^{+2}

5.7.1 Cátions monovalentes (K^+ e Na^+)

A leucurobina apresentou uma redução na sua atividade frente ao substrato D-Phe-L-Pro-L-Arg-pNA na presença de cátions Na^+ e K^+ . Considerando a atividade na ausência destes cátions como 100% de atividade, os seguintes dados foram alcançados:

- na concentração de 0,038 M do respectivo cátion, a leucurobina apresentou uma atividade residual de 83,1% para K^+ e 67,5% para Na^+ ;
- na concentração de 0,076 M, a atividade residual foi de 62,4% para K^+ e de 50,1% para Na^+ ;
- na concentração de 0,151 M a atividade caiu ainda mais, ficando em 51,1% para K^+ e 39,1% para Na^+ .

Observa-se que o grau de redução da atividade aumenta com o aumento da concentração molar do cátion no meio de reação, o que será discutido logo à frente.

5.7.2 Cátions divalentes (Mg^{+2} e Ca^{+2})

A leucurobina apresentou uma redução na sua atividade frente ao substrato D-Phe-L-Pro-L-Arg-pNA na presença de cátions Ca^{+2} e Mg^{+2} . Considerando a atividade na ausência destes cátions como 100% de atividade, os seguintes dados foram obtidos:

- na concentração de 0,038 M do respectivo cátion, a leucurobina apresentou uma atividade residual de apenas 33,3% para Ca^{+2} e 41,8% para Mg^{+2} ;

- na concentração de 0,076 M, a atividade residual foi de 23,6% para Ca^{+2} e de 34,6% para Mg^{+2} ;
- na concentração de 0,151 M a atividade caiu ainda mais, ficando em 19,9 para Ca^{+2} e 26,6% para Mg^{+2} .

Assim como os cátions monovalentes, os cátions divalentes reduzem a atividade da leucurobina frente ao D-Phe-L-Pro-L-Arg-pNA, sendo que o grau de inibição aumenta com o aumento da concentração destes cátions no meio.

Porém, uma análise mais cuidadosa sobre estes dados mostra que os cátions divalentes Ca^{+2} e Mg^{+2} exercem um efeito inibitório sobre a leucurobina mais pronunciado que os cátions monovalentes quando presentes na mesma concentração molar.

As seguintes hipóteses podem explicar o comportamento da leucurobina frente aos cátions testados:

- **Interação S1-P1:** Sabe-se que a interação entre S1 e P1 em enzimas semelhantes à trombina é de natureza eletrostática, o que dita a especificidade destas enzimas por substratos contendo um aminoácido carregado positivamente em P1, Arg ou Lys. Tal fato se deve à presença de um resíduo de Asp em S1 contendo um grupo carboxílico carregado negativamente (figura abaixo). Portanto, a ligação do substrato ao sítio catalítico é favorecida por esta interação. Porém, este tipo de interação certamente não ocorre apenas entre os grupos carregados em S1 e P1. Os cátions presentes no meio provavelmente competem com o substrato pela carga negativa do Asp presente em S1, desfavorecendo a ligação

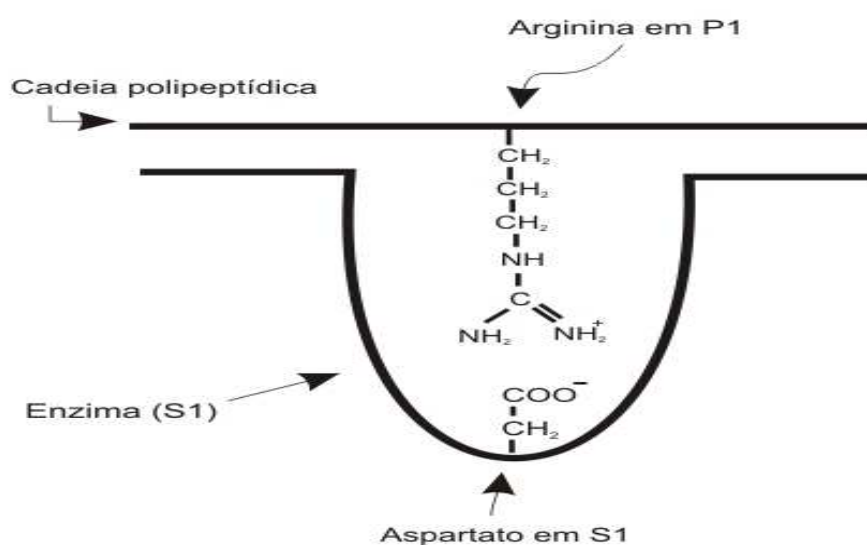


Figura 29 - Interação entre Arg situada em P1 e Asp situado em S1

enzima-substrato e conseqüentemente diminuindo a atividade enzimática. Os cátions com carga dupla exercem um efeito inibidor mais potente uma vez que competem mais fortemente pela carga negativa do resíduo de Asp no centro ativo da enzima.

- **Aumento da força iônica:** o aumento da força iônica, causado pelo aumento da concentração de sais em solução, leva a uma diminuição da atração entre íons de carga oposta e, conseqüentemente, desfavorece a interação entre a Arg em P1 e o Asp em S1. Tal fato também pode explicar a atividade inibidora destes íons sobre a leucurobina. A força iônica de uma solução depende da concentração molar de cada íon, mas também da carga destes íons. Quanto maior a carga do íon maior será seu efeito na força iônica. Portanto, soluções com mesma molaridade, mas compostas por sais de cátions com diferentes cargas terão maior força iônica. Este é o caso das soluções testadas neste trabalho. As soluções de MgCl_2 e CaCl_2 1,0 M tem força iônica duas vezes maior que soluções de NaCl e KCl 1,0 M. Certamente tal fato também contribui

para que os íons magnésio e cálcio tenham maior poder inibitório sobre a leucurobina. A maior força iônica apresentada por soluções equimolares de cátions divalentes, comparada às soluções de cátions monovalentes, resulta numa menor interação entre íons de carga oposta, e conseqüentemente, desfavorece ainda mais a interação P1-S1. O aumento da força iônica da solução pode também quebrar o padrão normal de interações eletrostáticas que mantém a estrutura da enzima, o que pode levar a uma alteração conformacional no centro ativo e alterar a atividade da leucurobina, o que também pode explicar o comportamento da leucurobina perante íons.

- **Interação com outros sítios da leucurobina:** uma outra possível explicação para este comportamento da leucurobina frente a estes cátions é a que se segue. Pode haver alguma interação destes cátions com outra região da enzima que não o centro ativo, mas que altere a configuração tridimensional do sítio de catálise, interferindo na interação enzima-substrato de tal forma a prejudicar a atividade enzimática.

A obtenção de parâmetros cinéticos (K_M , k_{cat} e k_{cat}/K_M) para este substrato em diferentes concentrações destes íons poderia nos fornecer mais informações acerca do comportamento exibido pela leucurobina perante estes íons.

5.8 CONSIDERAÇÕES A RESPEITO DA ATIVIDADE AMIDÁSICA DA LEUCUROBINA DEGLICOSILADA

A leucurobina deglicosilada apresentou atividade semelhante à leucurobina nativa sobre soluções equimolares de D-Phe-L-Pro-L-Arg-pNA. Tomando a atividade da

enzima nativa como 100%, verifica-se que a leucurobina apresentou atividade de 90,5%, o que não é uma diferença tão significativa.

O que podemos inferir de tal fato é que pelo menos com relação àqueles substratos de cadeia curta, a cobertura de carboidratos que recobre a enzima nativa não tem participação no acoplamento com o substrato e sua ausência não interfere na atividade da leucurobina sobre estes substratos.

Uma hipótese que explica este comportamento parecido frente a substratos pequenos seria que a fração glicídica da leucurobina está ligada numa região distante da fenda do centro ativo. Daí o fato de que não interfere na atividade sobre estes substratos.

A participação desta fração glicídica no reconhecimento de substratos mais longos, como é o caso do fibrinogênio, será discutida à frente.

5.9 CONSIDERAÇÕES ACERCA DA ATIVIDADE COAGULANTE DA LEUCUROBINA SOBRE PLASMA HUMANO CITRATADO

5.9.1 Atividade coagulante da leucurobina nativa sobre plasma humano citratado

Os testes com a leucurobina purificada revelaram que esta protease tem forte atividade coagulante *in vitro* sobre plasma humano citratado. Como verifica-se na Figura 10, o tempo de coagulação médio obtido foi de apenas cerca de 8 (oito) segundos. Tal fato permite algumas considerações.

Os componentes do plasma citratado não inibem a atividade coagulante *in vitro* da leucurobina. Dentre estes componentes, que poderiam exercer alguma atividade

inibidora sobre a leucurobina, estão as serpinas (serine proteases inhibitors), que são proteínas presentes no plasma sanguíneo que muitas vezes inibem a atividade de coagulases oriundas de venenos de serpente. As principais são a α_2 -macroglobulina e a α_1 -antitripsina. Esta é uma característica da leucurobina que também ocorre com a trombina, o que também mostra a semelhança existente entre estas duas enzimas.

É de se salientar também que a leucurobina apresentou atividade coagulante mesmo na presença de citrato. Como se sabe, o citrato é um agente quelante cuja constante de ligação com o cálcio é muito alta. Isto leva a um seqüestro quase que total do cálcio plasmático e, conseqüentemente, à anticoagulação. O significado disto é que, de forma semelhante à trombina, a leucurobina apresenta atividade coagulante independente de cálcio. É sabido que alguns fatores importantes da cascata da coagulação são cálcio-dependentes. São eles os fatores X_a , IX_a , VII_a e Proteína C ativada. No entanto, a última etapa (proteólise do fibrinogênio e polimerização dos monômeros de fibrina) que é catalisada pela trombina, não depende de cálcio (Page et al., 2005). Tal fato reforça a semelhança existente entre a trombina e a leucurobina, no que tange a atividade coagulante sobre plasma citratado, uma vez que estas duas enzimas atuam sobre o fibrinogênio sem necessidade de cálcio.

5.9.2 Atividade coagulante da leucurobina deglicosilada sobre plasma humano citratado

Como evidenciado neste experimento a atividade coagulante da leucurobina deglicosilada (sem sua fração glicídica) sobre plasma citratado não diferiu de forma

significativa da leucurobina nativa. O tempo de coagulação foi bastante semelhante (7,8 s contra 8,2 s, respectivamente), quando utilizadas amostras das duas formas da leucurobina em iguais concentrações de enzima ativa. O significado disto é que a fração glicídica contida na leucurobina nativa secretada pela glândula de veneno de *B. leucurus* não participa da sua interação com o fibrinogênio. Provavelmente o pareamento da leucurobina com o fibrinogênio ocorre por um sítio da enzima distante dos pontos onde a fração glicídica está ligada e sua deglicosilação por tratamento com PNGase não interfere, portanto, na sua atividade coagulante.

5.10 CONSIDERAÇÕES A RESPEITO DA ATIVIDADE COAGULANTE DA LEUCUROBINA SOBRE FIBRINOGENIO HUMANO

5.10.1 Comparação da atividade sobre fibrinogênio da enzima nativa e da enzima deglicosilada

Como já era esperado, tendo em vista os experimentos com plasma humano, a leucurobina apresentou atividade coagulante sobre solução de fibrinogênio bovino a 4,0 mg/mL. A atividade coagulante das leucurobinas nativa e deglicosilada foram muito semelhantes, com os tempos de coagulação de 6,5 s e 6,4 s, respectivamente, reforçando a idéia da não participação da fração glicídica da leucurobina na sua interação com o fibrinogênio e, portanto, na sua atividade coagulante.

5.10.2 Atividade da leucurobina sobre fibrinogênio na presença de cátions mono e divalentes

Após a verificação de que cátions mono e divalentes inibem a atividade amidásica da leucurobina sobre D-Phe-L-Pro-L-Arg-pNA, um substrato relativamente pequeno, partiu-se para a verificação do efeito destes cátions na atividade da leucurobina sobre fibrinogênio, um substrato bem maior. O parâmetro utilizado para esta análise foi a contagem do tempo de coagulação de uma solução de fibrinogênio com diferentes concentrações do cátion em teste. As concentrações de cátions utilizadas são idênticas às utilizadas no experimento que verificou o efeito de cátions na atividade sobre D-Phe-L-Pro-L-Arg-pNA. Ao se observar os dados obtidos pode-se perceber a leucurobina se comportou de forma diferente perante cátions monovalentes e divalentes, o que será delineado a seguir:

- **Cátions monovalentes (Na^+ e K^+):** tanto o sódio quanto o potássio causaram inibição da atividade coagulante da leucurobina sobre fibrinogênio, o que foi observado pelo aumento do tempo de coagulação com concentrações molares crescentes destes cátions. O sódio nas concentrações de 0,0 M, 0,038M, 0,076M e 0,152M levou respectivamente a tempos de coagulação de 6,1 segundos, 9,5 segundos, 18,5 segundos e 29,2 segundos. Já o potássio, nestas mesmas concentrações, levou aos seguintes tempos de coagulação, respectivamente: 6,1 segundos, 11,4 segundos, 22,5 segundos e 24,2 segundos.
- **Cátions divalentes (Ca^{+2} e Mg^{+2}):** o magnésio e o cálcio, de forma diferente, não inibiram a atividade coagulante da leucurobina nas concentrações utilizadas. O magnésio nas mesmas concentrações do sódio e potássio levou a tempos de coagulação de, respectivamente, 6,1 segundos, 6,0 segundos, 8,5 segundos e

7,2 segundos. Já o cálcio apresentou respectivamente 6,1 segundos, 6,0 segundos, 7,1 segundos e 9,2 segundos como tempos necessários para a formação do coágulo. Estas pequenas diferenças não são significativas para este tipo de análise, o que mostra que a atividade coagulante da leucurobina foi preservada.

Como pode-se perceber, os cátions apresentaram dois perfis de atuação sobre a leucurobina. Os cátions monovalentes inibiram a atividade coagulante enquanto os cátions divalentes não demonstraram efeito sobre esta propriedade. Esta é uma verificação no mínimo curiosa. Como já foi visto, os cátions divalentes exerciam um efeito inibitório mais potente sobre a atividade amidásica da leucurobina sobre D-Phe-L-Pro-L-Arg-pNA, quando comparados com os cátions monovalentes. Portanto, há uma situação aparentemente contraditória. Os cátions divalentes, cálcio e magnésio, inibem fortemente a atividade sobre substratos pequenos mas não inibem a atividade coagulante nas concentrações testadas, enquanto os cátions monovalentes, sódio e potássio, inibem tanto a atividade amidásica sobre D-Phe-L-Pro-L-Arg-pNA quanto a atividade coagulante sobre fibrinogênio.

Quanto ao comportamento exibido em relação ao sódio e potássio podemos considerar o seguinte. A atividade coagulante da leucurobina ser inibida por estes íons está de perfeito acordo com o fato de que estes íons inibem a sua atividade amidásica. As hipóteses consideradas anteriormente para explicar a influência destes íons na atividade sobre D-Phe-L-Pro-L-Arg-pNA também podem ser aplicadas aqui, para explicar a inibição da atividade coagulante sobre fibrinogênio.

Como se sabe, o resíduo de Asp no subsítio S1 da leucurobina, assim como de outras serino-proteases é carregado negativamente, o que direciona a especificidade da leucurobina por grupos carregados positivamente em P1, Lys e

Arg, com preferência por este último, como já vimos. A ligação clivada na cadeia α do fibrinogênio é uma ligação peptídica Arg-Gly, com Arg em P1, daí a atividade sobre o fibrinogênio apresentada pela leucurobina. No entanto, íons carregados positivamente em solução competem com o fibrinogênio pela carga negativa do Asp em S1. Daí a inibição da atividade coagulante apresentada por estes íons.

Outro possível fator interferente é a força iônica. Sabe-se que quanto maior a força iônica de uma solução menor é a atratividade entre cargas opostas. Assim, o aumento da concentração de íons em solução aumenta a força iônica e conseqüentemente prejudica todas as interações eletrostáticas entre o fibrinogênio e a leucurobina, inclusive a interação S1-P1, levando então a uma diminuição da atividade coagulante, como foi verificado.

Tais hipóteses são fortalecidas devido ao fato de que este poder inibidor cresce com a concentração destes íons no meio.

Já em relação aos íons divalentes, cálcio e magnésio, o comportamento exibido foi diferente, como já mostrado. O fato de que estes íons inibem fortemente a atividade amidásica mas não prejudicam a formação do coágulo pode encontrar explicação no processo de formação do coágulo de fibrina, tratado a seguir.

Podemos resumir o processo final de formação do coágulo de fibrina em três etapas básicas (Côté et al., 1998) :

1. proteólise do fibrinogênio liberando fibrinopeptídeo A (a trombina também libera fibrinopeptídeo B por clivagem da cadeia β), o que expõe novos sítios de ligação na região central da molécula de fibrinogênio clivada. São os monômeros de fibrina;

2. espontânea polimerização dos monômeros de fibrina formando protofibrilas, através de interações não-covalentes entre as regiões expostas pela clivagem e sítios complementares na molécula de fibrina,
3. estabilização da rede de fibrina pelo fator XIII_a, que promove a formação de ligações covalentes entre as cadeias α e γ .

No experimento utilizado para verificarmos a influência de cátions na atividade coagulante foi utilizada solução de fibrinogênio bovino purificado, sem a presença portanto do fator XIII_a. Esta última etapa, que conta com a participação do fator XIII_a não ocorre portanto.

Desta forma, neste experimento, o tempo de coagulação depende de duas etapas, a proteólise do fibrinogênio e a polimerização dos monômeros de fibrina. Estas etapas são representadas na figura a seguir:

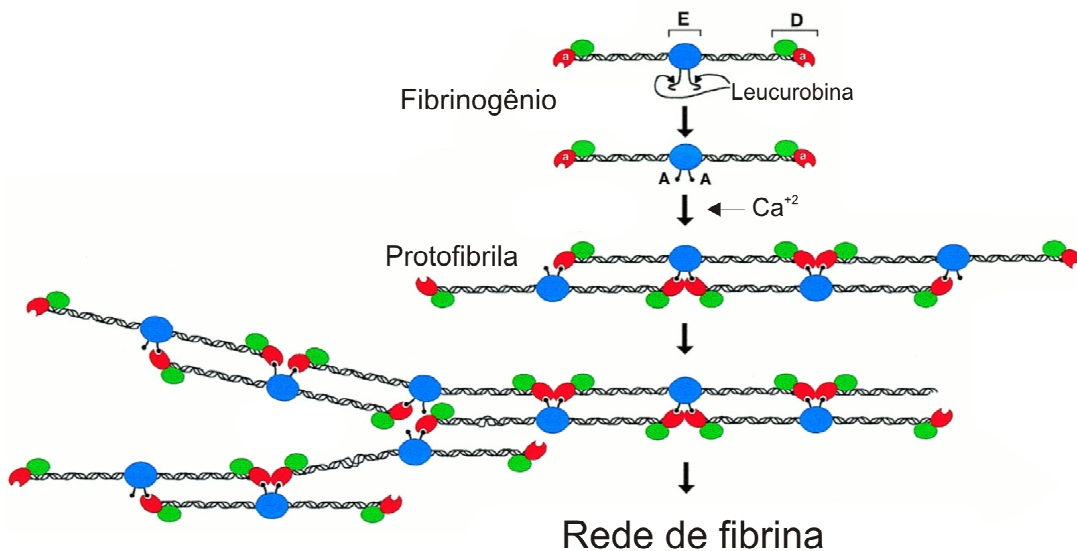


Figura 30 – Etapas da formação do coágulo de fibrina, mostrando a formação de monômeros de fibrina, a polimerização em protofibrilas e a formação da rede de fibrina. A estabilização da rede de fibrina promovida pelo fator XIII_a não foi mostrada. (Figura adaptada de artigo de Côté et al., 1998)

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

De posse destas observações a seguinte hipótese se torna plausível para explicar o comportamento verificado para a leucurobina perante o cálcio e magnésio:

- o cálcio inibe a atividade de proteólise do fibrinogênio pela leucurobina, por seu efeito de inibidor competitivo, devido à sua interação com o resíduo de Asp no centro ativo, da mesma forma que os íons sódio e potássio, mas pelo seu efeito acelerador sobre a polimerização dos monômeros de fibrina os tempos de coagulação são semelhantes àqueles obtidos na ausência de cálcio.
- o magnésio apresentou o mesmo efeito e provavelmente isto é devido ao fato de apresentar uma carga dupla assim como o cálcio. Porém, o efeito do magnésio sobre a polimerização foi descrito na literatura mas seus resultados são controvertidos, alguns trabalhos relatando que o magnésio reduz o

tempo de coagulação enquanto outros relatam que este não interfere na polimerização.

O acompanhamento da formação do coágulo através de um nefelômetro poderia fornecer um entendimento melhor do processo pois registra a diminuição de passagem da luz enquanto o coágulo é formado, o que dá uma idéia mais aproximada da dinâmica da formação da rede de fibrina. Já a medida do tempo de coagulação por um coagulômetro como o utilizado neste trabalho é feita de modo mecânico, pela detecção da paralisação do movimento de uma pequena barra metálica no tubo de reação causada pela formação do coágulo de fibrina, o que permite apenas a visualização do término do processo de coagulação.

5.11 CONSIDERAÇÕES FINAIS ACERCA DO CENTRO ATIVO DA LEUCUROBINA

As informações coletadas neste trabalho juntamente com dados da literatura permitem que façamos algumas considerações sobre as características química e topográficas do centro ativo da leucurobina.

5.11.1 Considerações gerais acerca da posição do centro ativo

Os testes com a leucurobina deglicosilada mostraram que a fração glicídica da enzima nativa não participa da interação com seus substratos, tanto fibrinogênio quanto com D-Phe-L-Pro-L-Arg-pNA. Estas observações nos permitem suspeitar que o centro ativo da leucurobina está localizado em uma região topográfica distante, ou não tão próxima, da região onde a fração glicídica está ligada à enzima nativa.

5.11.2 Natureza topográfica do centro ativo da leucurobina

De posse das diversas informações obtidas neste trabalho e na literatura podem-se tecer algumas considerações sobre a topografia e a natureza química dos subsítios S1, S2, S3 e S4 da leucurobina.

Com relação aos subsítios S1, S2, S3 e S4 ficam as seguintes observações:

- A leucurobina mostrou boa aceitação de resíduo de Arg em P1, de tal forma que podemos afirmar que o subsítio S1 da leucurobina além de poder conter um aminoácido com o porte da Arg, conta com um resíduo de Asp, que interage com Arg em P1. Tal afirmação já foi considerada no trabalho de Magalhães et al. (2006).
- O subsítio S2 mostrou aceitar bem resíduos apolares em P2, desde que não sejam muito grandes. Os menores valores de K_M foram obtidos para substratos que contêm resíduos apolares e pequenos ou médios em P2, sendo que aqueles que continham Phe em P2 tinham K_M maiores. Isto nos leva a pensar que o subsítio S2 é de natureza hidrofóbica e não muito profundo.
- O subsítio S3 mostrou aceitar bem aminoácidos apolares e grandes em P3, levando-nos a pensar que este subsítio também tem natureza hidrofóbica, como S2, mas é mais profundo que este, pois aceita bem Phe em P3, o que não acontece com S2.
- Quanto ao subsítio S4, não se pode descrever um modelo por enquanto devido à carência de informações. Pode-se apenas afirmar que este subsítio preferiu um grupo acetil em detrimento de um grupo benzoil.

Como já discutido anteriormente, ficou demonstrado que a leucurobina tem como seu melhor substrato o D-Phe-L-Pro-L-Arg-pNA, cuja seqüência primária é bastante adequada para se ligar ao centro ativo da leucurobina (menor K_M), pois contém L-Arg em P1, L-Pro em P2 e D-Phe em P3, o que preenche as exigências desta enzima no que se refere à topografia e a natureza química de seus subsítios de posicionamento S1, S2 e S3.

Como já foi discutido anteriormente, é bastante provável que estes subsítios da leucurobina sejam bastante semelhantes aos da trombina e da batroxobina (*B. atrox*).

A semelhança com a trombina, como já tratado, é reforçada por duas observações:

- os valores de K_M para D-Phe-L-Pro-L-Arg-pNA de trombina e leucurobina são da mesma ordem de grandeza (41,2 μM e 15,2 μM respectivamente) e;
- um inibidor irreversível de trombina (D-Phe-L-Pro-L-Arg-CH₂Cl) tem a mesma seqüência primária que o melhor substrato de leucurobina, o que mostra que esta seqüência se encaixa muito bem nos centros ativos de ambas as enzimas.

A semelhança com a batroxobina encontra respaldo também em duas observações:

- Este mesmo inibidor de trombina também inibe irreversivelmente a batroxobina como descrito por Stürzebecher (1986) e;
- A seqüência primária da leucurobina guarda quase 100% de homologia com a batroxobina (Magalhães et al., 2006).

A batroxobina é uma enzima já bastante descrita e suas características servirão de base para orientar novos estudos que visem uma melhor caracterização bioquímica da leucurobina.

6 CONCLUSÕES

A análise dos resultados encontrados no presente trabalho nos permitiu chegar às seguintes conclusões acerca da leucurobina:

6.1 Quanto à interação S2 - P2:

6.1.1 A interação S2 – P2 é predominantemente do tipo hidrofóbica

6.1.2 O subsítio de posicionamento S2 da leucurobina tem natureza predominantemente apolar e não é muito profundo

6.1.3 A leucurobina prefere aminoácidos apolares e de tamanho pequeno ou médio em P2

6.2 Quanto à interação S3 – P3:

6.2.1 A interação S3-P3 é predominantemente do tipo hidrofóbica

6.2.2 O subsítio de posicionamento S3 da leucurobina tem natureza predominantemente apolar e é profundo

6.2.3 A leucurobina prefere aminoácidos apolares e de maior tamanho em P3

6.3 Quanto à atividade da leucurobina sobre substratos cromogênicos do tipo peptidil-pNA:

6.3.1 O substrato de maior constante de especificidade dentre os testados para a leucurobina é D-Phe-L-Pro-L-Arg-pNA

6.3.2 O substrato com a segunda maior constante de especificidade dentre os testados é D-Phe-L-Leu-L-Arg-pNA

6.3.3 A atividade amidásica da leucurobina sobre sbstratos cromogênicos do tipo peptidil-pNA é inibida pelos íons sódio, potássio, cálcio e magnésio

6.3.4 O efeito inibitório destes íons cresce com o aumento de suas concentrações no meio

6.3.5 Os cátions divalentes tem maior poder inibitório que os cátions monovalentes em concentrações equimolares

6.3.6 A fração glicídica da leucurobina não interfere na sua atividade amidásica sobre o substrato D-Phe-L-Pro-L-Arg-pNA

6.4 Quanto à atividade coagulante *in vitro* da leucurobina sobre plasma humano citratado:

6.4.1 A leucurobina tem forte atividade coagulante *in vitro* sobre plasma humano citratado

6.4.2 A fração glicídica da leucurobina não interfere na sua atividade coagulante sobre plasma humano citratado

6.4.3 O cálcio não é essencial para a atividade coagulante da leucurobina sobre plasma humano citratado

6.4.4 A leucurobina não sofre inibição *in vitro* pela α_2 -macroglobulina e α_1 -antitripsina nas concentrações encontradas no plasma

6.5 Quanto à atividade coagulante *in vitro* da leucurobina sobre fibrinogênio bovino purificado:

6.5.1 A leucurobina tem forte atividade coagulante *in vitro* sobre fibrinogênio bovino purificado

6.5.2 A fração glicídica da leucurobina nativa não interfere na sua atividade coagulante sobre fibrinogênio bovino purificado

6.5.3 Os íons cálcio, magnésio e potássio não são essenciais para a atividade coagulante *in vitro* da leucurobina sobre fibrinogênio bovino purificado

6.5.4 Os íons sódio e potássio inibem a atividade coagulante *in vitro* da leucurobina sobre fibrinogênio bovino purificado nas concentrações testadas

6.5.5 A inibição da atividade coagulante *in vitro* da leucurobina sobre fibrinogênio bovino purificado cresce com o aumento das concentrações destes íons

6.5.6 Os íons cálcio e magnésio não inibem a atividade coagulante *in vitro* da leucurobina sobre fibrinogênio bovino purificado nas concentrações testadas

6.6 Quanto à semelhança da leucurobina com a trombina:

6.6.1 A leucurobina é uma enzima cujo centro ativo guarda grande semelhança com o centro ativo de trombina

6.6.2 A leucurobina cliva a cadeia alfa do fibrinogênio bovino da mesma forma que a trombina, liberando fibrinopeptídeo A (FPA)

6.6.3 A atividade coagulante *in vitro* da leucurobina tanto sobre plasma humano citratado quanto sobre fibrinogênio bovino purificado é independente de cálcio, da mesma forma que a trombina

6.7 Quanto à semelhança da leucurobina com a batroxobina:

6.7.1 A leucurobina é uma enzima cujo centro ativo guarda grande semelhança com o centro ativo da batroxobina, enzima semelhante à trombina proveniente de *Bothrops atrox*

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMICONI, G., AMORESANO, A., BOUMIS, G., BRANCACCIO, A., DE CRISTOFARO, R., DE PASCALIS, A. et al. A novel venombin B from *Agkistrodon contortrix contortrix*: evidence for recognition properties in the surface around the primary specificity pocket different from thrombin. *Biochemistry*, v.39, p.10294-10308, 2000.
- ANDREWS, R.K., BERNDT, M.C. Snake venoms modulators of platelet adhesion receptors and their ligands. *Toxicon*, v.38, p.775-791, 2000.
- BACHMANN, F., DUCKERT, F., KOLLER, F. The Stuart-Prower assay and its clinical significance. *Thromb Diath Haemorrh*, v.2, p.24-38, 1958.
- BODE, W., TURK, D., KARSHIKOV, A. The refined X-Ray crystal structure of D-Phe-Pro-Arg chloromethylketone-inhibited human α -thrombin: Structure analysis, overall structure, electrostatic properties, detailed active-site geometry and structure-function relationships. *Protein Science*, v.1, p.426-471, 1992.
- BRASS, E.P., FORMAN, W.B., EDWARDS, R.V., LINDAN, O. Fibrin formation: effect of calcium ions. *Blood*, v.52(4), p.654-658. 1978.
- BRAUD, S., BON, C., WISNER, A. Snake venom proteins acting on hemostasis. *Bioquimie*, v.82, p.851- 859, 2000.
- BRINKHOUS, K.M., SMITH, S.V., READ, M.S. Botrocetin and von Willebrand factor. In: Pirkle, H., Markland, F.S. (Eds), *Hemostasis and Animal Venoms*. Marcel Dekker, New York, p.377-398, 1988.
- CALVETE, J. J., MARCINKIEWICZ, C., MONLEÓN, D., ESTEVE, V., CELDA, B., JUAREZ, P., SANZ, L. Snake venoms disintegrins: evolution of structure and function. *Toxicon*, v.45, p.1063-1074, 2005.
- CAMPBELL, J.A., LAMAR, W.W. *The venomous reptiles of Latin America*. Comstock Publishing Associates/Cornell University Press. Ithaca. 425p. 1989.
- CASTRO, H.C., SILVA, D.M., CRAIK, C., ZINGALI, R.B. Structural features of a snake venom thrombin-like enzyme: thrombin and trypsin on a single catalytic platform? *Biochim Biophys Acta*, v.1547, p.183-195, 2001.
- CASTRO, H.C., ZINGALI, R.B., ALBUQUERQUE, M.G., PUJOL-LUZ, M., RODRIGUES, C.R. Snake venom thrombin-like enzymes: from reptilase to now. *Cellular and Molecular Life Sciences*, p.843-856, 2004.
- CHIPPAUX, J.P. Snake bites: appraisal of the global situation. *Bull. World Health. Organ*, v.76, p.515-524, 1998.
- CÔTÉ, H. C.F., LORD, S.T., PRATT, K.P. γ -Chain Dysfibrinogenemias: Molecular Structure-Function Relationships of Naturally Occurring Mutations in the γ Chain of Human Fibrinogen. *Blood*, v.92(7), p.2195-2212. 1998.

- DA SILVA, N. J., AIRD, S. D., SEEBERT, C., KAISER L. L. A gyroxin analog from the venom of the bushmaster (*Lachesis muta muta*). *Toxicon*, v.27: p.763–771, 1989.
- DANG, Q.D., VINDIGNI, A., DI CERA, E. An allosteric switch controls the procoagulant and anticoagulant activities of thrombin. *Proc Natl Acad Sci USA*, v.92, p.5977-5981, 1995.
- DE FILIPIS, V., DE DEA, E., LUCATELLO, F., FRASSON, R. Effect of Na⁺ binding on the conformation, stability and molecular recognition properties of thrombin. *Biochemical Journal*, v.252, p.1-23, 2005.
- DI CERA, E., GUINTO, E.R., VINDIGNI, A., DANG, Q.D., AYALA, Y.M., WUYI, M., TULINSKY, A. The Na⁺ binding site of thrombin. *J Biol Chem*, v.270, p.22089-22092, 1995.
- FRIBERGER, P. & GALLIMORE, M. J. Chromogenic peptide substrate assays and their clinical applications. *Blood Reviews*, v.5, p.117-127, 1991.
- FUNK, C., GMUR, J., HEROLD, R., STRAUB, P.W. Reptilase-R, a new reagent in blood coagulation. *Br J Haematol* 21, 1971.
- GEMPELER-MESSINA, P.M., VOLZ, K., BUHLER, B., MULLER, C. Protein C activators from snake venoms and their diagnostic use. *Haemostasis*, v.31, p.266-272, 2001.
- GUINTO, E.R., CACCIA, S., ROSE, T., FUTTERER, K., WAKSMAN, G., DI CERA, E. Unexpected crucial role of residue 225 in serine proteases. *Proc Natl Acad Sci USA*, v.96, p.1852-1857, 1999.
- GUYTON, A.C. et al. *Tratado de Fisiologia Médica*. 9.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997.
- HOLZER, M., MACKESSY, S.P. An aqueous endpoint assay of snake venom phospholipase A2. *Toxicon*, v.43, p.1149–1155, 1996.
- HUTTON, R.A., WARRELL, D.A. Action of snake venom components on the haemostatic system. *Blood Reviews*, v.7, p.176-189, 1993.
- ITOH, N., TANAKA, N., FUNAKOSHI, I., KAWASAKI, T., MIHASHI, S., YAMASHIMA, I. Organization of the gene for batroxobin, a thrombin-like snake venom enzyme: homology with the trypsin/kallikrein gene family. *J Biol Chem*, v.263, p.7628-7631, 1988.
- JUNQUEIRA, R. G., MARES-GUIA, M. A statistical treatment for solution of a family of simultaneous equations derived from enzyme inhibition studies. *Braz. J. Med. Biol. Res.* v.23, p.773-784, 1990.
- KAMIGUTI, A.S., HAY, C.R.M., THEAKSTON, R.D.G., ZUZEL, M. Insights into mechanism of haemorrhage caused by snake venom metalloproteinases. *Toxicon*, v.34, p.627-642, 1996.

- KANAIDE, H., URANISHI, T., NAKAMURA, M. Effect of divalent cations on the conversion of fibrinogen to fibrin and fibrin polymerization. *American Journal of Haematology*, v.13, p.229-237, 1982.
- KOMORI, Y. AND NIKAI, T. Chemistry and biochemistry of kallikrein-like enzyme from snake venoms. *J Toxicol Toxin Rev*, v.17, p.261-277, 1998.
- KORNALIK, F. Toxins affect blood coagulation and fibrinolysis. In: *Handbook of toxicology*. Shier, W.T. and Mebs, D. (eds), Marcel Dekker, New York, v.18, p. 697-709, 1990.
- KREM, M.M., ROSE, T., DI CERA, E. Sequence determinants of function and evolution in serine proteases. *Trends Cardiovasc Med*, v.10, p.171-176, 2000.
- KREM, M.M., DI CERA, E. Molecular markers of serine protease evolution. *EMBO J*, v.20, p.3036-3045, 2001.
- KUNITZ, M. Crystalline soybean trypsin inhibitor. II. General properties. *J. Gen. Physiol.* v.32, p.291-310, 1947.
- LAING, G.D., LEE, L., SMITH, D.C., LANDON, J., THEAKSTON, R.D.G. Experimental assessment of a new, low cost antivenom for treatment of carpet viper (*Echis ocellatus*) envenoming. *Toxicon*, v.33, p.307-313, 1995.
- LALOO, D., TREVETT, A.J., SAWERI, A., NARAQUI, S., THEAKSTON, R.D.G., WARREL, D.A. The epidemiology of snake bite in Central Province and National Capitol District, Papua New Guinea. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, v.89, p.178-182, 1995.
- LANGE, U.E.W., BAUCKE, D., HORNBERGER, W., MACK, H., SEITZ, W., HOFFKEN, H.W. D-Phe-Pro-Arg type thrombin inhibitors: unexpected selectivity by modification of the P1 moiety. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, v.13, p.2029-2033, 2003.
- LIRA-DA-SILVA, R.M., NUNES, T.B. Ophidic accidents by *Bothrops leucurus* Wagler, 1824 in Bahia, Brazil. *Tox Oxford*, v.31, n.2, p.143-144, 1993.
- LIRA-DA-SILVA, R.M., LIMA, R.A., NUNES, T.B. Envenomations caused by *Bothrops leucurus* Wagler, 1824 (Serpentes, Viperidae) in Metropolitan Region of Salvador, Bahia. *Rev Soc Bras Med Tropical* v.27, p.124.1994a.
- LIRA-DA-SILVA, R.M., CASAIS-E-SILVA, L.L., QUEIROZ, I.B., NUNES, T.B. Contribuição à Biologia de Serpentes da Bahia, Brasil. I. Vivíparas. *Revta. Brás. Zool.*, Curitiba, v.11, n.2, p.187-193, 1994b.
- LIRA-DA-SILVA, R.M., ANDRADE-LIMA, R., DIAS, E.J.R. *Bothrops leucurus* (Serpentes; Viperidae): Padrão Alimentar. In: IV CONGRESSO LATINOAMERICANO DE HERPETOLOGIA, 1996. Santiago. Resumos, Santiago: Sociedade Latinoamericana de Zoologia, p.152. 1996a.

- LIRA-DA-SILVA, R.M., ANDRADE-LIMA, R., BRAZIL, T.K. Distribuição geográfica de *Bothrops leucurus* (Serpentes; Viperidae) In: IV CONGRESSO LATINOAMERICANO DE HERPETOLOGIA, 1996. Santiago. Resumos, Santiago: Sociedade Latinoamericana de Zoologia, p.153, 1996b.
- LIRA-DA-SILVA, R.M. Estudo Clínico-Epidemiológico dos Acidentes por *Bothrops leucurus* na região metropolitana de Salvador, Bahia. Salvador, 1996. 154p. il. Mestrado em Medicina Preventiva. Área Medicina. Universidade Federal da Bahia, 1996c.
- LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L., RANDALL, R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem. v.193, p.165–175, 1951.
- LU, Q., CLEMETSON, J.M., CLEMETSON, K.J. Snake venoms and hemostasis. J Thromb Haemost, v.3, p.1791-1799, 2005.
- MAGALHÃES, A.; RICHARDSON, M.; MAGALHÃES, H.P.B.; GONTIJO, S.S.; BELO, C.A.; HERMÓGENES, A.L.; FERREIRA, R.N.; SANCHEZ, E.F. Purification and characterization of a coagulant thrombin-like enzyme from the venom of *Bothrops leucurus*. Livro de resumos do V Congresso da Sociedade Brasileira de Toxinologia – Angra dos Reis – RJ, 2004.
- MAGALHÃES, A., MAGALHÃES, H.P.B., RICHARDSON, M., GONTIJO, S.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 (em publicação), 2006.
- MANN, K.G., KALAFATIS, M. Factor V: a combination of Dr. Jekyll and Mr. Hyde. Blood, v.101, p.20-30, 2003.
- MARINKO, P., KRBAVČIČ, A., MLINŠEK, G., ŠOLMAJER, T., BAKIJA, A.T., STEGNAR, M., STOJAN, J., KIKELJ, D. Novel non-covalent thrombin inhibitors incorporating P₁ 4,5,6,7-tetrahydrobenzothiazole arginine side chain mimetics. Eur J Med Chem, v.39, p.257-265, 2004.
- MARKLAND, F.S., KETTNER, C., SCHIFFMAN, S., SHAW, E., BAJWA, S.S., REDDY, K.N. et al. Kallikrein-like activity of crotalase, a snake venom enzyme that clots fibrinogen. Proc Natl Acad Sci, USA, v.79, p.1688-1692, 1982.
- MARKLAND, F.S. Jr. Inventory of α - and β -fibrinogenases from snake venoms. For the Subcommittee on Nomenclature of Exogenous Hemostatic Factors of the Scientific and Standardization Committee of the international Society on Thrombosis and Haemostasis. Thromb Haemost, v.65, p.438-443, 1991.
- MARKLAND, F.S. Jr. Snake venoms. Drugs, v.54, p.1-10, 1997
- MARKLAND, F.S. Snake venoms and the hemostatic system. Toxicon, v.36, p.1749-1800, 1998.

- MARRAKCHI, N., ZINGALI, R.B., KAROUI, H., BOM, C., EL AYEB, M. Cerastocytin, a new thrombin-like platelet activator from the venom of the Tunisian viper *Cerastes cerastes*. *Biochim Biophys Acta*, v.1244, p.147-156, 1995.
- MARSH, N., WILLIAMS, V. Practical applications of snake venom toxins in haemostasis. *Toxicon*, v.45, p.1171-1181, 2005.
- MARSH, N.A., FYFFE, T.L., BENNETT, E.A. Isolation and characterization of two haemorrhagic proteins (HTa and HTb) from the venom of *Bitis gabonica* venom. *Toxicon*, v.33, p.883-899, 1995.
- MARX, G. Zinc binding to fibrinogen and fibrin. *Arch of Biochem and Bioph*, v.266-1, p.285-288, 1988.
- MASAHISA, O., BLOMBACK, B. Calcium and fibrin gel structure. *Thrombosis Research*, v.29(3), p.269-280. 1983.
- MATSUI, T., FUJIMARA, Y., TITANI, K. Snake venom proteases affecting hemostasis and thrombosis. *Bioquim Biophys acta*, v.1477, p.146-156, 2000.
- MELGAREJO, A.R., AGUIAR, A.S. Poisonous snakes, ecological disturbs and public health. 1st International Congress on Envenomations and Their Treatments. Paris, 1995.
- MISE, Y.F., CASAIS-E-SILVA, L.L. BARBOSA, A., LIRA-DA-SILVA, R.M. Skeletal muscle damage caused by *Bothrops leucurus* (Serpentes; Viperidae) venom. Poster. In: *J Venom Anim Toxins incl. Trop Dis*, v.9, n.2, p.448, 2003.
- MONTEIRO, R. Q., BOCK, P. E., BIANCONI, N. L., ZINGALI, R. B., Characterization of bothrojaracin interaction with human prothrombin. *Protein Science*, v.10, p.1897-1904, 2001.
- MORITA, T. Use of snake venom inhibitors in studies of the function and tertiary structure of coagulation factors. *Int J Hematol*, v.79, p.123-129, 2004.
- NIKAI, T., OHARA, A., KOMORI, Y., FOX, J.W., SUGIHARA, H. Primary structure of a coagulant enzyme, bilineobin, from *Agkistrodon bilineatus* venom. *Arch Biochem Biophys*, v.318, p.89-96, 1995.
- NIEWIAROWSKI, S., KIRBY, E.P., BRUDZYNSKI, T.M., STOCKER, K. Thrombocytin, a serine protease from *Bothrops atrox* venom. 2. Interaction with platelets and plasma-clotting factors. *Biochemistry*, v.18, p.3570-3577, 1979.
- NISHIDA, S., FUJIMURA, Y., MIURA, S., OZAKI, Y., SUZUKI, M., TITANI, K. et al. Purification and characterization of bothrombin, a fibrinogen-clotting serine protease from the venom of *Bothrops jararaca*. *Biochemistry*, v.33, p.1843-1849, 1994.

- OUYANG, C., TENG, C.M., HUANG, T.F. Characterization of snake venom components acting on blood coagulation and platelet function. *Toxicon*, v.30, p.945-966, 1992.
- PAGE, M., J., MACGILLIVRAY, R.T.A., DI CERA, E. Determinants of specificity in coagulation proteases. *J Thromb Haemost*, v.3, p.1-8, 2005.
- PARK, D., KIM, H., CHUNG, K., KIM, D.S., YUN, Y. Expression and characterization of a novel plasminogen activator from *Agkistrodon halys* venom. *Toxicon*, v.36, p.1807-1819.
- PARRY, M.A., JACOB, U., HUBER, R., WISNER, A., BON, C., BODE, W. The crystal structure of the novel snake venom plasminogen activator TSV-PA: a prototype structure for snake venom serine proteinases. *Structure*, v.6, p.1195-1206, 1998.
- PERALES, J., NEVES – FERREIRA, A.G.C., VALENTE, R.H., DOMONT, G.B. Natural inhibitors of snake venom hemorrhagic metalloproteinases. *Toxicon*, v.45, p.1013-1020, 2005.
- PERONA, J.J., HEDSTROM, L., RUTTER, W.J., FLETTERICK, R.J. Structural origins of substrate discrimination in trypsin and chymotrypsin. *Biochemistry*, v.34, p.1489-1499, 1995.
- PERONA, J.J., CRAIK, C.S. Evolutionary divergence of substrate specificity within the chymotrypsin-like serine protease fold. *J Biol Chem*, v.272, p.29987-29990, 1997.
- PIRKLE, H. Thrombin-like enzymes from snake venoms: an updated inventory. *Thromb Haemost*, v.79, p.675 – 683, 1998.
- PORTO, M., TEIXEIRA, D.M. *Bothrops leucurus* (White-tailed lancehead). *Herpetological Review*, v.26, p.156, 1995.
- PRIANTI-JR, A.C.G., RIBEIRO, W., LOPES-MARTINS, R.A.B., LIRA-DA-SILVA, R.M., PRADO-FRANCESCHI, J., RODRIGUES-SIMIONI, L., CRUZ-HÖFLING, M.A., LEITE, G.B., HYSLOP, S., COGO, J.C. Effect of *Bothrops leucurus* venom in chick biventer cervicis preparations. *Toxicon*, v.41, p.595-603, 2003.
- PRIANTI-JR, A.C.G., BARBOSA, A.M., LABAT, M.R., LOPES-MARTINS, R.A.B., RIBEIRO, W., COGO, J.C., HYSLOP, S. Pharmacological characterization of the mouse paw edema induced by *Bothrops leucurus* (white-tailed jararaca) venom. Poster 109. In: VIII CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE TOXINOLOGIA, VIII SYMPOSIUM OF THE PAN AMERICAN SECTION OF THE INTERNATIONAL SOCIETY ON TOXINOLOGY, 2004. Angra do Reis, Brasil. Abstracts... *J Venom Anim Toxins incl. Trop Dis*, 10, 3, p.468, 2004.
- QUICK, A.J. Thromboplastin generation: effect of the Bell-Alton reagent and Russel's viper venom on prothrombin consumption. *Am J Clin Pathol*, v.55, p.555-560, 1971.

- READ, M.S., POTTER, J.Y., BRINKHOUS, K.M. Venom coagglutinin for detection on von Willebrand factor activity in animal plasmas. *J Lab Clin Med*, v.101, p.74-82, 1983.
- REVAULT, P. Ecology of *Echis ocellatus* and peri-urban bites in Ouagadougou (Burkina Faso). 1st International Congress on Envenomations and Their Treatments. Paris, 1995.
- ROSING, J., TANS, G. Structural and functional properties of snake venom prothrombin activators. *Toxicon*, v.30, p.1515-1527, 1992.
- ROSING, J., GOVERS-RIEMSLAG, J.W., YUKELSON, L., TANS, G. Factor V activation and inactivation by venom proteases. *Haemostasis*, v.31, p.241-246, 2001.
- SANCHEZ, E.F., FREITAS, T.V., FERREIRA-ALVES, D.L., VELARDE, D.T., DINIZ, M.R., CORDEIRO, M.N., AGOSTINI-COTTA, G., DINIZ, C.R. Biological activities of venoms from South American snakes. *Toxicon*, v.30, p.95-103, 1992.
- SANCHEZ, E.F., SANTOS, C.I., MAGALHÃES, A., DINIZ, C.R., FIGUEIREDO, S., GILROY, J., RICHARDSON, M. Isolation of a proteinase with plasminogen-activating activity from *Lachesis muta muta* (bushmaster) snake venom. *Arch Biochem Biophys*, v.378, p.131-141, 2000.
- SCHECHTER, I., BERGER, A. On the size of the active site in proteases. I. Papain. *Biochem Biophys Res Commun*, v.27, p.157-162, 1967.
- SILVEIRA, A.M.V., MAGALHÃES, A., DINIZ, C.R., OLIVEIRA, E.B. Purification and properties of the thrombin-like enzyme from the venom of *Lachesis muta muta*. *Int. J. Biochem.*, v.21, p.863-872, 1989.
- SHERMAN, D.G. Ancrod. *Curr Med Res Opin*, v.18, p.48-52, 2002.
- STRYER, L. *Bioquímica*. 4.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996.
- STÜRZEBECKER, J., STÜRZEBECKER, U., MARKWARDT, F. Inhibition of batroxobin, a serine proteinase from *Bothrops* snake venom, by derivatives of benzamidine. *Toxicon*, v.24-6, p. 585-595, 1986.
- TAKEYA, H., MIYATA, T., NISHINO, N., OMORI-SATOH, T. IWANAGA, S. Snake venom hemorrhagic and nonhemorrhagic metalloendopeptidases. *Methods in Enzimology*, v.223, p. 365-378, 1993.
- TATEMATSU, R., KOMORI, Y., NIKAI, T. A new thrombin-like enzyme, flavoviridiobin from the venom of *Trimeresurus flavoviridis* (habu) venom. *J Nat Toxins*, v.9, p.327-339, 2000.
- THIAGARAJAN, P., PENGGO, V., SHAPIRO, S.S. The use of dilute Russel's viper venom time for the diagnosis of lupus anticoagulants. *Blood*, v.68, p.869-874, 1986.

- WANG, Y.M., WANG, S.R., TSAI, I.H. Serine protease isoforms of *Deinagkistrodon acutus* venom: cloning, sequencing and phylogenetic analysis. *Biochem J*, v.354, p.161-168, 2001.
- WARREL, D.A., BHETWAL, B.B., CHUGH, K.S., LALOO, D.G., LOOAREESUWAN, S., WIN, M.M., SJOSTROM, L., THEAKSTON, R.D.G., WATT, G., WHITE, J. Asian snakes and snakebite. *Shouteast Asian J Trop Med Public Health*, v.30 (suppl. 1), p.1-85, 1999.
- WARREL, D.A., DAVIDSON, N.M., GREENWOOD, B.M., ORMEROD, L.D., POPE, H., WATKINS, B.J., PRENTICE, C.R.M. Poisoning by bites of the saw scaled or carpet viper (*Echis carinatus*) in Nigeria. *Q J Med*, v.46, p.33-62, 1977.
- WHITE, J. Overview of venomous snakes of the world. In: Dart, R. (Ed.), *Medical Toxicology*. Lippincott, Williams and Wilkins, p.1543-1559, 2004a .
- WHITE, J. Snake venoms and coagulopathy. *Toxicon*, v.45, p.951-967, 2005.
- WISNER, A., LEDUC, M., BON, C. C-Type lectins from snake venoms: new tools for research in thrombosis and haemostasis. In: Menez, A. (Ed.), *Perspectives in Molecular Toxinology*. Wiley, Chichester, p.357-375, 2002.
- WU, W., GUAN, X., KUANG, P., JIANG, S., YANG, J., SUI, N., et al. Effect of batroxobin on expression of neural cell adhesion molecule in temporal infarction rats and spatial learning and memory disorder. *J. Tradit. Chin. Med.*, v.21, p.294-298, 2001.
- WU, W., GUAN, X., KUANG, P., JIANG, S., ZHANG, X., YANG, J., SUI, N., et al. Effects of batroxobin on spatial learning and memory disorder of rats with temporal ischaemia and the expression of HSP32 and HSP70. *J. Tradit. Chin. Med.*, v.20, p.297-301, 2000a.
- WU, W., GUAN, X., KUANG, P., JIANG, S., YANG, J., SUI, N., CHEN, A. et al. Effects of batroxobin on expression of c-Jun in left temporal ischaemic rats with spatial learning and memory disorder. *J. Tradit. Chin. Med.*, v.20, p.147-151, 2000b.
- YAMAMOTO, C., TSURU, D., ODA-UEDA, N., OHNO, M., HATTORI, S., KIM, S.T. Flavoxobin, a serine protease from *Trimeresurus flavoviridis* (habu snake) venom, independently cleaves Arg726-Ser727 of human C3 and acts as a novel, heterologous C3 convertase. *Immunology*, v.107, p.111-117, 2002.
- YANG, R., TANG, C., CHUANG, W., HUANG, T., PENG, H., HUANG, T., FU, W. Inhibition of tumor formation by snake venom disintegrin. *Toxicon*, v.45, p.661-669, 2005.
- YANG, Q., XU, J., LI, M., LEI, X., AN, L. High-level expression of a soluble snake venom enzyme, gloshebin, in *E.coli* in the presence of metal ions. *Biotechnol. Lett.*, v.25, p.607-610, 2003.

YANG, Q., HU, X. J., XU, X. M., AN, L. J., YUAN, X. D., SU, Z. G. Cloning, expression and purification of gussurobin, a thrombin-like enzyme from the snake venom of *Gloydius ussuriensis*. Acta Biochim. Biophys. Sin., v.34, p. 6–10, 2002.

ZHANG, Y., WISNER, A., XIONG, Y., BON, C. A novel plasminogen activator from snake venom: purification, characterization and molecular cloning. J Biol Chem, v.270, p.10246-10255, 1995.