

UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS – UEA  
PRÓ – REITORIA DE PÓS – GRADUAÇÃO E PESQUISA – PROPESP  
ESCOLA SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE-ESA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA E RECURSOS  
NATURAIS – MBT

Proteômica e Potencial da Atividade Trombolítica da Propriedade Desfibrinogenante,  
*in vivo*, do Veneno da Serpente Amazônica *Crotalus durissus ruruima* (Houge 1965).

THIAGO FERREIRA DE ARAÚJO

2008

UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS – UEA  
PRÓ – REITORIA DE PÓS – GRADUAÇÃO E PESQUISA – PROPESP  
ESCOLA SUPERIOR DE CIÊNCIA DA SAÚDE-ESA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA E RECURSOS  
NATURAIS – MBT

Proteômica e Potencial da Atividade Trombolítica da Propriedade Desfibrinogenante,  
*in vivo*, do Veneno da Serpente Amazônica *Crotalus durissus ruruima* (Houge 1965).

THIAGO FERREIRA DE ARAÚJO

Dissertação apresentada ao curso de Mestrado em Biotecnologia e Recurso Naturais da Universidade do Estado do Amazonas como parte do requisito para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia e Recursos Naturais.

ORIENTADOR: PROF DR. JORGE LUIS LÓPEZ-LOZANO

Araújo, Thiago Ferreira de

Proteômica e Potencial da Atividade Trombolítica, da Propriedade Desfibrinogenante, *in vivo*, do Veneno da Serpente Amazônica *Crotalus durissus ruruima* (Houge 1965). Manaus – Am. Manaus, 2007.

78p.;ll.

Dissertação de Mestrado apresentada à Universidade do Estado do Amazonas – UEA.

Orientador: Prof Dr. Jorge Luis López-Lozano

## DEDICATÓRIA

À minha Família, especialmente a minha mãe, meu pai, meus avôs e minhas avós  
(*in memoriam*), pelo amor e apoio incondicional, dedico-lhes com muito carinho essa  
inesquecível conquista!!!!

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus por toda a força em todos os momentos de minha vida.

Ao meu orientador Prof Dr. Jorge Luis López – Lozano, pela ajuda orientação, paciência dispensados a mim durante esses dois anos e acima de tudo pela amizade.

Aos amigos do curso de Mestrado: Rachel Geber, Thana Esachica, Lina Araújo, Ana Paula Barbosa, Manuel Bentes, Giselle Starck, Danny Carvalho e especialmente a Karol de Souza Barbosa, pela ajuda, compreensão e paciência nas horas difíceis.

Aos amigos do Laboratório de Toxinologia Molecular do Centro de Ofidismo Prof Paulo Friederich Bürhein: Andre Higa, Fabiana Oliveira, Marcelo Neves, Teddi, Maria das Dores Nogueira Noronha, Emiro Muniz, aos Auxiliares de Laboratório Benedito Santos, Josué Noronha, Itamar Marques, e a dona Marilene pelo carinho, ajuda e acima de tudo a amizade. Muito obrigado!!!

À Universidade do Estado do Amazonas – UEA pela oportunidade de realização do mestrado.

A CAPES pela bolsa de estudos concedida.

## SUMÁRIO

ABREVIATURAS.....	i
Lista de tabelas.....	ii
Lista de figuras.....	iii
Resumo.....	vi
Abstract.....	vii
1.INTRODUÇÃO.....	1
1.1 EPIDEMIOLOGIA E SOROTERAPIA.....	1
1.2 COMPOSIÇÃO E PROPRIEDADES DOS VENENOS DE SERPENTES.....	2
1.2.1 VENENOS CROTÁLICOS.....	4
1.3. HEMOSTASIA E VENENOS DE SERPENTES.....	7
1.4 SERINOPROTEASES.....	13
1.4.1. BIOLOGIA MOLECULAR E ATIVIDADE BIOLÓGICA DAS SERINOPROTEASES.....	14
1.5 TROMBINA – SIMILE DOS VENENOS DE SERPENTES.....	18
1.5.1 BIOLOGIA MOLECULAR E ATIVIDADES BIOLÓGICAS DAS ENZIMAS TROMBINA-SÍMILES.....	20
1.5.2. USO TERAPÊUTICO.....	25
2 OBJETIVOS.....	29
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	30
3.1 VENENOS DE SERPENTES.....	30
3.2 ANIMAIS DE LABORATÓRIO.....	31
3.3 CARACTERIZAÇÃO DAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS DO VENENO DE <i>Crotalus durissus ruruima</i> .....	31
3.3.1. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE FOSFOLIPÁSICA A <sub>2</sub> (PLA <sub>2</sub> ).....	31
3.3.2. DETERMINAÇÃO DA DOSE MÍNIMA COAGULANTE (DMC).....	31
3.3.3. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE TROMBINA SIMILE.....	32
3.3.4. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DESFIBRINOGENANTE.....	32
3.3.5. NEUTRALIZAÇÃO DA ATIVIDADE DESFIBRINOGENANTE.....	33
3.4 ANÁLISE DO PERFIL MOLECULAR.....	33
3.4.1 CARACTERIZAÇÃO DOS VENENOS E / OU FRAÇÕES POR ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA SDS – PAGE.....	33

3.4.2. CARACTERIZAÇÃO DO VENENO DE <i>C.d. ruruima</i> POR ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA SDS – PAGE TRIS – TRICINA.....	34
3.4.3 ZIMOGRAMA PARA DETECÇÃO DE ATIVIDADE PROTÉOLÍTICAS. ....	34
3.4.4 CARACTERIZAÇÃO DO VENENO POR ELETROFORESE BIDIMENSIONAL.....	35
3.4.5 ANÁLISE CROMATOGRÁFICOS.....	35
3.4.5.1 CROMATOGRAFIA POR FILTRAÇÃO MOLECULAR.....	35
3.4.5.2 CROMATOGRAFIA POR FASE REVERSA.....	36
3.6 DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNA TOTAL.....	36
3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	37
4. RESULTADOS.....	39
4.1 CARACTERIZAÇÃO DAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS DO VENENO DE <i>Crotalus durissius ruruima</i> .....	39
4.1.1. DETERMINAÇÃO DA DOSE MÍNIMA COAGULANTE (DMC).....	39
4.2. ANÁLISE DO PERFIL MOLECULAR DO VENENO DE <i>Crotalus durissius ruruima</i> .....	40
4.2.1. CARACTERIZAÇÃO DOS VENENOS POR ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA SDS – PAGE.....	40
4.2.2. ZIMOGRAMA PARA DETECÇÃO DE ATIVIDADE PROTÉOLÍTICAS.....	41
4.3. PERFIL MOLECULAR DO VENENO AMARELO DE <i>Crotalus durissius ruruima</i> POR ELETROFORESE BIDIMENSIONAL.....	43
4.3.1 GEL DE POLIACRILAMIDA DE 12% 24 cm pH 3 – 11.....	43
4.4 PERFIL MOLECULAR DO VENENO AMARELO DE <i>Crotalus durissius ruruima</i> . POR ELETROFORESE SDS – PAGE TRIS – TRICINA.....	44
4.5 CARACTERIZAÇÕES POR CROMATOGRAFIA.....	45
4.5.1. CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA POR FILTAÇÃO MOLECULAR.....	45
4.5.2 CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA EM FASE REVERSA..	45
4.5.1 CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA AFINIDADE POR FILTAÇÃO MOLECULAR.....	45
4.5.2 CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA EM FASE REVERSA..	45
4.6 DETECÇÃO DO PERFIL MOLECULAR DAS FRAÇÕES OBTIDAS DO VENENO DE <i>Crotalus durissius ruruima</i> .....	46
4.6.1 ELETROFOSESE SDS – PAGE.....	46

4.7 CARACTERIZAÇÃO DAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS DO VENENO AMARELO DE <i>Crotalus durissius ruruima</i> .....	48
4.7.1 DETECÇÃO DA ATIVIDADE FOSFOLIPÁSICA A <sub>2</sub> .....	48
4.7.2 ZIMOGRAMA DA ATIVIDADE PROTEOLÍTICA DAS FRAÇÕES SOB FIBRINOGENIO BOVINO E GELATINA.....	49
4.7.3 DETERMINAÇÃO DA DOSE MÍNIMA COAGULANTE EM PLASMA HUMANO E INIBIÇÃO DA ATIVIDADE COAGULANTE DAS FRAÇÕES OBTIDAS POR FILTRAÇÃO MOLECULAR.....	51
4.7.4 ATIVIDADE BIOLÓGICA DAS FRAÇÕES OBTIDAS POR CROMATOGRÁFIA FASE REVERSA.....	51
4.7.4.1 ATIVIDADE COAGULANTE SOB FIBRINOGENIO BOVINO.....	52
5 DISCUSSÃO.....	54
6 CONCLUSÕES.....	61
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	62

## ABREVIATURAS

BSA	albumina bovina
°C	graus Celsius
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CLAE – FR	cromatografia líquida de alta eficiência fase reversa
Da	Dalton
DTT	Ditiotreitol
EDTA	ácido etileno diamino tetracético
h	hora
kDA	kilodalton
min	minuto
ml	mililitro
µL	microlitro
µg	micrograma
pI	ponto isoelétrico
PBS	solução tampão fosfato
PMSF	fluoreto de fenil-sulfonila
PAGE	polyacrilamide gel electrophoresis
PLA <sub>2</sub>	fosfolipase A <sub>2</sub>
SDS	dodecil sulfato de sódio
TFA	ácido tricloroacético
TRIS	tris – hidroximetil – aminometano

## LISTA DE TABELAS

Tabela 01. Proteínas do plasma que participam do sistema hemostático e fibrinolítico.....	08
Tabela 02. SPVSs com caracterização biológica e bioquímica.....	15
Tabela 03. Similaridade entre 30 SVTLEs (quimiotripsina, $\alpha$ -trombina, calicreína e $\beta$ -tripsina), ativador de plasmogênio da serpente <i>Trimeresurus stejnegeri</i> (TSV-PA) e entre as subfamílias de SVTLE.....	21
Tabela 04. Atividade fosfolipásica A <sub>2</sub> das frações 01 e 02 obtidos por filtração molecular.....	48
Tabela 05. Dose mínima coagulante sob plasma humanos das frações do veneno amarelo de <i>C.d.ruruima</i> obtidas por filtração molecular.....	51
Tabela 06. Inibição da atividade coagulante das frações do veneno amarelo de <i>C.d.ruruima</i> obtidos por filtração molecular.....	51
Tabela 07. Atividade das frações obtidas por cromatografia fase reversa sob fibrinogênio bovino.....	52
Tabela 08. Atividade coagulante sob fibrinogênio das frações obtidas por cromatografia fase reversa, das frações 07, 08 e 09 do veneno amarelo de <i>C.d.ruruima</i> obtidas por cromatografia fase reversa.....	52
Tabela 09. Atividade desfibrinogenante, <i>in vivo</i> , em camundongos, das frações 07, 08 e 09 do veneno amarelo <i>C. d .ruruima</i> obtidas por cromatografia fase reversa.....	53
Tabela 10. Atividade do soro humano sob atividade desfibrinogenante da fração 09 do veneno amarelo de <i>C. d. ruruima</i> obtidas por cromatografia fase reversa.....	53

## LISTA DE FIGURAS

Figura. 01. Efeitos biológicos por alguns venenos de serpentes durante o processo de envenenamento.....	03
Figura 2. Representação esquemática do sistema de coagulação sanguínea.....	11
Figura 03. Esquema da Interação dos Venenos de Serpentes e as vias de Coagulação Sanguínea .....	12
Figura. 04. Comparação entre o padrão catalítico entre a Trombina e TSVSs. $\alpha$ $\beta$ $\gamma$ correspondem às cadeias dos fibrinogênios e as letras A e B correspondem à liberação de fibrinopeptídeos por ação hidrolítica.....	19
Figura 05. A–C. Alinhamento múltiplo de seqüências de 30 SVTLEs de diferentes venenos de serpentes Característica estrutural de TSVSs representado pelo modelo LM-TL, enzima trombina – símile do veneno <i>Lachesis muta</i> .....	22
Figura 06. Característica estrutural de TSVSs representado pelo modelo LM-TL, enzima trombina – símile do veneno <i>Lachesis muta</i> .....	25
Figura. 07. <i>Crotalus durissus ruruima</i> .....	30
Figura 08. Atividades coagulante dos venenos individuais de filhotes de <i>C. d. ruruima</i> sobre fibrinogênio e plasma humano, V – venenos testados.....	39
Figura 09. Perfil SDS – PAGE dos venenos individuais de 01 a 08 e de 09 a 16 em condições não redutoras, marcador molecular <i>B. atrox</i> e crotamina purificada.....	40
Figura 10. Perfil SDS – PAGE dos venenos individuais (filhotes) de 01 a 08 e de 09 a 16 em condições redutoras, marcador molecular <i>B. atrox</i> .....	40
Figura. 11. Zimograma dos venenos individuais de 01 a 08 em fibrinogênio marcador molecular <i>B. atrox</i> .....	40
Figura. 12. Zimograma dos venenos individuais (filhotes) de 09 a 16 em fibrinogênio marcador molecular <i>B. atrox</i> e <i>Crotalus durissius ruruima</i> .....	41
Figura. 13. Gel de eletroforese bidimensional de pH 3 – 11 de poliacrilamida de 12,5% aplicados 500 $\mu$ g de veneno.....	43
Figura 14. Perfil SDS – PAGE TRIS – TRICINA do veneno amarelo de <i>C.d.ruruima</i> . O veneno <i>B. atrox</i> foi utilizado como marcador molecular (M.M).....	44
Figura 15. Perfil cromatográfico HPLC filtração molecular, coluna Superdex™ 10/300 GL Columns (Tricorn) (13 $\mu$ m) tampão acetato de amônia 10 mM, obtido utilizando 5mg	

veneno amarelo de <i>C.d.r.</i> , _____ corresponde ao comprimento de onda UV a 280nm.....	45
Figura 16. Perfil cromatográfico HPLC – FR – C18, coluna C18 ODS Shimatzu, obtido utilizando 4mg do veneno amarelo e a _____ corresponde ao comprimento de ondas e 216nm.....	45
Figura 17. Perfil SDS – PAGE dos plcos 01 e 02 nas condições não reduzidas e reduzidas obtidos por CLAE em filtração molecular e <i>B. atrox</i> como marcador molecular.....	46
Figura 18. Perfil SDS – PAGE dos plcos 05 e 11 nas condições não reduzidas obtidos por CLAE em fase reversa e <i>B. atrox</i> como marcador molecular.....	47
Figura 19 Perfil SDS – PAGE dos plcos 05 e 11 nas condições reduzidas obtidos por CLAE em fase reversa e <i>B. atrox</i> como marcador molecular.....	47
Figura 20 Atividade fosfolipásica dos plcos 01 e 02 obtidos por CLAE em filtração molecular e <i>C. d. ruruima</i> como controle.....	48
Figura. 21. Zimograma dos plcos 01 e 02 sobre fibrinogênio obtido por CLAE em filtração molecular e <i>C. d. ruruima</i> como marcador molecular.....	49

Figura 22. Zimograma dos plcos 01 e 02 sobre gelatina obtido por CLAE em filtração molecular e <i>C. d. ruruima</i> como marcador molecular.....	49
Figura. 23. Zimograma dos plcos, 07, 08, 09 sobre fibrinogênio, obtido por CLAE em fase reversa e <i>B.atrox</i> como marcador molecular.....	50
Figura. 24. Zimograma dos plcos, 07, 08, 09 sobre gelatina, obtido por CLAE em fase reversa e <i>B.atrox</i> como marcador molecular.....	50

## RESUMO

Através de análises por técnicas de eletroforese, uni e bidimensional, foram detectadas no veneno de *Crotalus durissus ruruima* proteínas com massas moleculares de ~ 14, 32 e 50 kDA. Por eletroforese SDS – PAGE TRIS – TRICINA foi detectada uma banda protéica de massa molecular de ~ 5 kDA que sugere compreender à crotamina. As atividades fosfolipase A<sub>2</sub> e atividade coagulante também foram detectadas no veneno de *Crotalus durissus ruruima*. Frações do veneno de *Crotalus durissus ruruima* com atividade coagulante, *in vitro*, sob fibrinogênio e plasma humano foram obtidas por técnicas cromatográficas de filtração molecular e fase reversa. A atividade coagulante obtida pelas frações foi inibida só por PMSF, sugerindo que a toxina responsável pela atividade coagulante seja uma serinoprotease. A atividade proteolítica obtida por zimograma, utilizando como substrato fibrinogênio bovino, sugere a presença de enzimas trombina – símile com massas moleculares de ~ 25 a 40 kDA. Das frações coagulantes obtidas por cromatografia fase reversas somente uma fração (fração 09) apresentou atividade desfibrinogenante, *in vivo*, avaliada em camundongo. Essa atividade não foi inibida, *in vivo*, quando essa fração foi previamente incubada com soro humano. Os resultados sugerem que a atividade proteolítica do veneno de *Crotalus durissus ruruima* seja uma serinoprotease com potencial biotecnológico, como um possível antitrombolítico.

Palavras Chaves: *Crotalus durissus ruruima*, trombina – símile, atividade desfibrinogenante, atividade coagulante, serinoprotease

## ABSTRACT

An electrophoretic analysis, 1 – DE and 2 – DE, were detected of the venom of *Crotalus durissus ruruima* proteins with molecular masses of ~ 14, 32 and 50 kDA. By electrophoresis, SDS-PAGE tricine was detected a protein band of molecular mass of ~ 5 kDA that it suggests to understand to the crotamine. The activities phospholipase A<sub>2</sub> and coagulant activity had been also detected in the venom of *Crotalus durissus ruruima*. Fractions of the venom of *Crotalus durissus ruruima* with coagulant activity, *in vitro*, under human fibrinogen and human plasma had been gotten by chromatography molecular exclusion and reverse phase. The coagulant activity gotten by the fractions was inhibited alone by PMSF, suggesting that the responsible toxin for the coagulant activity is one serinoproteinase. The proteolytic activity gotten by zimogram, using as bovine fibrinogen substratum, suggests the presence enzyme thrombin – like with molecular masses of the ~ 25 – 40 kDA. Of the coagulants, fractions gotten by chromatography reverse phase fraction (fraction 09) only presented defibrinating activity, *in vivo*, evaluated in mouse. This activity was not inhibited, *in vivo*, when this fraction previously was mix with human serum.

Key words: *Crotalus durissus ruruima*, thrombin – like, defibrinating activity, coagulant activity, serinoproteinase

## 1. INTRODUÇÃO

A convivência do homem com as serpentes remonta o próprio processo evolucionário, desde a época em que o fogo não era dominado por nossos ancestrais. Ainda no século XXI nos preocupamos com as serpentes, e por certo estas continuam a povoar o nosso imaginário e causar acidentes em humanos, como em eras passadas. Com o desbravamento das últimas reservas naturais, os acidentes ofídicos têm marcado sua presença de maneira constante, e certamente nos acompanharão por muitos séculos (CASTRO 2006).

Os venenos de serpentes são conhecidos pelo homem desde os tempos mais antigos. Existem em papiros de origem egípcia (1600AC) descrições do uso de medicamentos e procedimentos utilizados para o tratamento de acidentes ofídicos (BOLAÑOS, 1984).

### 1.1. EPIDEMIOLOGIA E SOROTERAPIA

O Brasil apresenta uma diversificada fauna de serpentes, com aproximadamente 265 espécies, classificadas dentro de 73 gêneros e reunidas em 9 famílias. A fauna de interesse médico no Brasil está dividida em duas famílias de serpentes, a família Elapidae, composta por serpentes encontradas principalmente na Ásia, África e Austrália; nas Américas, a família está representada pelas chamadas cobras corais, pertencentes ao gênero *Micrurus*, *Leptomicrurus* e *Micruroides*; e a família Viperidae, dividida em 5 gêneros: *Bothrops*, *Crotalus*, *Lachesis*, *Bothriopsis* e *Porthium* e contendo, aproximadamente, 30 espécies (MELGAREJO, 2003).

*Crotalus durissus* é a espécie de cascavel com maior distribuição geográfica, abrangendo desde o México até a Argentina e possuindo várias subespécies. No Brasil apresenta ampla distribuição, habitando, preferencialmente, regiões secas e áridas.

HOGUE (1965) considerou sete subespécies distribuídas pelo território brasileiro: *C. d. cascavela*, *C. d. collilineatus*, *C. d. dryinas*, *C. d. marajoensis*, *C. d. ruuima*, *C. d. terrificus*, *C. d. trigonicus*.

Segundo o Ministério da Saúde, as serpentes do gênero *Crotalus* são responsáveis por, aproximadamente, 1.300 casos de acidentes ofídicos por ano, representando 7,7% do total dos acidentes ofídicos no Brasil, possuindo o maior coeficiente de letalidade (BRASIL 1999). No estado de Roraima, durante o período de 1992 a 1998, estudos epidemiológicos relatam que 13,4% dos acidentes ofídicos foram causados por serpente do gênero *Crotalus* (NASCIMENTO 2000).

O envenenamento causado pela cascavel sul-americana *C. d. terrificus* apresenta a nível local edema discreto, parestesia e, em alguns casos, dor de pequena intensidade; a nível sistêmico pode-se observar efeitos neurotóxicos caracterizado pela fácies miastênicas, ptose palpebral, flacidez da musculatura da face, oftalmoplegia, diplopia, efeito miotóxicos como mialgias e rabdomiólise, mioglobínúria, efeitos coagulantes e também foram verificados efeitos imunossupressores (AMARAL *et al.* 1991; CARDOSO & MOTA, 1997).

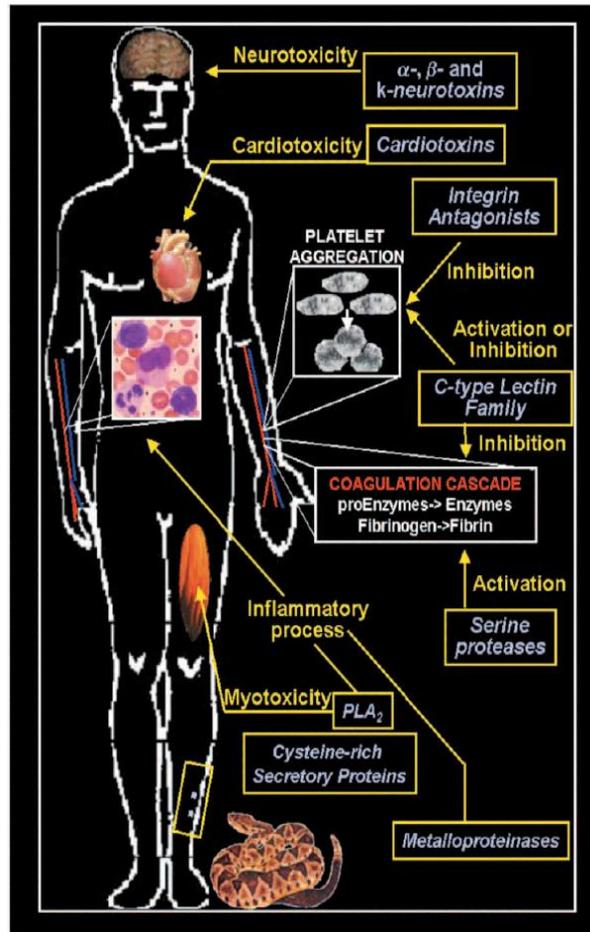
A soroterapia realizada no tratamento de acidentes ofídicos vem sendo utilizada durante séculos. O soro antiofídico é o melhor tratamento nos acidentes provocados por serpentes. Os acidentes ofídicos são classificados em leves, moderados e graves. Em todos os casos é necessária a utilização do soro antiofídico. O soro é produzido pela imunização de animais, particularmente cavalos, devido ao seu porte e o maior volume de soro obtido (MUNIZ 2002).

## 1.2 COMPOSIÇÃO E PROPRIEDADES DOS VENENOS DE SERPENTES

Existem aproximadamente 2000 espécies de serpentes, sendo que somente 300, aproximadamente, são venenosas. Serpentes venenosas são encontradas nas famílias: Colubridae, Elapidae, Hydrophoridae, Viperidae e Crotalidae (KARALLIDDE, I. 1995). Venenos de Serpentes apresentam um grande número de proteínas e peptídeos biologicamente ativos, cerca de 90-95%, e também incluem aminoácidos, nucleotídeos, carboidratos, íons metálicos etc. (KOCHVA, E. 1987, KARALLIDDE, I. 1995; HEISE, P.J. *et al.*, 1995, LIMA. *et al.* 2005.).

As proteínas presentes nos venenos de serpentes possuem uma grande variedade de atividades biológicas, podendo afetar sistema nervoso central e periférico e a hemostasia (Figura. 01) (LIMA. *et al.* 2005). Esses venenos podem atuar em mais de um sistema fisiológico ao mesmo tempo. Toxinas proteicas dos venenos da família Viperidae, é um bom exemplo de como elas atuam na hemostasia, podendo

atuar sob os fatores pro e anticoagulante e também na indução ou inibição de agregação plaquetária (BRAUD *et al.* 2000, GORNITSKAIA, *et al.* 2003).



**Figura. 01.** Efeitos biológicos das toxinas dos venenos de serpentes durante o processo de envenenamento (LIMA. *et al.* 2005).

A composição dos venenos de serpentes pode variar em função da idade, sexo, distribuição geográfica e hábitos alimentares (FRANÇA & MÁLAQUE, 2003).

Venenos de serpentes apresentam uma grande variedade de enzimas proteolíticas, que podem ser divididas em dois grupos principais: serinoproteases e metaloproteases, enzimas estas que afetam o sistema de coagulação sanguínea por uma variedade de mecanismos (YONG-HONG *et al.*, 2003; LIMA. *et al.* 2005).

### 1.2.1 VENENOS CROTÁLICOS.

O veneno amarelo de *C. d. ruruima*, como observado por Muniz (2002), apresenta várias atividades biológicas, *in vitro* e *in vivo*, como atividade

desfibrinogenante, atividade hemorrágica, atividade miotóxica, atividade proteolítica, entre outras.

As enzimas L – amino oxidase (LAO) promovem a desaminação oxidativa esteroespecífica em  $\alpha$  – ceto ácido junto com a produção de amônia e peróxido de hidrogênio via o intermédio de um amino ácido (PAWELEK *et al.* 2000). Takatsuka *et al* (2001) verificaram que as ORF da LAO do veneno de *Agkistrodon halys blomhoffii* traduzem um polipeptídeo de 504 resíduos de aminoácidos, sendo 18 deles referentes ao peptídeo sinal, e 486 resíduos formam a subunidade madura. A proteína madura apresenta prováveis dois pontos de glicosilações com sequência consenso Arg – X – Thr (Ser) nos resíduos de aminoácidos 172 e 361, respectivamente. A LAO de *Agkistrodon halys blomhoffii* apresenta uma similaridade de 87,3% com a LAO de *Crotalus adamanteus*. A LAO da cascavel sul-americana *Crotalus durissus cascavela* apresenta uma similaridade de 86% com a LAO de *Crotalus adamanteus* (TOYAMA *et al.*2006).

O papel fisiológico da L – amino oxidase em envenenamentos por serpentes ainda não é muito bem conhecido. Estudos recentes indicam que as LAO induzem morte celular programada (apoptose) em células endoteliais do sistema vascular, assim contribuindo para o prolongamento do sangramento nas paredes dos vasos sanguíneos provocado por acidentes ofídicos (TAKATSUKA *et al* 2001). Ao contrário da indução de apoptose vascular, o efeito de LAO dos venenos de serpentes nas plaquetas foi controverso. Takatsuka *et al. apud* Nathan *et al.* (2001) reporta que a LAO de *Echis colorata*, parcialmente purificada, inibia agregação plaquetária ADP – induzido. Takatsuka *et al. apud* Li *et al.* (2001) reporta que a LAO purificada de *Ophiophagus hannah* apresentava baixa atividade a agregação plaquetária. Toyama *et al.* (2006) reporta que a LAO purificada da cascavel sul-americana *Crotalus durissus cascavela* induz uma forte agregação plaquetária.

Estudos feitos com as LAO de venenos de serpentes têm mostrado atividade antimicrobiana contra bactérias gram – negativas e gram – positivas (SAMY *et al. apud* TALAN *et al.* 2006) e também anti – leishmania (PASSERO *et al.* 2007).

A Crotamina é um polipeptídeo de 42 resíduos de aminoácidos, possui uma massa molecular de 4,8 kDA e um pI de aproximadamente 10,8. O gene da crotamina apresenta 1,8 kpb sendo organizado em 03 exons separados por uma região longa de 900pb e uma região curta de 140pb de introns. O exon 01 codifica a região 5'UTR e os primeiros 19 aminoácidos do peptídeo sinal. O exon 02 codifica 42 aminoácidos, 03 aminoácidos do peptídeo sinal e 39 aminoácidos da crotamina madura. O exon 03

codifica os últimos 03 aminoácidos da toxina madura, a terminal lisina e a região 3'UTR (OGUIURA *et al.* 2005). OGUIURA *et al. apud* Smith & Schimdt (2005) descreveram as primeiras sequências do cDNA da crotamina e demonstraram que o mRNA codifica uma pré – crotamina de 65 resíduos de aminoácidos que apresenta 22 aminoácidos de sequência sinal; a crotamina madura apresenta 42 aminoácidos e um terminal – carboxil lisina sendo este removido por modificação pós-traducional da crotamina.

Crotoxina é a proteína mais abundante no veneno das cascavéis brasileiras, sendo uma potente neurotoxina que também apresenta uma potente atividade miotóxica (PONCE – SOTO *et al.* 2007), bloqueando a transmissão de sinal nas junções neuromusculares (SANTOS *et al. apud* BON *et al.* 2007). A eficácia anti – tumor *in vivo*, com administração diária de crotoxina, foi demonstrada em carcinoma de pulmão de Lewis, com taxa de inibição de crescimento de 83 % (NEWMAN *et al.*, 1993), em carcinoma de mama humano MX – 1, com inibição de crescimento de 69 %, porém uma baixa atividade em células leucêmicas HL – 60, com uma inibição de crescimento de somente 44%, sugerindo que a crotoxina tem especificidades a tumores sólidos (CURA *et al.*, 2002). Recentemente se tem descrito outras propriedades farmacológicas da crotoxina, como opiáceo, analgésico independente à acetilcolina (ZHANG *et al.*, 2006), inibição de pequenas GTPases em macrófagos de ratos (SAMPAIO *et al.*, 2006) e efeitos imunossupressivos (RANGEL-SANTOS, LIMA *et al.*, 2004).

A crotoxina é formada por duas subunidades: crotapotina e fosfolipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>). A crotapotina consiste de três cadeias polipeptídicas ligadas por pontes de dissulfeto e atua como uma subunidade inibidora de chaperonas, evitando interações da PLA<sub>2</sub> com fosfolipídios da superfície da membrana, com exceção da sua membrana-alvo. O modelo atualmente aceito sugere que quando a crotoxina atinge a sua membrana-alvo, a subunidade enzimática ativa se liga à membrana-alvo e a crotapotina é liberada em solução (BON *et al.* 1979)

Fosfolipases A<sub>2</sub> compreendem uma larga família de proteínas que apresentam alguma semelhança catalítica e grande homologia entre elas. Esta enzima foi identificada em tecidos de mamíferos, como em artrópodes, e venenos de serpentes também apresentam a enzima. Recentemente PLA<sub>2</sub> tem demonstrado papel em inúmeros processos patofisiológicos como: artrites reumatóides, asma entre outras (MORAES & GIGLIO 2003). A PLA<sub>2</sub> de cadeia simples apresenta 08 pontes de dissulfetos, catalisando por hidrólise a ligação acil – ester na posição *sn* – 2 do fosfolipídio (BAEK *et al.*, 2000) num mecanismo similar ao das PLA<sub>2</sub> de mamíferos (GELB *et al.*, 1995).

Algumas destas enzimas apresentam-se formando complexos com outras proteínas, potencializando o seu efeito farmacológico. Pode apresentar subunidade que induz neurotoxicidade (FAURE *et al.*, 2000) e miotoxicidade (RANGEL-SANTOS, DOS-SANTOS *et al.*, 2004). A fosfolipase A<sub>2</sub>, subunidade da crotoxina, atua na junção neuromuscular semelhante à crotoxina, embora necessite de concentrações maiores para produzir o mesmo efeito (VITAL BRAZIL, 1966). Observações experimentais demonstraram que a fosfolipase A<sub>2</sub>, subunidade da crotoxina, se liga a sítios de baixa afinidade quando não está formando o complexo crotoxina. Isto vem reforçar o papel da molécula carreadora da crotopotina FAURE *et al.* 1993).

Convulxina é uma lectina tipo C glicosilado, isolada do veneno de *C. d. terrificus*, que não apresenta atividade fosfolipásica, amidolítica e esterolítica e não interfere nos fatores plasmáticos, mas é um potente fator de ativador de plaquetas, causando distúrbios respiratórios e cardiovasculares. Convulxina estimula trombócitos, resultando em agregação e liberação de ADP e interage com glicoproteínas de plaquetas (MURAKAMI *et al.* 2003).

Convulxina é um heterodímero composto por duas unidades homólogas  $\alpha$  e  $\beta$ , apresentando massas moleculares de 13,9 e 12,6 respectivamente, é cálcio dependente. Pequenas doses (0.001 – 0.1  $\mu\text{g/mL}$ ) de convulxina não provocam lise na membrana das plaquetas, enquanto que em 3 $\mu\text{g/mL}$  pode-se evidenciar atividade citolítica e liberação de serotonina e aminas biogênicas (MURAKAMI *et al.* 2003).

### 1.3. HEMOSTASIA E VENENOS DE SERPENTES

A manutenção do sangue dentro do sistema vascular é um importante processo fisiológico. A hemostasia refere-se a resposta normal ante uma injúria ocasionada a um vaso, pela formação de coágulos para deter processos hemorrágicos (RASHE, H. 2001).

A hemostasia humana é baseada em uma complexa interação entre proteínas do sangue, plaquetas, células endoteliais, e estruturas subendoteliais (MARKLAND, 1998). Em condições normais, os fatores de coagulação (Tabela 01) circulam sob forma não-ativa (zimogênios) e, juntamente com as plaquetas, só exercem função hemostática ou coagulante quando essas condições se alteram (BOON, 1993).

Na tabela 01 são listados os principais fatores que participam da hemostasia do sangue.

**Tabela 01** Proteínas do plasma que participam do sistema hemostático e fibrinolítico.

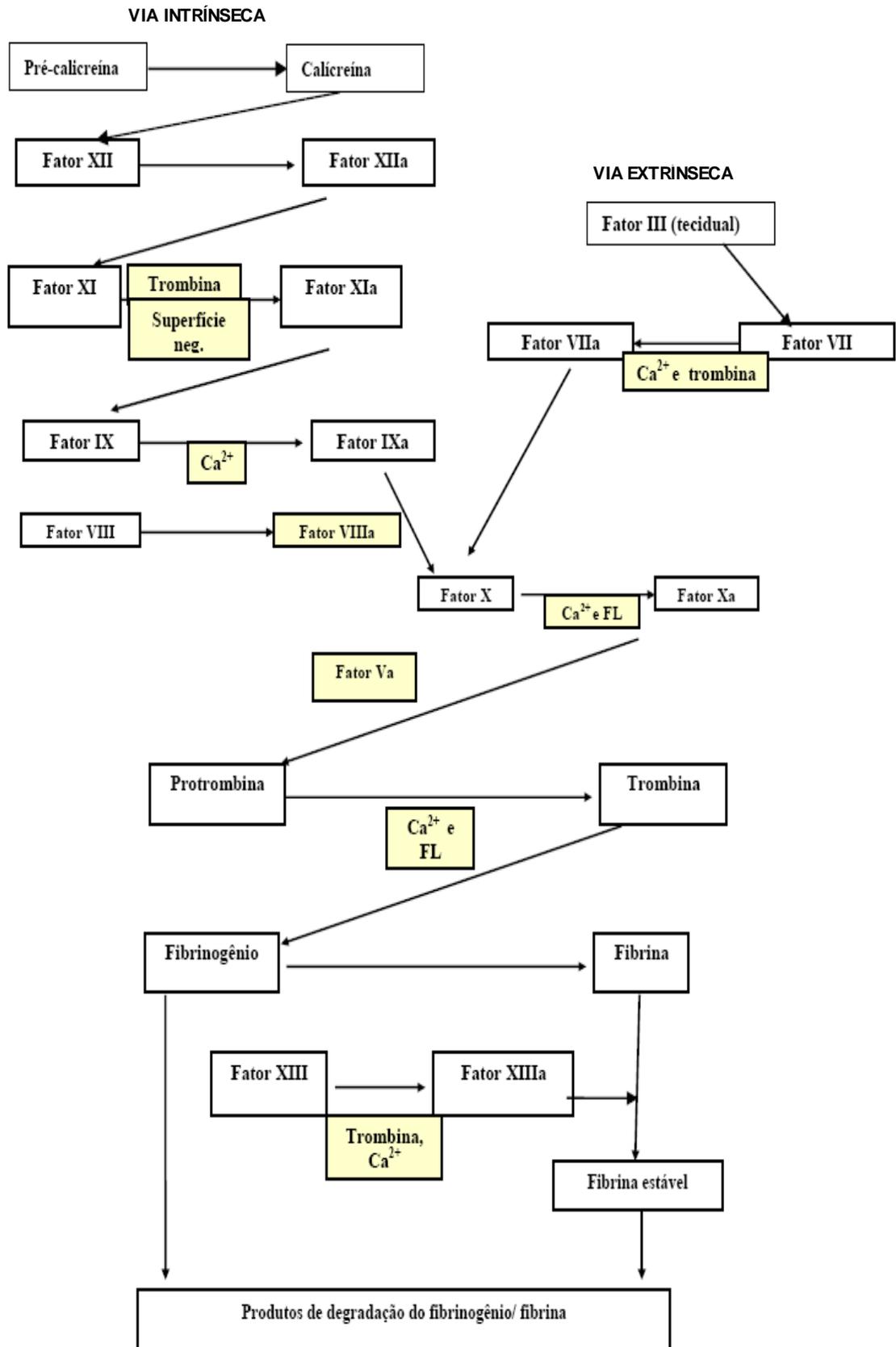
Fatores	Sinônimos	Propriedade	Massa molecular (Da)	Ação
I	Fibrinogênio	Dímero com 03 cadeias.		Formação de monômeros, liberação de fibrinopeptídeos catalisada pela trombina.
I <sub>a</sub>	Fibrin (Des –A– fibrin) Fibrin (Des –AB – fibrin)	Agregar monômeros de fibrinas.	340.000	Agregação espontânea após a liberação de fpA. Agregação após a liberação de fpB.
II	Protrombina	Dependente de vitamina K zimogênio de cadeia simples.	68.000	Ativados pelo f. X <sub>a</sub> , V <sub>a</sub> , fosfolipídios + Ca <sup>2+</sup> .
II <sub>a</sub>	Trombina	Serinoprotease de duas cadeias.	35.600	Formação de fibrinas, ativado pelos f. V, VIII, XIII, PC, plaquetas. Ativado pelo fator II.
V	Pró – acelerina	Proteína de cadeia simples.		
V <sub>a</sub>	Acelerina	Proteína de duas cadeias.	480.000	Potencializado pela presença de Ca <sup>2+</sup> f. II ativação pelo fator X <sub>a</sub> .  Ativado pelos f. II <sub>a</sub> , X <sub>a</sub> , fragmentos XII <sub>a</sub> .
VII	Pró-Convertina	Dependente de vitamina K zimogênio de cadeia simples.	59.000	Extrínseca, ativação do fator X
VII <sub>a</sub>	Convertina	Serinoprotease de duas cadeias.		
VIII: C	Fator Antihemofílico	Complexo de proteína	>1.000	VII: C, cofator intrínseca, ativação do fator X e ativado pelo fato II <sub>a</sub> .
VIII: vWF IX	Fator von Willebrand	Complexo de proteína		VII: vWF, agregação plaquetária. Ativado pelo f. XI <sub>a</sub> + Ca <sup>2+</sup> .
IX <sub>a</sub>	Fator Christmas	Dependente de vitamina K, zimogênio de cadeia simples.  Serinoprotease de duas cadeias.	55.000	Intrínseca, ativação do fator X.
X				
X <sub>a</sub>	Fator Stuart	Dependente de vitamina K, zimogênio de duas cadeias.  Serinoprotease de duas cadeias.	63.000	Ativado pelo f. VII <sub>a</sub> + tromboplastina (via extrínseca) ou f. IX <sub>a</sub> + VIII + fosfolipídios (via intrínseca).  Ativação do f. IX

## Cont Tabela 01

XI		Zimogênio dimérico		Ativado pelo fator XII <sub>a</sub> + Pré – calicreína+ contato de superfície.
XI <sub>a</sub>	PTA	Serinoprotease de duas cadeias dimérica.	160.000	Ativação do fator IX
XII	Fator Hageman	Zimogênio serinoprotease de cadeia simples	82.000	Ativado pela Pré – calicreína+ contato de superfície kininogênio.
XII <sub>a</sub>		Fragmento ativo de duas cadeias.		Ativação de contato com a via intrínseca.
Pré – calicreína	Fator Fletcher	Zimogênio de cadeia simples.	80.000	Ativado pelo fator XII <sub>a</sub> .
Calicreína	Fator Fletcher ativado	Serinoprotease de duas cadeias.		Ativação de contato com a via intrínseca.
HMW Kininogenio XIII	Fator Fitzgerald	Molécula simples.	110.000	Converte bradicinina em calicreína, Ativação de contato com a via intrínseca.
XIII <sub>a</sub>	Fator estabilizador de fibrina	Zimogênio de cadeia duas cadeia.	350.000	Ativado por trombina + Ca <sup>2+</sup> .
		Transaminase de duas cadeias.		Promove ligações covalentes entres os monômeros de fibrinas.
XIV	Proteína C	Dependente de vitamina K, zimogênio de duas cadeias.	55.000	Ativado por trombina + trombomodulina + Ca <sup>2+</sup> .
XVI <sub>a</sub>	Proteína C ativada.	Serinoprotease de duas cadeias.		Inativação do f V <sub>a</sub> , VIII <sub>a</sub> , e PAI – I.
—	Proteína S	Dependente de vitamina K.	69.000	Potencializa a inativação do f. V <sub>a</sub> , VIII <sub>a</sub> , e PAI – I.
—	Plasmogênio	Zimogênio de cadeia simples.	92.000	Ativado pelo uPA e tPA.
—	Plasmina	Serinoprotease de duas cadeias.	92.000	Fibrinólise
Scu PA	Pro – uroquinase	Zimogênio de cadeia simples.	54.000	
—	Fibrinonectina	Proteína de alta massa molecular.	470.000	Agregação plaquetária, fagocitose.
AT-III	Antitrombina	Proteína de cadeia simples.	61.000	Inibidor dos f. II <sub>a</sub> , IX <sub>a</sub> , XII <sub>a</sub> , calicreína.
α <sub>2</sub> – M	α <sub>2</sub> – Macro globulina	Quatro unidades.	720.000	Inibição dos f. II <sub>a</sub> , calicreína e outras proteases.
α <sub>1</sub> – AT	α <sub>1</sub> – Anti tripsina	Proteína de cadeia simples.	51.000	Inibição dos f. II <sub>a</sub> , XI <sub>a</sub> , calicreína, tripsina, elastase.
C <sub>1</sub> – I	C <sub>1</sub> – Inibidor	Proteína de cadeia simples.	105.000	Inibição dos f. XI <sub>a</sub> , XII <sub>a</sub> , calicreína.
PCI	Inibidor proteína C	Proteína de cadeia simples.	57.000	Inibição da Proteína C ativada.
α <sub>2</sub> – AP	Antiplasmina	Proteína de cadeia simples.	70.000	Inibição da plasmina
PAI – I	Inibidor do ativador de Plasmogênio	Glicoproteína.	52.000	Inibição de uPA e tPA.

A coagulação ocorre em três etapas essenciais: primeiro, em resposta à ruptura do vaso ou dano ao próprio sangue, ocorre uma cascata complexa de reações químicas no sangue, envolvendo mais de uma dúzia de fatores de coagulação sanguínea. O resultado é a formação de um complexo de substâncias ativadas, chamado de ativador da protrombina. Segundo, o ativador da protrombina catalisa a conversão da protrombina em trombina. E por último, a trombina age como uma enzima que converte o fibrinogênio em fibras de fibrina, e estas envolvem as plaquetas, os glóbulos sanguíneos e o plasma para formar o coágulo (OLDRA *apud* GUYTON & HALL, 2003).

A cascata de coagulação é considerada uma ativação sequencial de zimogênios, cada fator sendo substrato de uma enzima anterior e ativador da proenzima seguinte. A grande maioria das ativações da cascata de coagulação está ligada a uma proteólise, e muitos desses fatores de coagulação são serinoproteases, com exceção os fatores VIIa e XIIIa. Esta etapa é dividida em duas vias distintas, a intrínseca e a extrínseca, que são inter-relacionadas e culminam em uma via comum (Figura. 02) (SANT'ANA, 2005).



**Figura 2.** Representação esquemática do sistema de coagulação sanguínea (SANT'ANA *apud* BOON, NARAYANAN 2005).



fatores do sistema hemostático, assim como proteínas com especificidade à apenas um fator de coagulação, têm sido descritos na literatura (STOKER 1990).

#### **1.4 SERINOPROTEASES DOS VENENOS DE SERPENTES**

Serinoproteases são hidrolases que exibem uma preferência por hidrolisar ligações peptídicas na região da carbonila contribuído pelos aminoácidos básicos lisina ou arginina e pertencem à família tripsina S1, embora apresente uma rigorosa especificidade a substratos macromoleculares (MAGALHÃES *et al.* 2006).

Serinoproteases representam uma classe de proteínas que controlam uma variedade de processos na cascata de coagulação sanguínea. A evolução de proteínas que apresentam um papel vital pode ser exemplificada pela serinoprotease trombina.

Trombina é uma serinoprotease originada da protrombina através das vias intrínseca e extrínseca, que cliva fibrinogênio para remover dois pequenos polipeptídeos (fibrinopeptídeo A e B), clivam as ligações peptídicas entre os aminoácidos R-G das cadeias  $\alpha$  e  $\beta$  do fibrinogênio, causando polimerização das moléculas de fibrinogênio em fibrina, e ativação das plaquetas, como respostas celulares em processos inflamatórios e reparação de tecidos danificados, possui massa molecular em torno de 33,7 kDa, participa da ativação dos fatores V, VII, VIII, XIII, e da Proteína C (ISETTI, G. & MAURER, M.C. 2004, O. FUSTER-LLUCH, *et al.* 2004).

Serinoproteases de veneno de serpentes (SPVSs) são as mais caracterizadas enzimas que afetam o sistema hemostático, atuando em uma ampla variedade de fatores da cascata de coagulação como os sistemas fibrinolítico e cinina-caliceína (PIRKLE 1998).

##### **1.4.1. BIOLOGIA MOLECULAR E ATIVIDADE BIOLÓGICA DAS SERINOPROTEASES**

As enzimas serinoproteases dos venenos de serpentes que afetam o sistema hemostático são divididas em 04 grupos: coagulantes (trombinas – similares), pró-coagulantes (toxinas que ativam protrombina), anticoagulantes (toxinas que ativam

proteína C), inibidores da função plaquetária (disintegrinas) e ativadores do sistema fibrinolítico e hemorrágicos (MARSH, 2005; MARKLAND, 1998; MATSUI *et al.*, 2000).

Essas enzimas são muito abundantes nos venenos de serpentes, principalmente na família Viperidae, onde constituem aproximadamente 20% do total de proteínas contidas no veneno e apresentam como propriedade estrutural a tríade catalítica altamente conservada Ser<sup>195</sup>, His<sup>57</sup> e Asp<sup>102</sup>, que as classificam como serinoproteases (SERRANO & MAROUN, 2005).

SPVSs são proteínas de cadeia simples que são visualizadas como banda em condições reduzidas por eletroforese unidimensional, com massa molecular variando de 26 a 67 kDA dependendo do oligossacarídeo ligado a proteína (SERRANO & MAROUN, 2005).

Bibliotecas de cDNA originadas de glândulas de serpentes peçonhentas vem sendo construídas e várias SPVSs têm sido isoladas e seqüenciadas. As SPVSs são proteínas de cadeia simples e os cDNAs descritos na literatura possuem, aproximadamente, ORF's (*open reading frames*) de 800 pb. Apresentam 5`UTRs geralmente curtos enquanto que 3`UTRs variam de tamanho contendo aproximadamente 1.200 nucleotídeos. SPVSs são sintetizados como zimogênios com aproximadamente 256 – 257 resíduos de aminoácidos possuindo peptídeo sinal de 18 resíduos de aminoácidos. Recente exame da expressão gênica da glândula de veneno de *Bothrops insularis* gerado pela análise de EST (*expressed sequence tags*) identificou classes muito comuns de toxinas expressadas por serpentes viperídeas. De acordo com esses estudos, SPVSs representam 9,6% das toxinas expressadas na glândula de veneno de *Bothrops insularis* (JUNQUEIRA-DE AZEVEDO & HO, 2002).

Em geral, SPVSs afetam o sistema hemostático, especificamente ativando componentes do sistema sanguíneo envolvidos na coagulação, degradando fibrinogênio ou fibrina, e agregação plaquetária ou por degradação proteolítica (PIRKLE 1998). Atualmente muitas SPVSs possuem sua seqüência de aminoácidos conhecidas sendo bioquimicamente e biologicamente caracterizadas (Tabela 02).

**Tabela 02** SPVSs com caracterização biológica e bioquímica.

Nomes	Espécies	Seqüências de aminoácidos	Atividades	Massas moleculares	pI	Carboidratos	Inibidores	Referências
ACC-C	<i>Agkistrodon contortrix contortrix</i>	P09872	Ativador de proteína C	37–40 kDa	6.3	16–20%	NPGB +; PPACK+; Benzamidina +; ATIII-heparina ±; hirudina—SBTH+	Kisiel <i>et al.</i> , 1987; Stocker <i>et al.</i> , 1987 Orthner <i>et al.</i> , 1988 McMullen <i>et al.</i> , 1989
Acutin	<i>Agkistrodon acutus</i>	Q9YGS1	Coagulante	38 kDa	~4.0	+	nr	Pan <i>et al.</i> , 1999
Acutobin	<i>Deinagkistrodon acutus</i>	Q9I8X2	Coagulante (A $\alpha$ )	40 kDa	nr	30%	nr	Wang <i>et al.</i> , 2001
Ancrod	<i>Calloselasma rhodostoma</i>	P47797	Coagulante (A $\alpha$ )	35.4 kDa	4.2–6.2	36%	NPGB+; Agmatina+ $\alpha$ 2-macroglobulina +	Nolan <i>et al.</i> , 1976 Burkhardt <i>et al.</i> , 1992 Au <i>et al.</i> , 1993
Batroxobin	<i>Bothrops atrox</i>	P04971	Coagulante (A $\alpha$ )	41.5 kDa		10.2%	Benzamidina +; $\alpha$ 2-macroglobulina +; ATIII-heparin a-; Heparina-; Hirudina-; Aprotina-; SBTI-; $\epsilon$ -ACA-;	Stocker & Barlow, 1976; Funk <i>et al.</i> , 1971
	<i>B. moojeni</i>		Coagulante (A $\alpha$ )	36 kDa		5.8%	Ácido tranexâmico -; Iodoacetamida -	Stocker <i>et al.</i> , 1982 Itoh <i>et al.</i> , 1987
Bilineobin	<i>Agkistrodon bilineatus</i>	Q9PSN3	Coagulante (A $\alpha$ e B $\beta$ )	57 kDa	nr	+	Hirudina -	Komori <i>et al.</i> , 1993
Bothrops protease A	<i>Bothrops jararaca</i>	Q9PTU8	Esterolítica amidolítica	67 kDa	3.5	~60%	nr	Nikai <i>et al.</i> , 1995 Reichl <i>et al.</i> , 1983 Murayama <i>et al.</i> , 2003
Bothrombin	<i>Bothrops jararaca</i>	P81661	Coagulante A $\alpha$ e agregação plaquetária	35 kDa	5.54	+	Atividade de agregação de plaquetas inibida por Mabs anti GP- IIb/IIIa e anti-GP.	Nishida <i>et al.</i> , 1994
Brevinase	<i>Agkistrodon blomhoffii brevicaudus</i>	Q9PT51	Cliava as cadeias A $\alpha$ e B $\beta$ do fibrinogênio	Duas cadeias: 16.5 e 17 kDa	-	+	Pefabloc +; Ditiotreitól +	Lee <i>et al.</i> , 1999 Lee & Park 2000
Calobin	<i>Agkistrodon caliginosus</i>	Q91053	Coagulante (A $\alpha$ )	34 kDa	6.2	+	Aprotinina-; Hirudina	Hahn <i>et al.</i> , 1996
Contortri-xobin	<i>Agkistrodon contortrix contortrix</i>	P82981	Libera FPB e Ativa fatores FV e FXIII Aumenta a permeabilidade dos capilares por clivagem da cadeia B $\beta$ do fibrinogênio	26 kDa	5.54	none	Benzamidina+; DAPI+ ATIII-heparina -	Amiconi <i>et al.</i> , 2000
CPI-enzyme-2	<i>Agkistrodon caliginosus</i>	O42207		44 kDa	3.5	+	nr	Shimokawa & Takahashi, 1993a,b, 1997; Hahn <i>et al.</i> , 1998

Cont. tabela 2.

Nome	Espécies	Seqüências de aminoácidos	Atividades	Massas moleculares	pl	Carboidratos	Inibidores	Referências
Crotalase	<i>Crotalus adamanteu</i>	nr	Coagulante (A $\alpha$ ) Liberação de Cí-nina	32.7	nr	8.3%	TLCK+; Pro-Phe-ArgCH <sub>2</sub> CIC+ Hirudina-	Markland, 1976; Markland <i>et al.</i> , 1982 Massova <i>et al.</i> , 1997 Henschen-Edman <i>et al.</i> , 1999 Shieh <i>et al.</i> , 1985; Shieh <i>et al.</i> , 1988 Yamamoto <i>et al.</i> , 2002
Flavoxobin	<i>Trimeresurus flavoviridis</i>	P05620	Coagulante (A $\alpha$ )	23.5 kDa	4.8	none	TLCK+	
Halystase	<i>Agkistrodon halys blomhoffii</i>	P81176	Libera Bradicini- nina Cliva cadeia B $\beta$ do fibrinogênio	38 kDa	nr	12.8%	Leupeptina+ Hirudina-	Matsui <i>et al.</i> , 1998
Haly-PA	<i>Agkistrodon halys</i>	Q9YGJ8	Ativação de Plasmogênio	32 kDa	nr	+	nr	Park <i>et al.</i> , 1998
KN-BJ	<i>Bothrops jararaca</i>	O13069	Libera Bradicini- nina Coagulante (A $\alpha$ )	KN-BJ1 38 kDa KN BJ2 39 kDa	4.5- 4.7 4.3- 4.7	+	Derivados de Benzamidina +	Serrano <i>et al.</i> , 1998
LM-TL	<i>Lachesis muta muta</i>	P33589	Coagulante (A $\alpha$ );giroxina	41-47 kDa	3.1- 5.0	+	Agmatina +; p-aminobenzami- dina+ BPTI-; Ecotina-; Hirugenio-	Silveira <i>et al.</i> , 1989 Magalhães; <i>et al.</i> , 1993 Castro <i>et al.</i> , 2001
Mucrosobin	<i>Trimeresurus mucrosquamatus</i>	U31417	Cliva a cadeia B $\beta$ do fibrinogê- nio;	28 kDa	nr	nr	nr	Guo <i>et al.</i> , 2001
PA-BJ	<i>Bothrops jararaca</i>	P81824	Agregação pla- quetária pela ati- vação de PAR1 e PAR 4	30 kDa	>9	+	Derivados de Benzamidina +; Heparina +; Mab IIaR, anti PAR1 +C;Hirudin- Thrombomodulina -	Serrano <i>et al.</i> , 1995; Santos <i>et al.</i> , 2000 Kisiel, 1979;
RVV-V	<i>Vipera russelli</i>	P18964-alfa P18965-gama	Ativação de FV	29 kDa	nr	6%	ATIII-heparina -	Tokunaga <i>et al.</i> , 1988 Zhang <i>et al.</i> , 1995; Braud <i>et al.</i> , 2000
TSV-PA	<i>Trimeresurus stejnegeri</i>	Q91516	Ativação de Plasmogênio	33 kDa	5.2	+	BPTI-Hirudina -; ATIII-heparina- SBTI-	Hung <i>et al.</i> , 1994; Hung & Chiou, 2000
TM-VIG/ Tm-5	<i>Trimeresurus mucrosquamatus</i>	Q91507	Cliva a cadeia B $\beta$ do fibrinogê- nio	28 kDa	nr	nr	Leupeptina +	Siigur <i>et al.</i> , 1998; Siigur <i>et al.</i> , 1999
VLFVA	<i>Vipera lebetina</i>	Q9PT4	Ativação de FV	28.4 kDa	nr	6%	nr	

+ inibição;-não inibição; ± conflito de resultados; (A $\alpha$ ), clivagem específica na cadeia  $\alpha$  do fibrinogênio; (B $\beta$ ), clivagem específica na cadeia  $\beta$  do fibrinogênio, traduzido de (SERRANO & MAROUN, 2005).

Muitas SPVSs apresentam atividades fibrinogenolíticas e fibrinolíticas, porém muitas possuem preferências na clivagem do fibrinogênio, liberando fibrinopeptídeos A, B ou AB. A trombina humana atua no fibrinogênio liberando fibrinopeptídeos A e B, atrás de dois sítios hidrofóbicos (STUBBS & BODE, 1993).

Algumas SPVSs apresentam uma função similar à trombina, sendo conhecidas como coagulantes trombinas – símile (cSPVSs) (MARKLAND, 1998; PIRKLE, 1998). As atividades de cSPVSs não são idênticas as enzimas  $\alpha$  – trombina humana. Algumas cSPVSs não ativam o fator estabilizador de coágulo (fator XIII), liberando somente um fibrinopeptídeo (SERRANO & MAROUN *apud* STOKER 2005).

Muitas SPVSs são classificadas como enzimas coagulantes e majoritariamente liberam somente fibrinopeptídeo A. A Batroxobina, de *Bothrops atrox*, ancrod, de *Calloselasma rhodostoma* e crotalase, de *Crotalus adamanteus* são importantes representantes de cSPVSs que liberam fibrinopeptídeo A (SERRANO & MAROUN 2005).

SPVSs que liberam preferencialmente fibrinopeptídeo B do fibrinogênio é representado pela serinoprotease do veneno de *A. c. contortrix* (AMICONI *et al* 2000). Bilineobina representado pela serinoprotease do veneno de *Agkistrodon bilineatus* e a enzima que libera ambos fibrinopeptídeos A e B por clivagem nas ligações peptídicas entre Arg14 – Gly15 (SERRANO & MAROUN 2005).

Outra atividade similar à trombina apresentada por SPVSs, é a ativação do fator V e da proteína C. A ativação do fator V é mediada pela quebra de ligação peptídica no resíduo Arg 1545 no fator V, pelos venenos de *Daboia russelli* e *Daboia lebetina*, gerando cadeias pesadas e leves no fator Va (TOKUNAGA *et al.* 1988, SEGERS *et al.* 2006). A glicoproteína C é dependente de vitamina K que circula no sangue como zimogênio de serinoproteases sendo ativada pela trombina na superfície endotelial na presença de trombomodulina (ESMON & OWEN, 1981). A proteína C ativada degrada fator Va, induzindo incoagulabilidade. A ACC – C de *A. c. contortrix* mostrou seletividade por clivar a cadeia pesada da proteína C, além de clivar cadeia A $\alpha$  do fibrinogênio (embora não coagule o fibrinogênio) (KISIEL *et al.* 1987), e induz uma prolongação do tempo de ativação parcial da tromboplastina e degradação proteolítica dos fatores Va e Xlla por ativação da proteína C (SERRANO & MAROUN 2005).

A ativação plaquetária é outra atividade das enzimas multifuncionais;  $\alpha$  – trombina que são encontradas nas SPVSs. A trombocitina de *B. atrox* foi a primeira enzima com esta atividade descrita (NIEWIAROWSKI *et al.*, 1977). A trombocitina libera serotonina e ativa o fator XIII por proteólise limitada (KIRBY *et al.*, 1979). Algumas

SPVSs que atuam em plaquetas, como a crotalocitina isolada do veneno de *Crotalus horridus horridus* induz a liberação de ATP (SCHMAIER & COLMAN, 1980). MSP1 do veneno de *Bothrops moojeni* induz agregação plaquetária e potencializa agregação ADP – induzido (SERRANO *et al.*, 1993).

SPVSs conhecidas como enzimas calicreína – símile atuam liberando o hipotensivo lys – bradicinina ou bradicinina do cininogênio (SERRANO & MAROUN 2005). Nustad e colaboradores (1978) demonstraram que as bradicininas são liberadas por ação proteolítica das enzimas dos venenos de serpentes que atuam no cininogênio no plasma, intestino, útero e músculo liso. Halystase do veneno de *A. halys blomhoffii* é uma enzima que libera bradicinina e que não apresenta atividade coagulante, porem cliva cadeias de fibrinogênio (MATSUI *et al.*, 1998).

Os venenos de serpentes apresentam SPVSs com atividades como ativadores de plasminogênios. SPVSs ativam plasminogênios, em células endoteliais, para gerar plasmina por clivagem específica da ligação peptídica entre os aminoácidos Arg561-Val562 do plasmogênio (SERRANO & MAROUN 2005). TSV-PA foi a primeira enzima ativadora de plasminogênio a ser reportada (ZHANG *et al.*, 1995) e contém 234 resíduos de aminoácidos com um sitio N – glicosilado (MARKLAND, 1998).

SPVSs, como foi explanado mostram mais de uma atividade, podem apresentar somente uma atividade como ACC-C (ativador de proteína C), TSV-PA (ativador de plasmogênio), mas podem apresentar enzimas multifuncionais como a trombina (SERRANO & MAROUN 2005).

## 1.5 TROMBINA – SIMILE DOS VENENOS DE SERPENTES

Venenos de serpentes apresentam grande variedade de enzimas proteolíticas que afetam o processo de coagulação sanguínea (BRAUD *et al.* 2000, MATSUI *et al.* 2000). Serinoproteases, como a trombina – símile, são responsáveis *in vitro* pela atividade de coagulação sanguínea, apresentando uma grande distribuição em venenos de vários gêneros de serpentes sendo denominada Trombina – Símile do Veneno de Serpentes (TSVSs) (PIRKLE 1998).

Atualmente, mais de 30 estruturas primárias de trombina – símiles são conhecidas, apresentando altamente conservados o sitio ativo com os resíduos de aminoácidos His57, Asp102, Ser195. Baseado na análise da estrutura primária dessas trombinas – símiles, essas enzimas são susceptíveis aos inibidores clássicos de serinoproteases. TSVSs têm apresentando homologia a tripsina de mamíferos, sendo

esta uma possível relação evolucionária que vem sendo claramente demonstrada (CASTRO *et al.* 2004, MARKLAND 1998, SERRANO & MAROUN 2005).

Novos estudos têm mostrado que TSVSs podem afetar várias partes do sistema hemostático desde os fatores de coagulação sanguínea até a indução de agregação plaquetária (SANTOS *et al.* 2000), assim como também têm mostrado atividade biológica no sistema nervoso (CASTRO *et al. apud* WU *et al.* 2004).

TSVSs são enzimas de cadeia simples capazes de liberar fibrinopeptídeos A e/ou B da cadeia A $\alpha$ , quebrando ligações peptídicas Arg16 – Gly17, e da cadeia B $\beta$ , clivando ligações peptídicas Arg14 – Gly15, gerando dois sítios de polimerização, respectivamente. Ambos processos de clivagem induzem coagulação do fibrinogênio. (Figura 04). A grande maioria das TSVSs apresentam uma alta termo estabilidade da sua atividade arginina esterase ou da sua atividade amidase (SILVA-JUNIOR *et al.* 2007).

Uma breve revisão bibliográfica sugere grande variabilidade bioquímica de TSVSs, em particular nas massas moleculares, obtidas por SDS – PAGE, com variação na faixa de 25 a 70 kDA, embora a massa molecular da estrutura primária de TSVSs seja inferior a 28 kDA. Isto sugere um papel importante das modificações pós – traducionais (MPTs) na diversidade molecular de TSVSs, com glicosilação (SILVA-JUNIOR *et al.* 2007).

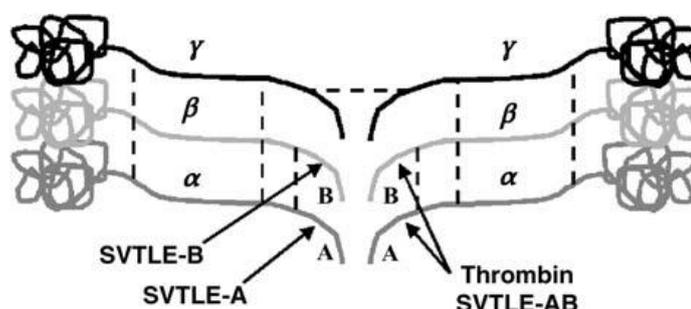


Figura 04. Comparação entre o padrão catalítico entre a Trombina e TSVSs.  $\alpha$   $\beta$   $\gamma$  correspondem às cadeias dos fibrinogênios e as letras A e B correspondem a liberação de fibrinopeptídeos por ação hidrolítica (CASTRO *et al.* 2004).

Algumas TSVSs ativam fator XIII como, a contortrixobina, de *Agkistrodon contortrix contortrix*, acuthrombina e cerastocistina de *Cerastes cerastes*, assim como serinoproteases dos gêneros *Agkistrodon*, *Bitis*, *Bothrops*, *Cerastes* e *Trimeresurus*. Contortrixobina uma serinoprotease de 25,5 kDA de *Agkistrodon contortrix contortrix*

que ativam fator V, uma glicoproteína de papel importante nas vias pro e anticoagulante (ROSING J *et al.* 2001). TSVSs com algumas exceções não ativam o fator XIII, fator estabilizador de fibrinas. (MARKLAND, 1998 CASTRO *et al* 2004).

As trombinas – símiles de venenos de serpentes são ferramentas interessantes para estudos de agregação plaquetária, algumas TSVSs induzem agregação plaquetária na presença de fibrinogênio exógeno, com uma potência menor que a trombina (PIRKLE 1998; SANTOS *et al.* 2000).

### 1.5.1 BIOLOGIA MOLECULAR E ATIVIDADES BIOLÓGICAS DAS ENZIMAS TROMBINA-SÍMILES

Os genes da TSVSs são membros da família de genes da tripsina/ calicreína constituído de 05 exons e 04 intons. A enzima madura é decodificada pelo exons 02 a 05, enquanto a tríade catalítica é decodificada em exons separados (ITOH *et al.* 1988).

TSVSs apresentam 12 resíduos de cisteínas em posições conservadas (Fig 05) com exceção da Dav-KN de *Agkistrodon acutus* deduzido por cDNA da glândula, sendo substituído a Cys201 pela Ser201 e o mRNA provavelmente represente um pseudogene (WANG *et al.* 2001). A ausência de grupos tiol livres em TSVSs leva a associação de todos os 12 resíduos de cisteínas sendo ligados em ligações dissulfetos (CASTRO *et al.* 2004). Os pares de ligações dissulfeto baseados na sua homologia com a tripsina, foram primeiramente propostos por Itoh e colaboradores (1987) e confirmado por Nikai e colaboradores (1995) no caso da bilineobina com posições das pontes de dissulfetos, Cys-22-157, Cys-42-58, Cys-91-250, Cys-136-201, Cys-168-182 e Cys-191-220 são altamente conservadas entre as TSVSs. O tratamento com agentes redutores das pontes de dissulfetos como o  $\beta$  – mercaptoetanol e o DTT comumente afetam a atividade biológica das TSVSs (PIRKLE 1998). Este dado revela o importante papel das pontes de dissulfeto na estabilização da estrutura nativa de TSVSs. Estudos da estrutura da SPVS TSV – PA mostrou que a ponte dissulfeto Cys136 – Cys201 é indicado como essencial na estabilização SPVSs confirmado nos modelos 3D de LM – TL de *Lachesis muta*, crotalase de *Crotalus adamanteus* e outras TSVSs (EARPS & SHOOLINGIN–JORDAN 1998 PARRY *et al.* 1998, HENSCHEN-EDMAN *et al.* 1999, CASTRO *et al.* 2001, MAUROUN 2001).

Comparando a sequência primária das TSVSs, elas apresentam em torno de  $233 \pm 10$  resíduos de aminoácidos. Com outras clássicas serinoproteases como a trombina, a tripsina e a calicreína, podemos notar uma baixa similaridade em relação a trombina possuindo somente 26 – 33%, como também pode-se notar a mesma similaridade em relação às serinoproteases pancreáticas, porém, apresentam uma maior similaridade em relação à calicreína (34 – 40%), e à tripsina (37 – 44%) (tabela 04), baseado não somente na sua tríade catalítica, mas também em outras características conservadas. O domínio catalítico é a principal região conservada dessas enzimas sendo diretamente responsável pela sua similaridade, apresentando algumas diferenças nas sequências laterais em comparação a outras serinoproteases (FIGURA 05) (CASTRO *et al.* 2004, PIRKLE 1998).

Tabela 03. Similaridade entre 30 SVTLEs (quimiotripsina,  $\alpha$ -trombina, calicreína e  $\beta$ -tripsina), ativador de plasmogênio da serpente *Trimeresurus stejnegeri* (TSV-PA) e entre as subfamílias de SVTLE.

Enzimas	Nº de resíduos	Similaridade (%)		Atividade biológica
		Min.	Max.	
Quimotripsina	245	24	31	Hidrólise de moléculas de proteínas que apresentam grande quantidade de resíduos aromáticos.
$\alpha$ - Trombina	259	26	33	Coagulação do fibrinogênio
Calicreína	237	34	40	Liberção de bradicinina
$\beta$ -Tripsina	224	31	44	Hidrólises de moléculas de proteínas que contem Arginina.
TSV-PA	234	53	74	Ativador de Plasminogênio
TSVSs	$233 \pm 10$	51	98	Coagulação do fibrinogênio

TSV-PA, e o grau de similaridade foi calculado usando o CLUSTAL W (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw>). <sup>a</sup> sequência primária de trinta SVTLE, mostrada na figura 04, foram alinhadas com quimiotripsina, trombina, calicreína, tripsina e TSV-PA, e o grau de similaridade foi calculado usando o CLUSTAL W (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw>).

A modelagem *in silico* da estrutura secundária de TSVSs revela grande quantidade de estruturas  $\beta$  – folhas, inferindo um hipotético  $\beta/\beta$  hidrolase, um enovelamento típico de serinoproteases da família da quimotripsina (PERONAS & CRAIK 1997) (FIGURA 06). Embora os resíduos de aminoácidos da região central da tríade catalítica sejam altamente conservados, a superfície das TSVSs tem apresentado consideráveis diferenças de conformação, devido à grande variação na sequência e comprimento dos *loops*, sugerindo que essas variações podem ter um papel importante na atividade e na especificidade das TSVSs, como foi previamente descrito para serinoproteases homólogas de mamíferos (KREM & DICERA 2001).

**A**

	16	20	30	40	50	60	70	80	90																						
LM TL	VIGGDE	ENINEHR	LVALYD	GLSGTFL	CGGTL	INQEWL	TAQHCH	-----	RSLMHTYL	GMQRK	NVVF	DDDE	QRRYP	KKKY	FR	CHKMF	---TK														
CROTALASE	VIGGDE	ENINEHR	LVALYD	VFSQLFL	CGGTL	INQEWL	TAANCH	-----	RTHIL	IYVGV	HD	SVQF	DKDE	QRRFP	KEKY	FFD	CSNMF	---TK													
BILINEOBIN	IIGGDE	ENINEHR	LVALYD	VWVSGSFL	CGGTL	INQEWL	TAANCH	-----	MSNI	YTYL	GMHQ	SVQF	DDDE	ERRYP	KEKY	FL	FRCSKMF	---TK													
ACUTOBIN	VIGGVE	CDINEHR	LVALYEL	TSMTFL	CGGTL	INQEWV	TAANCH	-----	RLQYL	YI	GMHD	KVVF	DDDE	Q	GREP	TEKY	-FYH	CNMLT-TR													
ACUTHROMBIN	VIGGVE	CDINEHR	LVALYEL	TSMTFL	CGGTL	INQEWV	TAANCH	-----	RLQL	YLYI	GMHD	KVVF	DDDE	Q	GREP	IEKY	FYH	CNMLT-TR													
ANCROD	VIGGDE	ENINEHR	LVAAYE	GTNWTF	ICGGVL	IHP	EWVIT	TAANCH	-----	RRRML	HLVF	GMHR	SKVF	DDDE	Q	RRFP	KEKY	FR	CHKMPR-TR												
SALMOBIN	VIGGDE	ENINEHR	LVALYHS	RSRRTFL	CGGTL	INQEWL	TAANCH	-----	RFLMY	IRL	GMQRK	NVVF	DDDE	Q	RRFP	KEKY	FF	C	SNMF-TR												
GUSSUROBIN	IIGGDE	CKINDHR	LVALYT	SRSRRF	YCGGTL	INQEWL	TAANCH	-----	RKNI	R	IKL	GMH	SEKVP	NEDA	Q	TRVP	KEK	-FF	-CL	SSKTYTK											
GLDUS	IIGGDE	ENINEHR	LVALYT	SRSRRF	YCGGTL	INQEWL	TAANCH	-----	RKNI	R	IKL	GMH	SEKVP	NEDA	Q	TRVP	KEK	-FF	-CL	SSKTYTK											
USSURIN	VIGGVE	ENINEHR	LVALYT	SRSRRF	YCGGTL	INQEWL	TAANCH	-----	RKNI	R	IKL	GMH	SEKVP	NEDA	Q	TRVP	KEK	-FF	-CL	SSKTYTK											
CALOBIN	VIGGDE	ENINEHR	LVALYNS	RSRRTFL	CGGTL	INQEWL	TAANCH	-----	RHNF	R	IKL	GMH	SKVP	NEDA	Q	TRVP	KEK	-FF	-CL	SSKTYTK											
HALYSTASE	IIGGDE	ENINEHR	LVALYTP	RSRRTFL	CGGTL	INQEWL	TAANCH	-----	RKNE	R	IKL	GMH	SKVP	NEDA	Q	TRVP	KEK	-FF	-CL	SSKTYTK											
FLAVOXOBIN	VIGGDE	ENINEHR	LVALYDA	WSGRFL	CGGTL	INQEWL	TAANCH	-----	SKNF	R	MKL	GAH	SKVL	NEDE	Q	TRNP	KEK	-FI	-CP	NKNDV											
MUCROSOBIN	VIGGDE	ENINEHR	LVLVY	DDYDQ	---CGGTL	INEEWL	TAANCH	-----	GKDM	E	TYL	GVH	SKVP	NKDV	Q	RRVP	KEK	-FF	-CD	SSKTYTK											
MUCOFIRASE	VIGGDE	ENINEHR	LVLVY	DDYDQ	---CGGTL	INEEWL	TAANCH	-----	GKDM	E	TYL	GVH	SKVP	NKDV	Q	RRVP	KEK	-FF	-CD	SSKTYTK											
TRIMUBIN	VIGGDE	ENINEHR	LVLVY	DDYDQ	---CGGTL	INEEWL	TAANCH	-----	GKDM	E	TYL	GVH	SKVP	NKDV	Q	RRVP	KEK	-FF	-CD	SSKTYTK											
ELEGAXOBIN	VIGGDE	ENINEHR	LVLVY	DDYDQ	---CGGTL	INEEWL	TAANCH	-----	GKNE	E	TYL	GVH	SKVP	NKDV	Q	RRVP	KEK	-FF	-CD	SSKTYTK											
MUPI5	IIGGDE	ENINEHR	LVLVY	DDYDQ	---CGGTL	INEEWL	TAANCH	-----	GENM	E	TYL	GMH	SKVP	NKDV	Q	RRVP	KEK	-FF	-CD	SSKTYTK											
TRGRM	VIGGHP	ENINEHR	LVLVY	DDYDQ	---CGGTL	INEEWL	TAANCH	-----	GKMKL	Q	F	GLH	SKVP	NKDV	Q	TRVP	KEK	-FF	-CL	SSKTYTK											
KN-BJ	IIGGRP	CDINEHR	LALV	KYGHF	Q---CSGTL	INEEWL	SAANCH	-----	GERM	K	DHL	GVH	SKVP	NKDV	Q	TRVA	KEK	-FF	-CL	SSKTYTK											
TM-VIG	VIGGDE	ENINEHR	LVLVY	DDYDQ	---CGGTL	INEEWL	TAANCH	-----	GKDM	E	TYL	GVH	SKVP	NKDV	Q	RRVP	KEK	-FF	-CD	SSKTYTK											
PALLABIN	VIGGDE	ENINEHR	LVALYT	--SRLTF	CGGTL	INQEWL	TAANCH	-----	MEDI	Q	IKL	GMH	SKVP	NEDA	Q	RRVP	KEK	-FF	-CL	SSKTYTK											
PALLASE	VIGGDE	ENINEHR	LVALYT	--SRLTF	CGGTL	INQEWL	TAANCH	-----	MEDI	Q	IKL	GMH	SKVP	NEDA	Q	RRVP	KEK	-FF	-CL	SSKTYTK											
BOTHROMBIN	VIGGDE	ENINEHR	LAFMY	--SPQYFC	GMTL	INQEWL	TAANCH	-----	KTYM	R	TYL	GIH	TR	SVAN	DE	V	TRVP	KEK	-FI	-CP	NKNDV										
BATROXOBIN	VIGGDE	CDINEHR	LAFMY	--SPRYFC	GMTL	INQEWL	TAANCH	-----	RRFM	R	IHL	GMH	AG	SVAN	DE	V	TRVP	KEK	-FI	-CP	NKNDV										
CONTORTRIXOBIN	VIGGDE	ENINEHR	LVAIFN	--SNGFC	VCSGTL	INQEWL	TAANCH	-----	STDF	Q	IKL	GAH	SKVL	NEDE	Q	TRNP	KEK	-FI	-CP	NKNDV											
ACUTIN	VIGGDE	CDINEHR	LVAIFN	--TIGFC	CGGTL	INQEWV	TAANCH	-----	STNF	Q	HL	GVH	SKVL	NEDE	Q	TRNP	KEK	-FI	-CP	NKNDV											
DAV-PA	VIGGDE	CDINEHR	LVAIFN	--TIGFC	CGGTL	INQEWV	TAANCH	-----	STNF	Q	HL	GVH	SKVL	NEDE	Q	TRNP	KEK	-FF	-CP	NKNDV											
PA-BJ	VIGGRP	CKIN	HRS	LVLVY	DN---SSSL	CSGTL	INQEWL	TAANCH	-----	SKNF	R	MKL	GVH	SKVP	NKDV	Q	TRVA	KEK	-FI	-CP	NKNDV										
CPI-ENZYME	VIGGDE	ENINEHR	LALVFN	--SSGFL	CSGTL	INQEWL	TAANCH	-----	MEMR	E	TYL	GVH	NE	SVQY	DDDE	Q	TRVP	KEK	-FF	-CL	RSNNDTK										
TSV-PA	VFGGDE	ENINEHR	LVLVFN	--SNGFL	CGGTL	INQEWV	TAANCH	-----	SHNF	Q	LLE	GVH	SKVL	NEDE	Q	TRDP	KEK	-FF	-CP	NKNDV											
TRYP SIN	IUGGXT	CGANT	VPPY	QVSLHS	---GDF	CGGSL	IRN	QWV	SAANCH	-----	KS	GI	QVRL	GED	H	NVVE	GHF	Q-F	IS	ASKS	IVHPS	YNSHT									
THROMBIN	IVEGQ	DAE	VEL	SPV	QVML	FRK	SPQEL	L	CGASL	I	SDRWL	TAANCH	-----	CL	LYP	WD	KNF	TV	DD	L	VRI	GMH	SR	TRV	ER	V	KEI	SM	DKTY	IP	RYWKE

**B**

	100	110	120	130	140	150	160	170																														
LM TL	-WDE	---	IRL	NRPVRF	SAHTIAP	SLP	SSPPS	---	EDSV	CRVM	GWG	---	QIT	SPPE	TLP	PDVPH	CAH	IN	IL	FN	YTV	CR	GAYP	---														
CROTALASE	-WDK	I	ML	IRL	NKPVS	SEHTIAP	SLP	SSPI	---	VGSV	CRVM	GWG	---	QTT	SPQE	TLP	PDVPH	CAH	IN	IL	DYEV	CR	TAWP	QF														
BILINEOBIN	-WDK	I	ML	IRL	NKPVRN	SEHTIAP	SLP	SSPI	---	VGSV	CRVM	GWG	---	TIT	SPHE	TLP	PDVPH	CAH	IN	IL	FN	YTV	CR	AWP														
ACUTOBIN	-RDK	I	ML	IRL	DRPVDN	STHTIAP	SLP	SRPPS	---	VGSV	CRVM	GWG	---	AT	SP	SRD	VLP	PDVPH	CAH	IN	IL	VNNAE	CR	RAYP														
ACUTHROMBIN	-RDK	I	ML	IRL	DRPVDN	STHTIAP	SLP	SRPPS	---	VGSV	CRVM	GWG	---	AT	SP	SRD	VLP	PDVPH	CAH	IN	IL	VNNAE	CR	RAYP														
ANCROD	-WGED	I	ML	IRL	NKPVNN	SEHTIAP	SLP	SSPPI	---	VGSV	CRVM	GWG	---	S	LNKY	-D	VL	P	D	E	P	R	CAH	IN	IL	FN	YTV	CR	GVEP									
SALMOBIN	-WDK	I	ML	IRL	NRPVNN	SEHTIAP	SLP	SNPPS	---	VGSV	CRVM	GWG	---	TIT	SPHE	TLP	PDVPH	CAH	IN	IL	HYSV	C	QAAYP	---														
GUSSUROBIN	-WDK	I	ML	IRL	KRPVNN	STHTIAP	VPLP	SNPPS	---	VGSV	CRVM	GWG	---	TIT	SPHE	TYP	PDVPH	CAH	IN	IL	DYEV	C	QAAYP	---														
GLDUS	-WDK	I	ML	IRL	KRPVNN	STHTIAP	VPLP	SNPPS	---	VGSV	CRVM	GWG	---	TIT	SPQE	TYP	PDVPH	CAH	IN	IL	DYEV	C	QAAYP	---														
USSURIN	-WDK	I	ML	IRL	KRPVNN	STHTIAP	VPLP	SNPPS	---	VGSV	CRVM	GWG	---	TIT	SSQE	THP	PDVPH	CAH	IN	IL	DYEV	C	QAAYP	---														
CALOBIN	-WDK	I	ML	IRL	DSPVNS	SEHTIAP	SLP	SSPPS	---	VGSV	CRIM	GWG	---	R	IS	P	T	K	E	T	Y	P	D	V	P	H	C	AH	IN	IL	L	EYEM	CR	PYP	EF			
HALYSTASE	-WDK	I	ML	IRL	DSPVKN	STHTIAP	SLP	SSPPS	---	VGSV	CRIM	GWG	---	R	IS	P	T	E	E	T	Y	P	D	V	P	H	C	AH	IN	IL	L	EYEM	CR	PYP	EF			
FLAVOXOBIN	-LDK	I	ML	IRL	DSPVSY	SEHTIAP	SLP	SSPPS	---	VGSV	CRIM	GWG	---	S	I	P	V	E	E	T	Y	P	D	V	P	H	C	AH	IN	IL	D	D	V	E	CKP	GYP		
MUCROSOBIN	-WTK	I	ML	IRL	DRPVRK	SAHTIAP	SLP	SSPPS	---	VGSV	CRIM	GWG	---	T	IS	P	T	Q	V	T	Y	P	D	V	P	H	C	AH	IN	IL	D	D	V	E	CR	AAYP		
MUCOFIRASE	-WTK	I	ML	IRL	DRPVRK	SAHTIAP	SLP	SSPPS	---	VGSV	CRIM	GWG	---	T	IS	P	T	Q	E	T	Y	P	D	V	P	H	C	AH	IN	IL	D	D	V	E	CR	AAYP		
TRIMUBIN	-WTK	I	ML	IRL	DRPVRK	SAHTIAP	SLP	SSPPS	---	VGSV	CRVM	GWG	---	T	IS	P	Q	V	T	Y	P	D	V	P	H	C	AH	IN	IL	D	D	V	E	CR	AAYP			
ELEGAXOBIN	-WTK	I	ML	IRL	DRPVRK	SAHTIAP	SLP	SSPPS	---	VGSV	CRVM	GWG	---	T	IS	P	Q	E	T	Y	P	D	V	P	H	C	AH	IN	IL	D	D	V	E	CR	AAYP			
MUPI5	-WTK	I	ML	IRL	NRPVRK	SAHTIAP	SLP	SSPPS	---	VGSV	CRIM	GWG	---	T	IS	P	T	K	V	T	Y	P	D	V	P	H	C	AH	IN	IL	D	D	V	E	CR	AAYP		
TRGRM	-WTK	I	ML	IRL	NR	SVNN	STHTIAP	SLP	SSPPS	---	QNTV	C	N	I	M	GWG	---	T	IS	P	T	K	E	Y	P	D	V	P	H	C	AH	IN	IL	D	H	AV	CR	AYP
KN-BJ	-WTK	I	ML	IRL	DSPVKN	SAHTIAP	SLP	SSPPI	---	VGSV	CRIM	GWG	---	T	IS	T	SKV	I	L	S	D	V	P	H	C	AH	IN	IL	N	Y	T	V	CR	AYP				
TM-VIG	-WTK	I	ML	IRL	DRPVRK	SAHTIAP	SLP	SSPPS	---	VGSV	CRVM	GWG	---	T	IS	P	Q	E	T	Y	P	D	V	P	H	C	AH	IN	IL	D	D	V	E	CR	AAYP			
PALLABIN	-WTK	I	ML	IRL	DSPVKN	SAHTIAP	SLP	SSPPS	---	VGSV	CRIM	GWG	---	R	IS	S	T	-E	T	Y	P	D	V	P	H	C	AH	IN	IL	L	EYEM	CR	PYP	EF				
PALLASE	-WTK	I	ML	IRL	DSPVKN	SAHTIAP	SLP	SSPPS	---	VGSV	CRIM	GWG	---	R	IS	S	T	K	E	T	Y	P	D	V	P	H	C	AH	IN	IL	L	EYEM	CR	PYP	EF			
BOTHROMBIN	-TDK	I	ML	IRL	NR	VPKN	STHTIAP	ISLP	SSPPS	---	VGSV	CRIM	GWG	---	A	I	T	S	E	D	T	Y	P	D	V	P	H	C	AH	IN	IL	F	N	N	V	CR	EAYN	
BATROXOBIN	-TDK	I	ML	IRL	DRPVRK	SAHTIAP	SLP	SNPPS	---	VGSV	CRIM	GWG	---	A	I	T	S	E	D	T	Y	P	D	V	P	H	C	AH	IN	IL	F	N	N	V	CR	EAYN		
CONTORTRIXOBIN	-LDK	I	ML	IKL	DSRVS	SEHTIAP	SLP	SSPPS	---	VGSV	CHIM	GWG	---	S	I	P	I	E	V	T	Y	P																



Todas as sequências de TSVSs descritas apresentam importantes posições conservadas, como a tríade catalítica, (His57, Asp102 e Ser195), os subsítios catalíticos primários (S1) e secundários (S2) com as posições conservadas (Asp189 e Gly216 respectivamente). As presenças desses subsítios garantem as interações com resíduos básicos P1 de substratos como o TAME e BAPNA (CASTRO *et al.* 2004, PIRKLE 1998). Um terceiro subsítio específico (S3) é ocupado pela Gly226 na maioria das TSVSs, podendo ser substituído pela alanina em algumas das TSVSs (ZHANG *et al.*, 1998, WANG. *et al.*, 2001) Resíduos 192 e 193 também foram reconhecidos como resíduos-chaves que afetam a especificidade das SPVSs para o subsítio P2 (BRAUD *et al.*, 2001, ZHANG *et al.*, 1999) Especificamente, os resíduos nas posições 215 e 217 têm sido considerados importantes desde que emergiram como resíduos-chaves na interação da trombina com o fibrinogênio. A posição 215 é extremamente conservada em TSVSs, enquanto o resíduo na posição 217 diverge extensamente na maioria das TSVSs (CASTRO *et al. apud* DI CERA E. & CANTWELL A. M 2004

Inibidores específicos para serinoproteases como DFP e o PMSF inibem TSVSs, confirmando a função dessas enzimas (PIRKLE 1998). Similar a trombina, TSVSs são insensíveis aos inibidores de tripsina como SBTI e  $\alpha$ 1 – antitripsina.

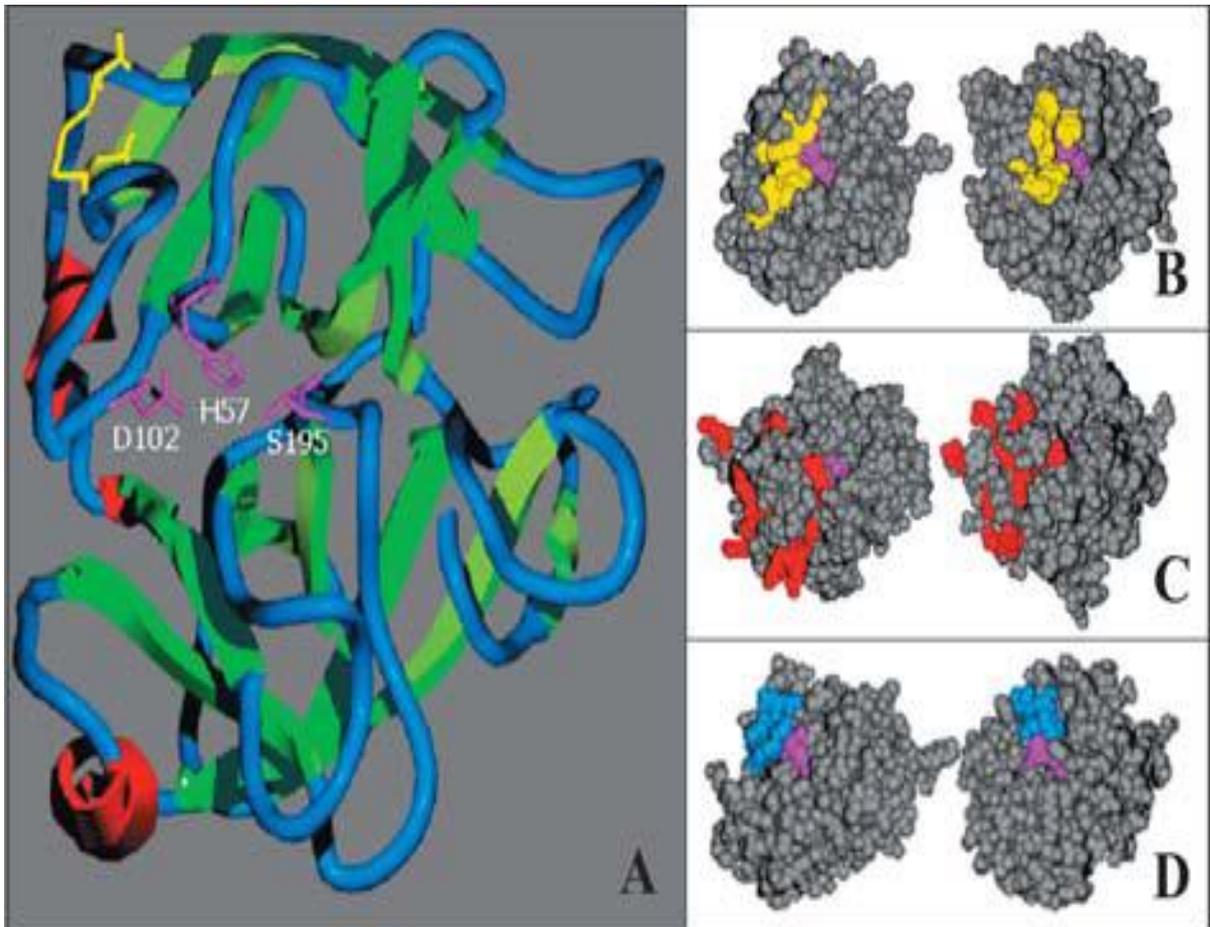


Figura 06. Característica estrutural de TSVSs representado pelo modelo LM-TL, enzima trombina – símile do veneno *Lachesis muta*. (A) Diagrama da estrutura secundária de LM-TL revelando um enovelamento  $\beta/\beta$  hidrolase típico de serinoproteases da família da quimiotripsina e a posição espacial da tríade catalítica (H57, D102, e S195) (rosa). A região expandida em azul,  $\alpha$  hélices mostradas em vermelho e  $\beta$  fitas em verde. A característica das pontes de dissulfetos de LM-TL das serinoprotease do veneno de serpentes é indicada em amarelo. (B, C e D) A representação da LM-TL (esquerda) e a cadeia  $\beta$  da trombina (direita), comparando seus sítios hidrofóbicos (amarelo) (B), LM-TL carregado positivamente e o exossítio de ligação de anion I da trombina (vermelho) (C), e LM-TL 90 e o loop 60's da trombina (azul) (D). A tríade catalítica (H57, D102 e S195) em rosa (CASTRO *et al.* 2004).

### 1.5.2. USO TERAPÊUTICO

Doenças associadas a trombozes (diabetes, infarto de miocárdio, etc.) são graves problemas de saúde pública e novas terapias estão sendo desenvolvidas objetivando novas drogas trombolíticas.

Envenenamentos por serpentes podem apresentar vários sintomas como: coagulopatia, hemorragia, danos e falhas renais, cardiotoxicidade e necrose no local da picada, sugerindo que venenos de serpentes afetam, dependendo da espécie, o sistema nervoso central, sistema cardiovascular e sistema muscular (KOH *et al.* 2006). Essas propriedades dos venenos de serpentes fazem com que as proteínas desses

venenos apresentem um grande potencial terapêutico para tratamento de doenças humanas (MARKLAND, 1998).

Devido às suas propriedades biológicas, TSVSs, *in vitro* como procoagulantes, convertendo fibrinogênio em fibrina e em *in vivo* causando desfibrinação benigna (STOKER 1990), essas enzimas vêm sendo extensivamente estudadas por pesquisadores básicos e clínicos, para o tratamento de infarto do miocárdio, isquemia e doenças trombóticas (CHANG & HUANG, 1995). Algumas TSVSs vêm sendo utilizados na prevenção da formação de trombos, na melhoria da circulação sanguínea e em várias desordens vasculares reduzindo a viscosidade do sangue. Estudos clínicos com Ancrod, TSVSs do veneno de *A. rhodostoma*, em pacientes com isquemia, patologia que ocorre em maior parte na oclusão embolítica ou trombolítica de uma artéria do cérebro, tem demonstrado ser um tratamento benéfico com bons resultados neurológicos, com somente um pequeno risco no aumento de sangramentos (CASTRO *et al apud* SHERMAN. 2004).

Estas enzimas são agentes promissores na clínica médica, agindo como desfibrinogénantes, tais como os Ancrod e Batroxobin, que foram utilizados no tratamento de trombozes, do infarto do miocárdio, em doenças vasculares periféricas, como isquemia aguda e rejeição de transplante renal (SANT'ANA *et al.* 2007).

Entretanto o uso popular de enzimas TSVSs é limitado devido às reações imunológicas em pacientes, a indisponibilidade aos venenos de serpentes e ao alto custo de produção.

É possível que outros membros da família das TSVSs possam ter a aplicabilidade como desfibrinogénantes em outras doenças crônicas e agudas. A importância em se identificar todos os substratos fisiológicos dessas enzimas, poderia conduzir às novas aplicações clínicas além das aplicações atualmente conhecidas.

Serinoproteases do veneno de serpentes da Amazônia vêm sendo pouco estudadas como trombolíticos. López – Lozano (2002) caracterizou uma enzima trombina – símile com atividade coagulante sob fibrinogênio bovino e plasma humano, *in vitro*, do veneno da serpente amazônica *B. atrox*, sugerindo que esta enzima possa ter aplicação clínica como drogas trombolíticas.

Muniz (2002), observou atividade proteolítica sob fibrinogênio e plasma humano, *in vitro*, e atividade desfibrinogénante, do veneno de *C.d. ruruima* em camundongo, sugerindo que a atividade coagulante detectada nos venenos de *C.d. ruruima* seja devido à presença de enzimas do tipo trombina – símiles.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar toxinas de venenos de *Crotalus durissus ruruima* com potencial biotecnológico como trombolíticos.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Caracterizar por técnicas proteômicas: eletroforeses e cromatografia, o perfil molecular do veneno de *Crotalus durissus ruruima*;

Obter frações protéicas do veneno de *Crotalus durissus ruruima*, com atividade desfibrinogenante *in vivo*, avaliado em camundongos.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 VENENOS DE SERPENTES

O veneno de *Crotalus durissus ruruima* (Houge 1965) foi fornecido pelo banco de venenos do Laboratório de Toxinologia Molecular do Centro de Ofidismo “Prof. Paulo Friedrich Bührenim” da Fundação de Medicina Tropical do Amazonas.

No processo experimental, as amostras dos venenos foram utilizadas em forma de “pool” e individuais. Foi utilizado um “pool” dos venenos de cor amarela Hemorrágico e Crotamina positiva de três espécimes procedentes de Boa Vista (RR), (MUNIZ, 2002). Também foram utilizados dezesseis venenos individuais de filhotes obtidos durante os seis primeiros meses de idade, mantidos nos Serpentários do Centro de Ofidismo “Prof. Paulo Friedrich Bührenim” da Fundação de Medicina Tropical do Amazonas.



**Figura. 07** *Crotalus durissus ruruima* (Foto André Higa)

#### 3.2 ANIMAIS DE LABORATÓRIO

Camundongos albinos (*Mus musculus*), não-isogênicos, pesando em torno de 18 a 22g  $\pm$  2, foram utilizados nos experimentos. Animais provenientes do biotério

experimental do Laboratório de Toxinologia Molecular do Centro de Ofidismo “Prof. Paulo Friedrich Bürhmhein” da Fundação de Medicina Tropical do Amazonas, foram mantidos em gaiolas de plásticos sob temperatura de 22 a 25°C recebendo água e ração *ad libitum* com ciclo de luz de 12 horas.

### **3.3. CARACTERIZAÇÃO DAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS DO VENENO DE *Crotalus durissus ruruima***

#### **3.3.1. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE FOSFOLIPÁSICA A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>).**

A atividade fosfolipásica A<sub>2</sub> foi determinada usando-se como fonte de fosfolípidios (fosfatidilcolina), a emulsão de gema de ovo 3% segundo López-Lozano, 2002. Em uma solução morna de 32,5 mL de 1% de agarose em tampão PBS pH 8,1, (0,12M de NaCl, 0,09 mM de CaCl<sub>2</sub> em solução tampão fosfato (PBS) 0,04 M, pH 8,1) eram agregados 2,25 ml de gema de ovo.

Após homogeneização, a mistura foi aplicada em uma placa de plástico, deixada à temperatura ambiente para gelificar. No gel de agarose, foram feitos 08 poços de 03 mm de diâmetro, onde se aplicava 15 µL das doses (µg) das amostras (veneno ou fração diluído em solução salina fisiológica), logo as placas eram incubadas em câmara úmida a 37°C por 24 horas. Após incubação, as áreas claras que sugerem atividade fosfolipásica A<sub>2</sub>, eram medidas (mm) com paquímetro. A atividade fosfolipásica A<sub>2</sub> foi expressa em % em relação ao veneno controle (*C. d. ruruima*, 10 µg).

#### **3.3.2. DETERMINAÇÃO DA DOSE MÍNIMA COAGULANTE (DMC).**

A Dose mínima coagulante (DMC) é definida como a menor quantidade de veneno (mg de veneno / litro de solução) capaz de coagular, em 60 segundos a 37°C, uma solução padronizada de plasma humano (DMC-P) contendo 2,8 g de fibrinogênio / litro ou uma solução fibrinogênio bovina (Fração tipo I – S SIGMA) (DMC-F) de 2 g / litro diluído em uma solução tampão PBS pH 7,4 (THEAKSTON & REID, 1983). Para a determinação da DMC-P, o plasma foi obtido de três voluntários sadios. Foram adicionados 200 µL a uma solução de fibrinogênio bovino ou plasma humano mantido as 37°C, 50 µL de solução salina com diferentes doses de veneno ou fração. O tempo

necessário para início da coagulação foi registrado, e os valores da DMC foram obtidos através da análise de regressão linear do tempo de coagulação sobre a quantidade de veneno.

### 3.3.3 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE TROMBINA – SÍMILE

A determinação da atividade trombina – símile sobre fibrinogênio bovino e plasma humano, foi realizado segundo o procedimento no item 3.3.2, e sobre fibrinogênio bovino por zimograma segundo o item 3.4.2. As frações avaliadas foram coletadas segundo item 3.4.6.1 e item 3.4.6.2. Para estudos de inibição, as frações selecionadas foram incubadas a 37°C por 2 horas com PMSF (10 mM concentração final) ou EDTA (10 mM concentração final), EDTA e PMSF (10 mM concentração final de cada inibidor) e Coquetel Inibidor de Proteases (SIGMA®) (AEBSF 2 Mm, EDTA 1 Mm, Bestatin 130 µM, E – 64 14 µM, Leupeptin 1 mM e Aprotin 0.3 µM). Após incubação, uma alíquota de cada sistema de inibição contendo 50 µL da fração foi agregada com 200 µL de plasma humano ou fibrinogênio bovino e o tempo de início da coagulação foi registrado. A atividade inibitória foi expressa em porcentagem (%) de inibição, determinada pelo tempo de iniciação do coágulo na presença do inibidor com relação ao tempo de iniciação da formação do coágulo pelo controle.

### 3.3.4. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DESFIBRINOGENANTE.

Na avaliação da atividade desfibrinogenante das frações, foi utilizado o método descrito por Theakston & Reid, (1983). Grupos de 04 camundongos foram injetados por via i.v (intravenosa) com doses (µg) do veneno ou fração diluído em 100 µL de solução salina. Após uma hora da injeção, os animais foram anestesiados com éter e sangrados por punção cardíaca. As amostras de sangue obtidas foram deixadas em tubos de hemólise, à temperatura ambiente, por 60 minutos. A incoaguabilidade sanguínea foi verificada após esse período.

### 3.3.5. EFEITO DO SORO HUMANO SOB ATIVIDADE DESFIBRINOGENANTE.

A neutralização da atividade desfibrinogenante pelo soro humano foi avaliada utilizando-se o método descrito por Gené *et al.* (1989). Duas diluições de soro humano nas proporções de 0,5: 1 e 1: 1 (soro humano / fração) foram incubadas por 30 min a 37°C e injetados via i.v. em camundongos. Após duas horas, os animais foram anestesiados, sangrados por punção cardíaca. O sangue coletado foi deixado em tubos de hemólise por uma hora à temperatura ambiente e avaliada a incoaguabilidade do sangue.

## 3.4 ANÁLISES DO PERFIL MOLECULAR DO VENENO E / OU DAS FRAÇÕES DE *Crotalus durissus ruruima*

### 3.4.1 CARACTERIZAÇÕES DOS VENENOS E / OU FRAÇÕES POR ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA SDS – PAGE.

A obtenção do perfil eletroforético SDS – PAGE foi realizada segundo Laemmli (1970), utilizando gel de empilhamento de 4% e gel de corrida de 15%. Os géis foram montados em placas de vidro de 10X08 cm e espaçadores de 1,5 mm. As amostras foram previamente desnaturadas em tampão amostra (Tris 0,125 M, SDS 2%, glicerol 10% e azul de bromofenol 0,05%) a 100°C por 3 min e reduzidas ou não com 1M de DTT, e aplicadas no gel. O tampão de corrida usado foi Tris – glicina pH 8,3 (Tris 25 mM, Glicina 192 mM, SDS 0,1%), sendo utilizado uma corrente elétrica constante de 20 mA por gel a 10°C. Os géis foram corados por 24 horas com 0,2% de Coomassie Blue R – 250, e descorados com metanol: ácido acético: água (50:10:40) e documentados utilizando o scanner ImageScanner (GE Healthcare) e analisados utilizando o programa Platinnium 6.0 (GE Healthcare).

### 3.4.2. CARACTERIZAÇÃO DO VENENO DE *Crotalus durissus ruruima* POR ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA SDS – PAGE TRIS – TRICINA

A obtenção do perfil eletroforético SDS – PAGE TRIS – TRICINA, para detecção de massas protéicas inferior a 14 kDA, foi realizada segundo Schagger & von Jagow, (1987), utilizando gel concentrador de 4%, gel espaçador de 10% e gel

separador de 16,5%. Os géis foram montados em placas de vidro de 10 X 08 cm e espaçadores de 1,5 mm. As amostras eram diluídas em tampão (Tris – HCL 0,05 M pH 6.8, SDS 4%, Glicerol 12%,  $\beta$  mercaptoetanol 2% e azul de bromofenol 0.01%) e incubadas por 30 min a 40 °C sendo utilizando uma corrente elétrica com voltagem de 30 V até que a amostra penetrasse totalmente no gel concentrador. Então a voltagem era elevada para 100 V, sendo mantida até o final da corrida. Os géis foram corados com nitrato de prata 0,2% e documentados utilizando o scanner ImageScanner (GE Healthcare) e analisados utilizando o programa Platinnum 6.0 (GE Healthcare).

### 3.4.3 ZIMOGRAMA PARA DETECÇÃO DE ATIVIDADE PROTEOLÍTICA.

A atividade proteolítica dos venenos e / ou frações, sobre fibrinogênio bovino e sobre gelatina, foi verificada através de zimograma em gel de poliacrilamida (item 3.4.1). Fibrinogênio bovino ou gelatina, nas concentrações de 5 mg / gel, foram misturados previamente com a solução do gel de corrida antes da polimerização. Foram aplicados 40  $\mu$ g de amostra por poço, e após o término da corrida os géis foram lavados com Triton X – 100 a 2,5% por uma hora a temperatura ambiente. Em seguida os géis foram incubados a 37°C por 24 horas em tampão glicina 100 mM pH 8,3 para géis com fibrinogênio e em tampão colagenase Tris 50 mM, pH 7,4 para géis com gelatina. Os géis posteriormente foram corados por 24 horas com 0,2% de Coomassie Blue R – 250, e descorados com metanol: ácido acético: água (50:10:40) e documentados utilizando o scanner ImageScanner e analisados utilizando o programa Platinnum 6.0 (GE Healthcare). Bandas claras sob fundo escuro sugerem atividade proteolítica.

### 3.4.4 CARACTERIZAÇÕES DO VENENO POR ELETROFORESE BIDIMENSIONAL

A obtenção do perfil molecular por eletroforese bidimensional foi realizada somente com o “pool” de veneno amarelo de Boa Vista. A amostra do veneno (500  $\mu$ g) foi diluída em 450  $\mu$ L de solução de reidratação (7M de uréia, 2M de tiouréia, 2% de CHAPS, 0,5% de IPG buffer, e 1% de DTT) e aplicado em IPG strips de 24 cm (GE Healthcare), não-linear em faixa de pH 3 – 11 por 12 horas. Após 12 horas de reidratação as fitas foram submetidas a um campo elétrico a 20°C usando o focalizador isoeletrico IPGphor III (GE Healthcare) com três passos sucessivos de 500

Vh, 1000 Vh e 45000 Vh. Após focalização, para redução e alquilação das proteínas, os IPG “strips” foram deixados 30 minutos em uma solução de equilíbrio (6M de uréia, 75 mM Tris – HCL pH 8,8, 29,3% de glicerol, 2% de SDS, 2% e 0.02% de azul de bromofenol) contendo 125mM de DTT e mais 30 minutos em 125 mM de iodoacetamida. Após esse processo, as proteínas foram separadas por massa molecular em eletroforese SDS – PAGE com gel de corrida de 12,5% de poliacrilamida no sistema DALTsix (GE Healthcare) com espaçadores de 1,5mm de espessura, conectado ao sistema de refrigeração MultiTemp II (GE Healthcare) a 10°C. A corrida eletroforética ocorreu com uma corrente constante de 25 mA por gel durante seis horas. Após a corrida, os géis foram fixados utilizando uma solução fixadora de 40% de etanol, 10% de ácido acético por 30 minutos, corados com Coomassie blue 0, 025% e descorados com 20% de etanol 5% de ácido acético. Os géis foram escaneados no scanner ImageScanner (GE Healthcare) e analisados no programa ImageMaster 2D Platinum 6.0 (GE Healthcare).

### 3.4.5 ANÁLISES CROMATOGRÁFICAS.

#### 3.4.5.1 CROMATOGRAFIAS POR FILTRAÇÃO MOLECULAR

A cromatografia por exclusão molecular foi realizada para fracionar as proteínas do veneno por massa molecular. Foram fracionados 200 mg do veneno amarelo de Boa Vista, utilizando cromatografia líquida em condições isocráticas, com uma coluna Superdex™ 10/300 GL Columns (Tricorn) (13 µm) equilibrada com acetato de amônia 10 mM, com 10% de acetonitrila, velocidade de fluxo 1 mL / min, monitorado com detector analítico com luz ultravioleta sob radiação luminosa a 214 ou 280 nm. Para cada corrida cromatográfica foram aplicadas 5 mg de amostra. Durante todo o processo cromatográfico, todos os picos, segundo o seu tempo de retenção, foram coletados separadamente, congelados com nitrogênio líquido e liofilizados. As massas moleculares e o grau de pureza dos constituintes de cada pico foram avaliados por eletroforese SDS – PAGE segundo o item 3.4.1 e as atividades proteolíticas foram detectadas por zimograma segundo o item 3.4.2 e atividade DMC – P e DMC – F conforme o item 3.3.2.

### 3.4.5.2 CROMATOGRAFIAS POR FASE REVERSA.

A cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa foi utilizada como um segundo passo cromatográfico para obtenção da fração com atividade desfibrinogenante. Foi utilizada uma coluna semipreparativa SHIM – PACK PREP ODS (Shimadzu, 250 x 20 mm, 15  $\mu$ m) equilibrada com 0,1% TFA (solução A). A eluição dos constituintes dos venenos era iniciada com fluxo da solução A por 10 minutos e continuada com gradiente 0,1% de TFA em acetonitrila (Solução B), de 0 a 60% em 70 minutos. A velocidade do fluxo para eluição dos constituintes era de 2,5 mL / min, monitorado com um detector analítico com luz ultravioleta sob radiação luminosa a 214 ou 280 nm. Para cada corrida cromatográfica foram aplicadas 4 mg de amostra segundo López-Lozano, (2002). Durante todo o processo cromatográfico, todos os picos, segundo o seu tempo de retenção, foram coletados separadamente, congelados com nitrogênio líquido e liofilizados. As massas moleculares e o grau de pureza dos constituintes de cada pico foram determinados por eletroforese SDS – PAGE segundo o item 3.4.1 e foram avaliadas suas atividades proteolíticas por zimograma segundo o item 3.4.2 e atividade DMC – P e DMC – F conforme o item 3.3.2.

### 3.6 DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS

A quantificação das proteínas foi realizada utilizando o método de BRADFORD (1976), segundo instrução do fabricante. Usando como padrão albumina bovina (BSA). O teor de proteínas total foi expresso em mg de proteínas / mg de veneno seco.

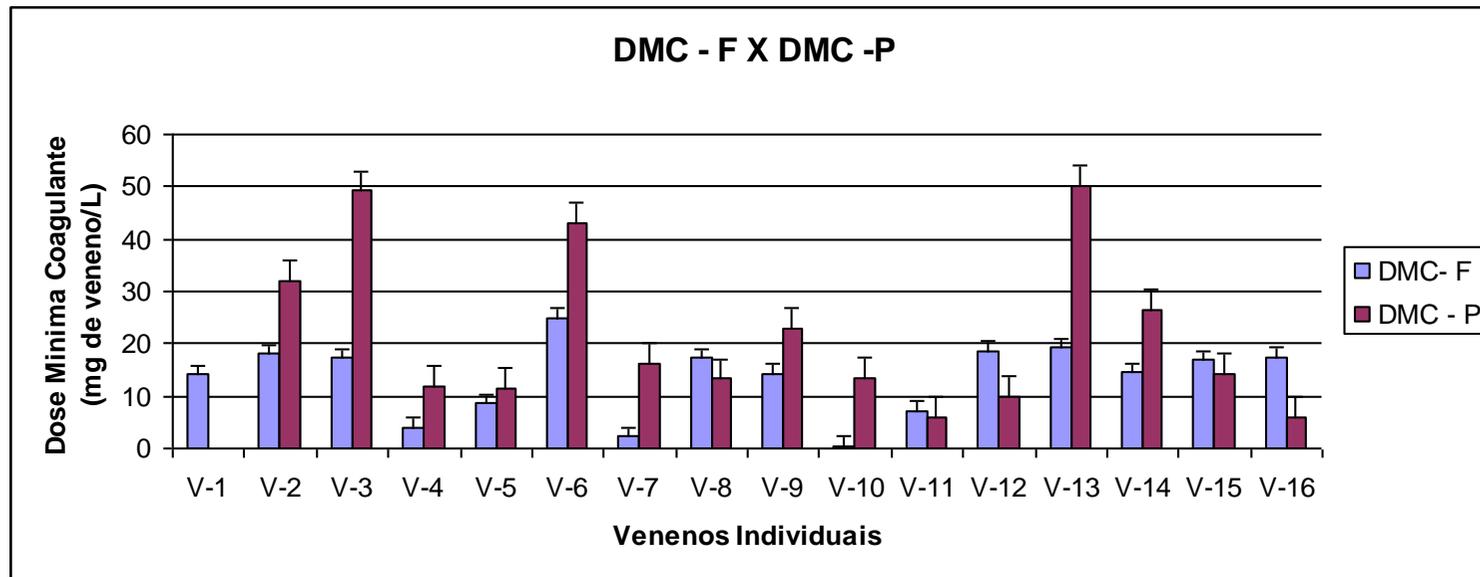
### 3.7 ANÁLISES ESTATÍSTICA

Os resultados dos testes com repetições foram analisados estatisticamente, utilizando-se os testes estatísticos ANOVA, regressão linear ou teste T Student, mediante o programa Oringin 7.5 Pro.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 CARACTERIZAÇÃO DAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS DO VENENO DE *Crotalus durissus ruruima*

#### 4.1.1 DETERMINAÇÃO DA DOSE MÍNIMA COAGULANTE (DMC).

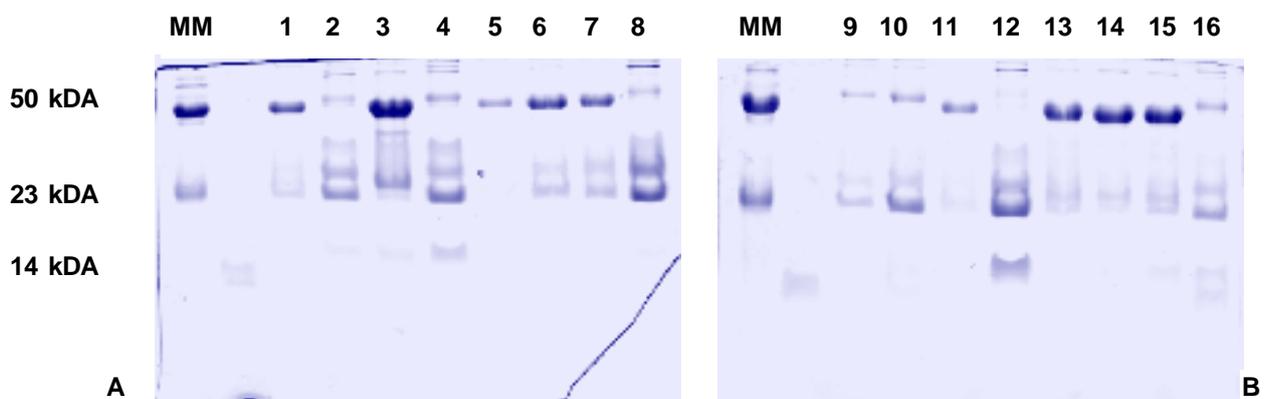


**Figura 08.** Atividade coagulante dos venenos individuais de filhotes de *C. d. ruruima* sobre fibrinogênio e plasma humano, V – venenos testados; DMC-F: dose mínima coagulante em fibrinogênio; DMC-P dose mínima coagulante em plasma humano.

Segundo a figura 08, o veneno de *C. d. ruruima* mostra uma grande variação nas atividades coagulantes dos venenos individuais dos 16 filhotes, tanto sobre fibrinogênio quanto sobre plasma humano. Sobre fibrinogênio o veneno que apresentou menor atividade foi amostra 06, (25,03 mg / L) e o que apresenta maior atividade é a amostra 10 (5,5 mg / L). Em plasma humano a amostra 03 (49,15 mg / L) foi o que apresentou maior atividade e a amostra 11 (6,05 mg / L) apresentou menor atividade. Na comparação entre as atividades sobre em plasma humano e fibrinogênio, foi detectado que para atividade coagulante em plasma humano a maioria dos venenos necessita de uma maior concentração de veneno para iniciar a coagulação após 60 segundos da aplicação do veneno. O veneno 01 não foi calculado a sua dose mínima coagulante sobre plasma humano, pois não foi possível, com as concentrações testadas, determinar a concentração da mesma para coagular plasma humano em 60 segundos, sendo necessários testes com concentrações maiores do veneno para avaliar sua atividade sobre plasma humano.

## 4.2. ANÁLISE DO PERFIL MOLECULAR DO VENENO DE *Crotalus durissius ruruima*

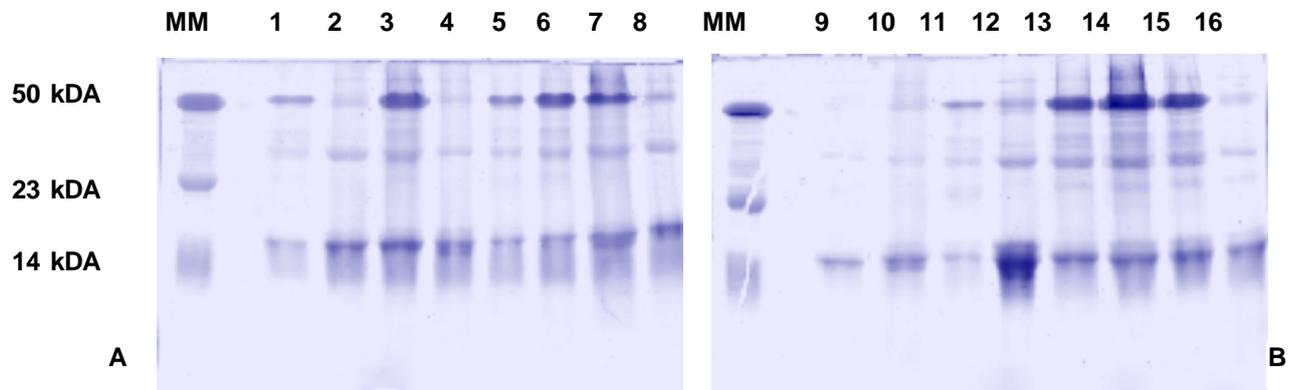
### 4.2.1. PERIL MOLECULAR DOS VENENOS POR ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA SDS – PAGE.



**Figura 09.** Perfil SDS – PAGE dos venenos individuais (filhotes) de 01 a 08 (A) e de 09 a 16 (B), (MM) marcador molecular veneno *B. atrox* em condições não redutoras

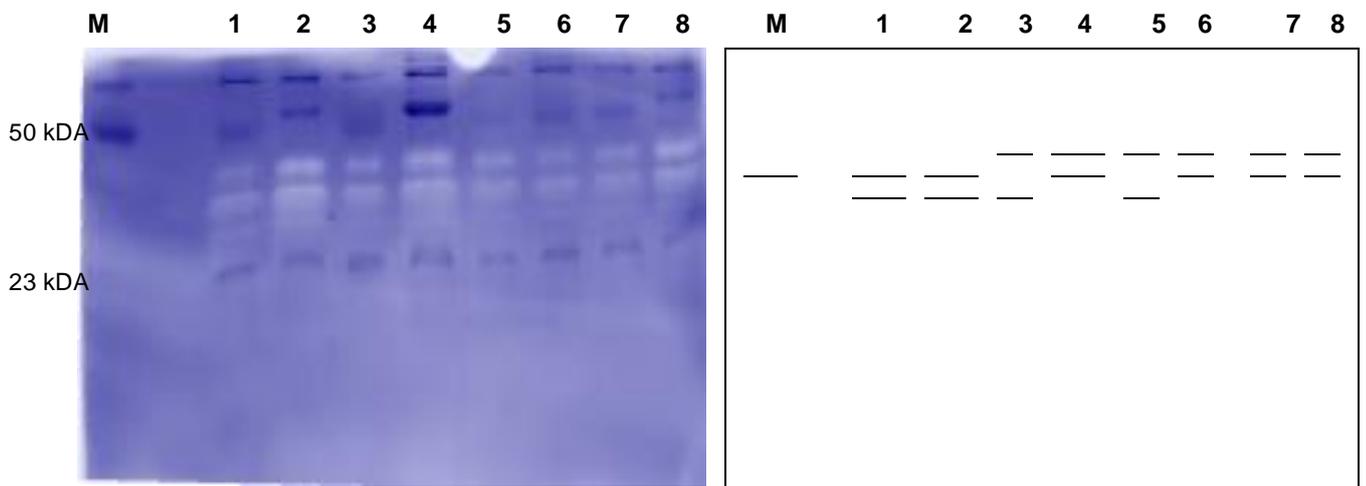
Segundo as figuras 09 e 10 os perfis moleculares dos venenos individuais mostraram variabilidade quantitativa nas bandas de proteínas detectadas por SDS – PAGE. Foram detectadas, principalmente, bandas protéicas com massas moleculares

de 50, ~30, e 14 kDa. Em condições redutoras alguns apresentaram bandas de massas moleculares de 50 e de ~30 kDa com pequena intensidade. Todos os venenos individuais apresentaram bandas com massa molecular de 14k DA em condições redutoras, mas bandas protéicas com similar massa molecular não foram detectadas em alguns venenos nas condições não-redutoras. Nos venenos individuais 11, 13, 14, 15 e 16 apresentaram uma banda com ~23kDA, essa banda não foi detectada nos outros venenos em condições redutoras. Os venenos individuais em condições não-redutoras apresentaram duas bandas com massas moleculares em torno de ~30 kDa, não detectadas em alguns venenos em condições redutoras.

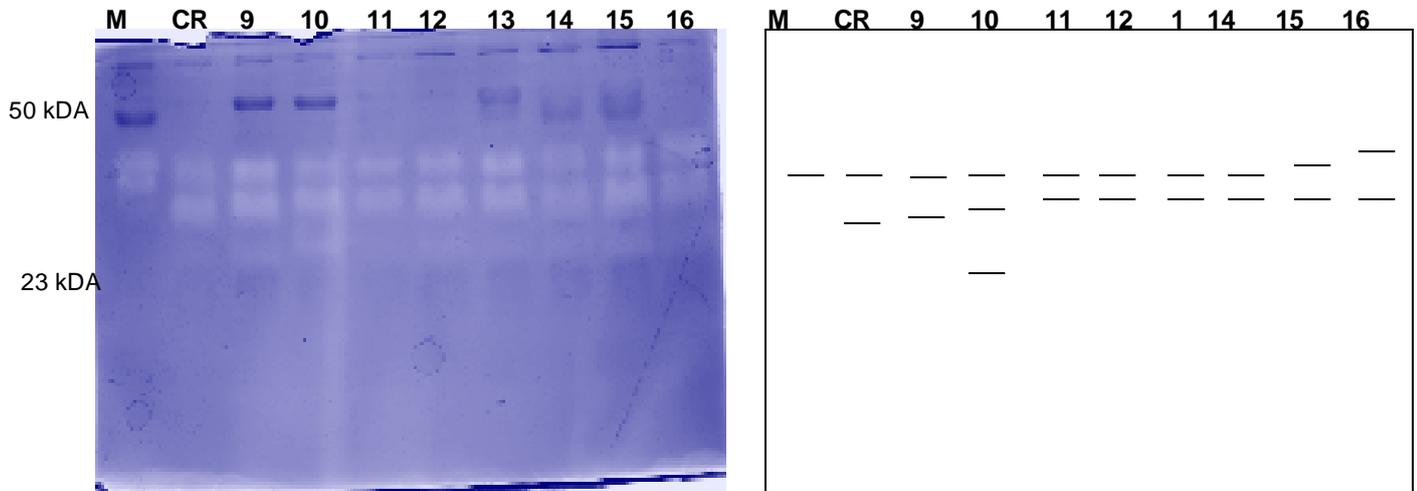


**Figura 10.** Perfil SDS – PAGE dos venenos individuais (filhotes) de 01 a 08 (A) e de 09 a 16(B) em condições redutoras, (MM) marcador molecular veneno *B. atrox*.

#### 4.2.2. ZIMOGRAMA PARA DETECÇÃO DE ATIVIDADE PROTEOLÍTICA



**Figura. 11.** Zimograma dos venenos individuais (filhotes) de 01 a 08 em fibrinogênio o veneno *B. atrox* foi utilizado como marcador molecular (M.M).

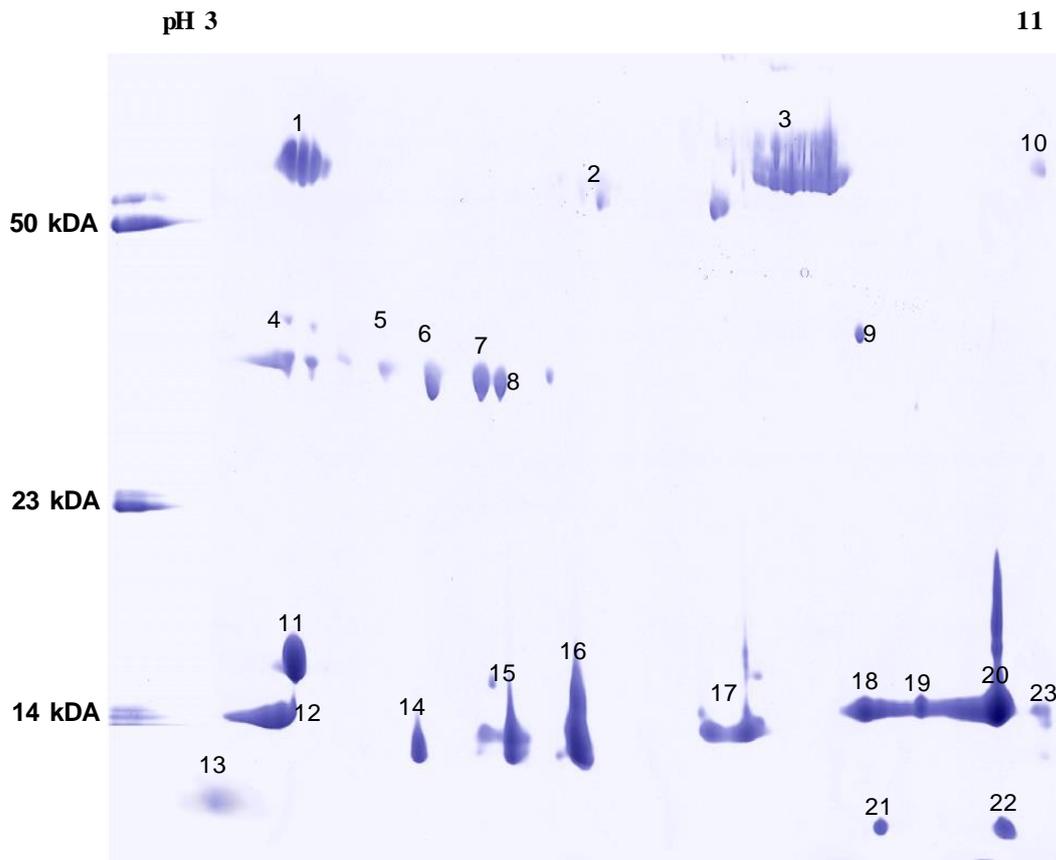


**Figura. 12.** Zimograma dos venenos individuais (filhotes) de 09 a 16 em fibrinogênio o veneno *B. atrox* e foi utilizado como marcador molecular (M.M) e CR (*Crotalus durissius ruruima*).

As atividades proteolíticas detectadas por zimograma, dos constituintes dos venenos individuais sobre fibrinogênio são apresentadas nas figuras 11 e 12. Todos os venenos individuais analisados apresentaram atividade sobre fibrinogênio. Os constituintes dos venenos que apresentaram atividade proteolítica sobre fibrinogênio apresentaram duas bandas de massa molecular de ~ 30 kDA, alguns venenos apresentaram uma terceira banda de atividade, com massa de ~23 kDA. Foi observado no “pool” do veneno de *C. d. ruruima*, usado como controle, apresentou constituintes com atividade proteolítica sobre fibrinogênio de ~ 30 kDA e não sendo detectado um terceiro constituinte com atividade proteolítica sobre fibrinogênio com massa de ~ 23 kDA utilizando o sistema zimograma. Os testes realizados para inibição das atividades proteolíticas, com PMSF, EDTA E PMSF+EDTA na concentração de 10 mM, não inibiu as atividades proteolíticas tanto em fibrinogênio quanto em gelatina, (dados não mostrados) em nenhuma das amostras testadas, sendo necessários testes em diferentes condições experimentais para determinar os inibidores dessa atividade proteolítica.

### 4.3. PERFIL MOLECULAR DO VENENO AMARELO DE *Crotalus durissus ruruima* POR ELETROFORESE BIDIMENSIONAL

#### 4.3.1 GEL DE POLIACRILAMIDA DE 12% 24 cm pH 3 – 11.



**Figura. 13.** Gel de eletroforese bidimensional de pH 3 – 11 de poliacrilamida de 12,5% aplicados 500µg de veneno.

Segundo a figura 13, no perfil molecular do veneno amarelo de *C. d. ruruima* por eletroforese bidimensional foram detectados 23 “spots” protéicos, alguns com massas moleculares maiores de 50 kDA tanto com pl ácido quanto com pl básico. Proteínas com massas moleculares maiores de 23 kDA, 30 a 35 kDA, foram detectados com pl ácido (“spots” 4 a 8), sendo, detectado um único “spot” com pl básico (“spot” 9). O veneno amarelo de *C.d.ruruima* apresentou em eletroforese bidimensional, vários “spots” com massa molecular de ~ 14 kDA com pl ácido (“spots” 12, 14 a 16) e básico (“spots” 17 a 20, 23). Também foram encontradas massas moleculares menores de 14 kDA, dois “spots” com pl básico (“spots” 21 e 22) e um “spot” com pl ácido (“spot” 13).

#### 4.4. PERFIL MOLECULAR DO VENENO AMARELO DE *Crotalus durissius ruruima*. POR ELETROFORESE SDS – PAGE TRIS – TRICINA

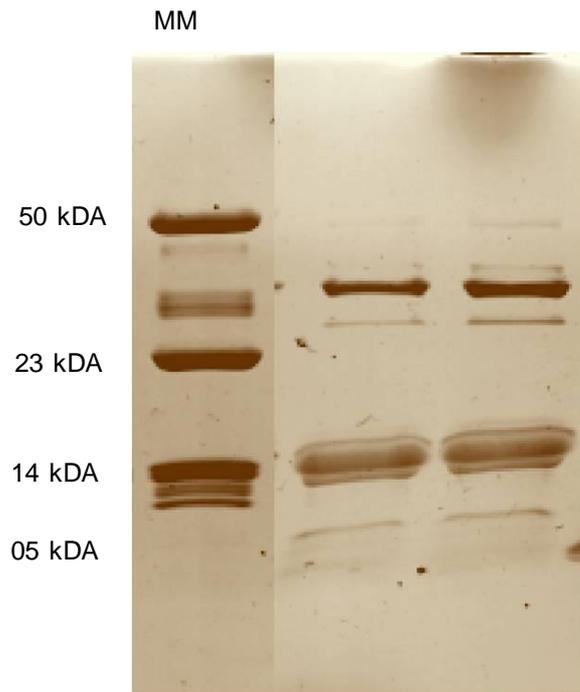
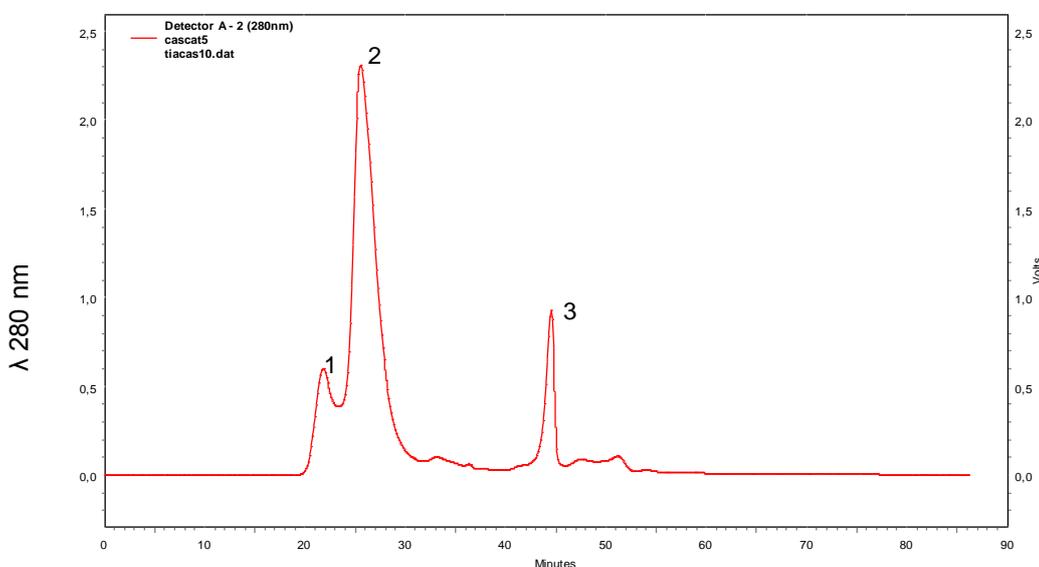


Figura 14. Perfil SDS – PAGE TRIS – TRICINA do veneno amarelo de *C.d.ruruima*. O veneno *B. atrox* foi utilizado como marcador molecular (M.M).

Segundo a figura 1, no perfil molecular do veneno amarelo de *C.d.ruruima* por eletroforese SDS – PAGE TRIS – TRICINA foram detectadas bandas protéicas de ~ 50, 32, 14 e 5 kDa. A banda protéica de ~ 5 KDa sugere ser crotamina.

## 4.5 CARACTERIZAÇÕES POR CROMATOGRAFIA

### 4.5.1. CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA POR FILTAÇÃO MOLECULAR

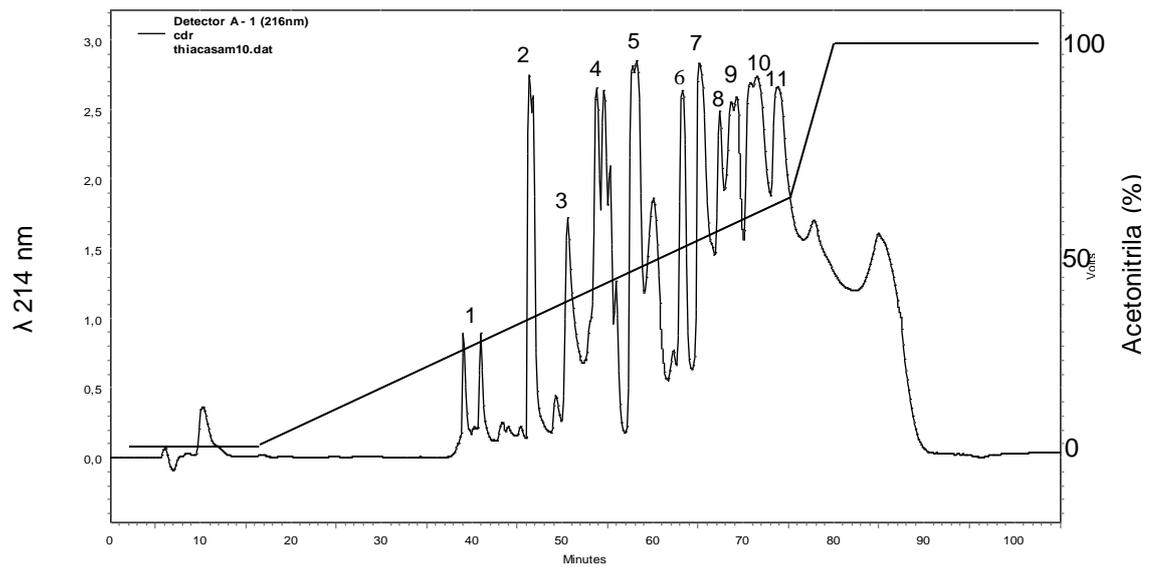


**Figura 15.** Perfil cromatográfico HPLC filtração molecular, coluna Superdex™ 10/300 GL Columns (Tricorn) (13µm) tampão acetato de amônia 10 mM, obtido utilizando 5 mg veneno amarelo monitorado sob radiação luminosa no comprimento de onda UV a 280nm.

A análise dos perfis cromatográficos HPLC – filtração molecular e HPLC – FR – C18, do pool de veneno amarelo de *C.d.r* (figura 15 e 16), foram obtidos segundo o procedimento cromatográficos descritos no item 3.4.6.1 e 3.4.6.2. No perfil cromatográfico, obtido por filtração molecular, pode-se observar 3 picos, com tempo de retenção de ~25 a 46 min (figura 15) min quando monitorados em comprimento de onda de 280 nm. No perfil cromatográfico obtido por fase reversa, pode – se observar 11 picos com tempo de retenção de ~ 40 a 75 min quando monitorados em comprimento de onda de 214 nm.

As proteínas obtidas pelos métodos cromatográficos acima descritos foram caracterizadas molecularmente e detectadas as atividades fosfolipásicas, proteolíticas e desfibrinogenante.

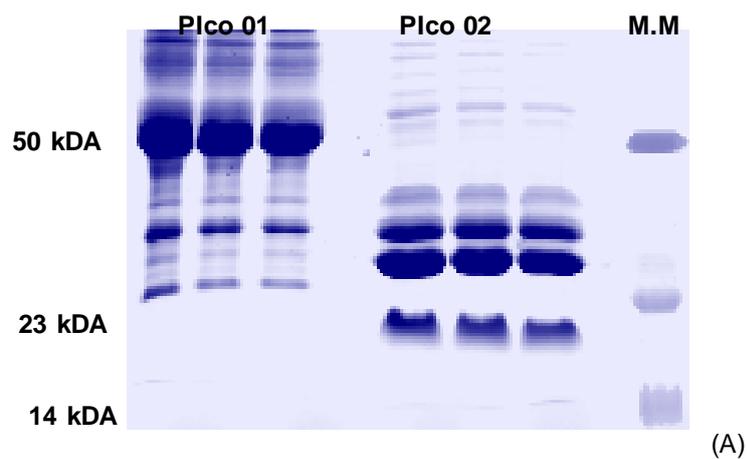
## 4.5.2 CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA EM FASE REVERSA



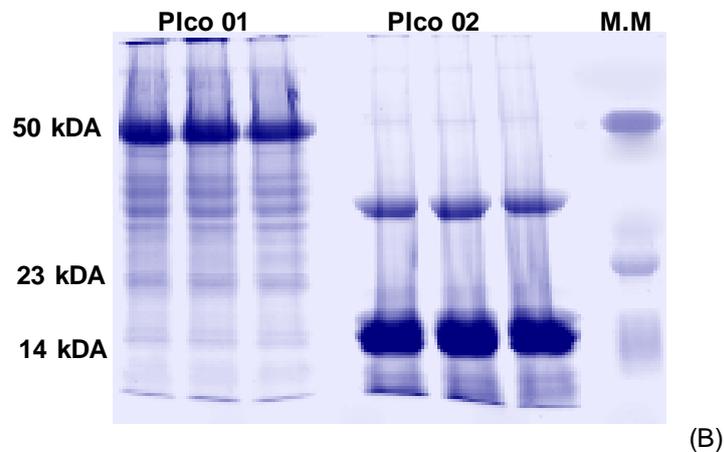
**Figura 16.** Perfil cromatográfico HPLC – FR – C18, coluna C18 ODS Shimatzu, obtido utilizando 4mg do veneno amarelo monitorado sob radiação luminosa de comprimento de ondas de 214nm.

## 4.6 DETECÇÃO DO PERFIL MOLECULAR DAS FRAÇÕES OBTIDAS DO VENENO DE *Crotalus durissus ruruima*

### 4.6.1 ELETROFORESE SDS – PAGE.



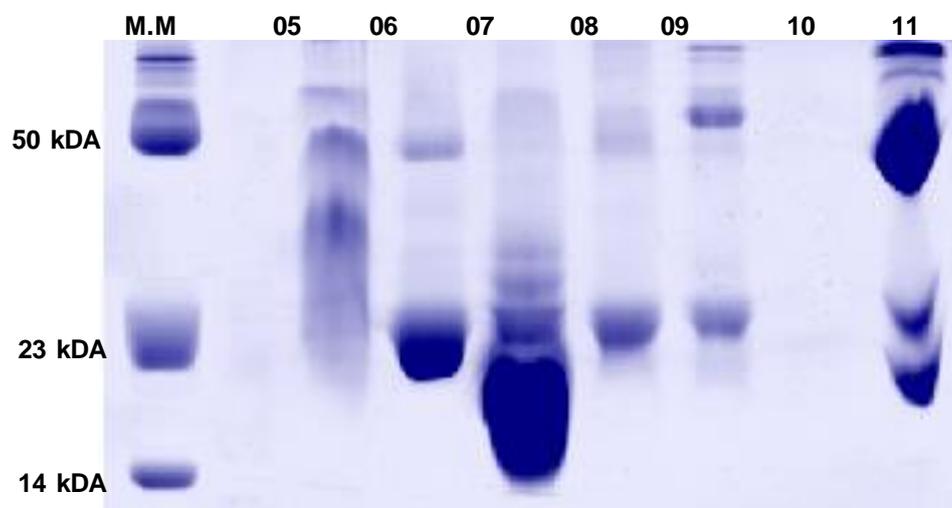
(A)



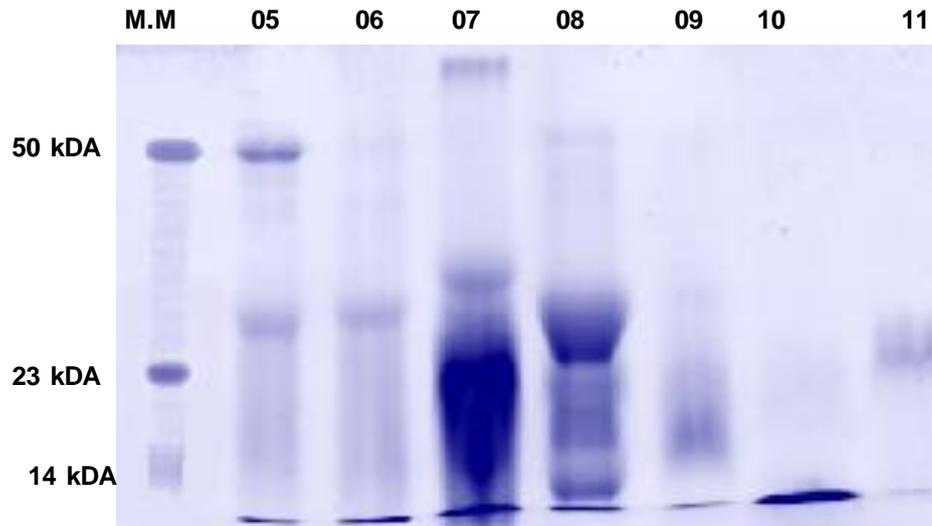
**Figura 17.** Perfil SDS – PAGE dos picos 01 e 02 obtidos por cromatografia filtração molecular nas condições não reduzidas (A) e reduzidas (B), o veneno *B. atrox* foi utilizado como marcador molecular (M.M).

Segundo o perfil molecular SDS – PAGE em condições não-reduzidas das frações 01 e 02, (Figura 17 A) obtidas por filtração molecular observa-se, principalmente, banda protéica de ~50 kDA, 32 kDA e 23 kDA no pico 01 e bandas protéicas de ~14, 23 e 32 kDA no pico 02. Em condições reduzidas (Figura 17 B) observa-se no pico 01, principalmente uma banda protéica de ~ 50 kDA, e no pico 02 proteínas de ~ 14 e 32 kDA e bandas protéicas de ~ 10 kDA.

A comparação dos perfis, não-reduzido e reduzido, sugere que as proteínas do veneno de *C.d. ruruima* são proteínas com massas moleculares de ~ 50, 32 e 14 kDA.



**Figura 18.** Perfil SDS – PAGE dos picos 05 a 11 nas condições reduzidas obtidos por CLAE em fase reversa. O veneno *B. atrox* foi utilizado como marcador molecular (M.M).

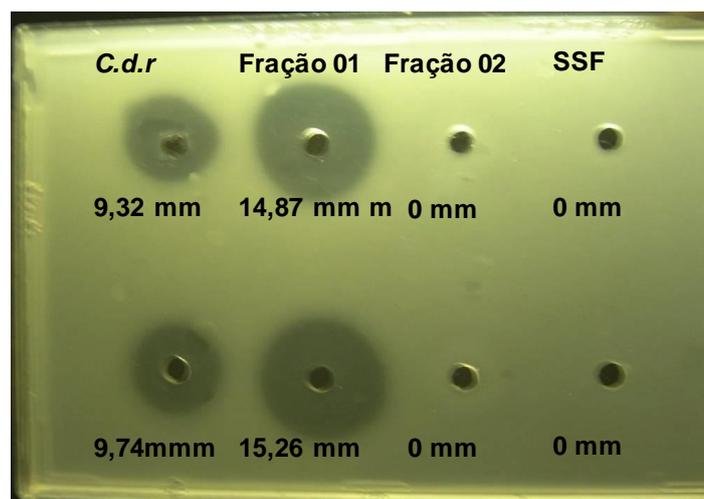


**Figura 19.** Perfil SDS – PAGE dos plcos 05 e 11 nas condições não reduzidas obtidos por CLAE em fase reversa. O veneno *B. atrox* foi utilizado como marcador molecular (M.M).

Segundo o perfil molecular SDS – PAGE em condições redutoras e não-redutoras das frações obtidas por cromatografia fase reversa (Figuras 18 e 19), também sugere que as proteínas do veneno de *C.d. ruruima* são proteínas com massas moleculares de ~ 50, 32 e 14 kDA.

#### 4.7 CARACTERIZAÇÃO DAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS DO VENENO AMARELO DE *Crotalus durissius ruruima*

##### 4.7.1. DETECÇÃO DA ATIVIDADE FOSFOLIPÁSICA A<sub>2</sub>



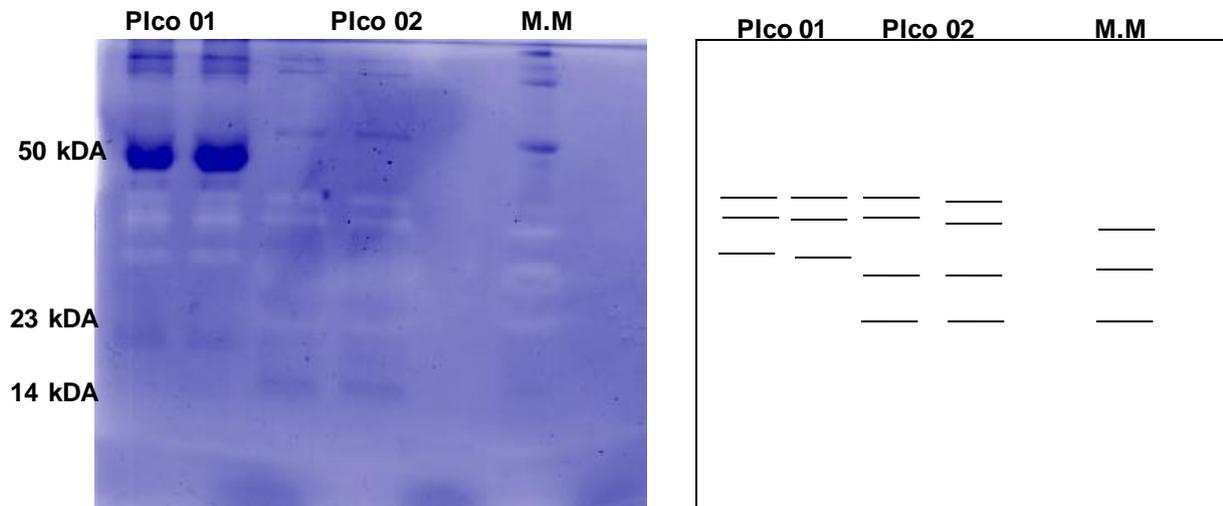
**Figura 20.** Atividade fosfolipásica dos plcos 01 e 02 obtidos por filtração molecular e veneno *C.d.ruruima* (Controle, 10µg).

**Tabela 04.** Atividade fosfolipásica A<sub>2</sub> das frações 01 e 02 obtidos por filtração molecular.

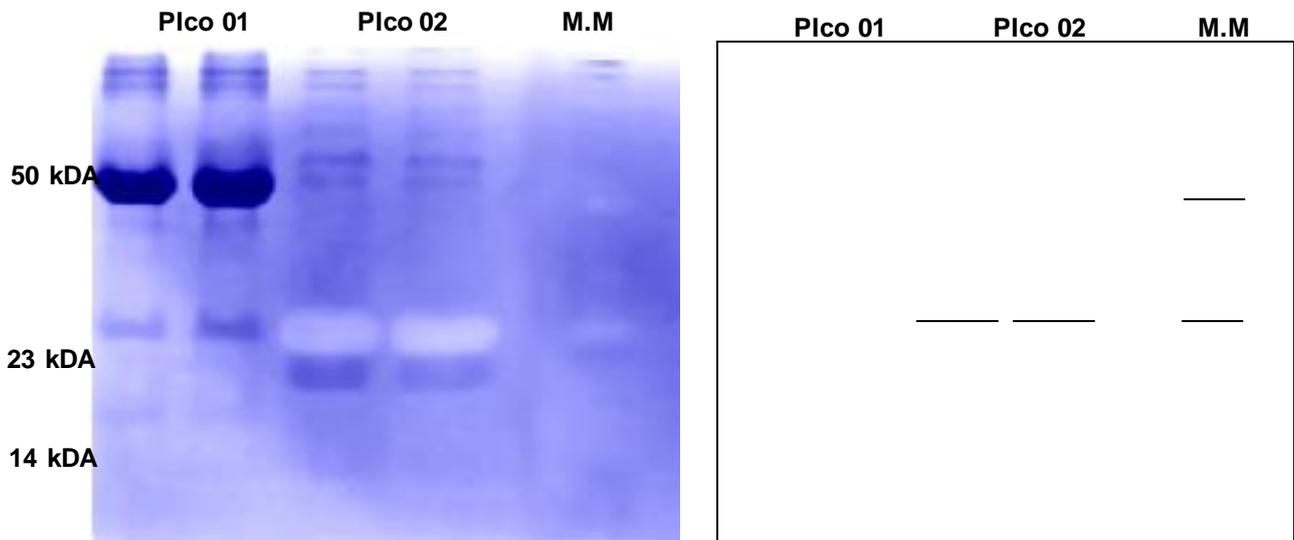
Frações	Atividade PLA <sub>2</sub>
Fração 01	158,2%
Fração 02	0%
Veneno <i>C.d.r</i>	100%

A figura. 20 e a tabela 04 mostram atividade fosfolipásica A<sub>2</sub> do veneno amarelo de *C. d. ruruima*, e os plcos 01 e 02 obtidos por filtração molecular. Foram aplicados 10 µg em solução final em todos os poços, exceto o poço que possui 20 µL de SSF (solução salina fisiológica 0,9%). Podemos observar que a fração 01 apresentou uma maior atividade que o veneno bruto, porém na fração 02 não foi detectada atividade PLA<sub>2</sub>, nas condições experimentais realizadas.

#### 4.7.2. ZIMOGRAMA DA ATIVIDADE PROTEOLÍTICA DAS FRAÇÕES SOB FIBRINOGENO BOVINO E GELATINA.

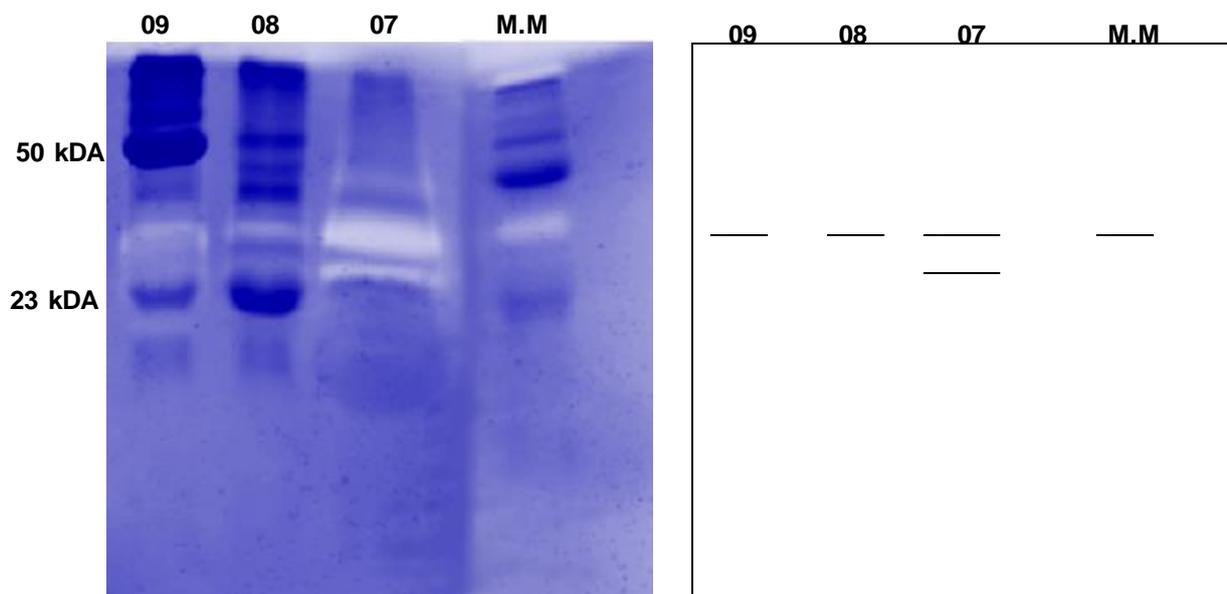


**Figura. 21.** Zimograma dos plcos 01 e 02 sobre fibrinogênio obtido por CLAE em filtração molecular e o veneno de *C.d. ruruima*. foi utilizado como marcador molecular (M.M)

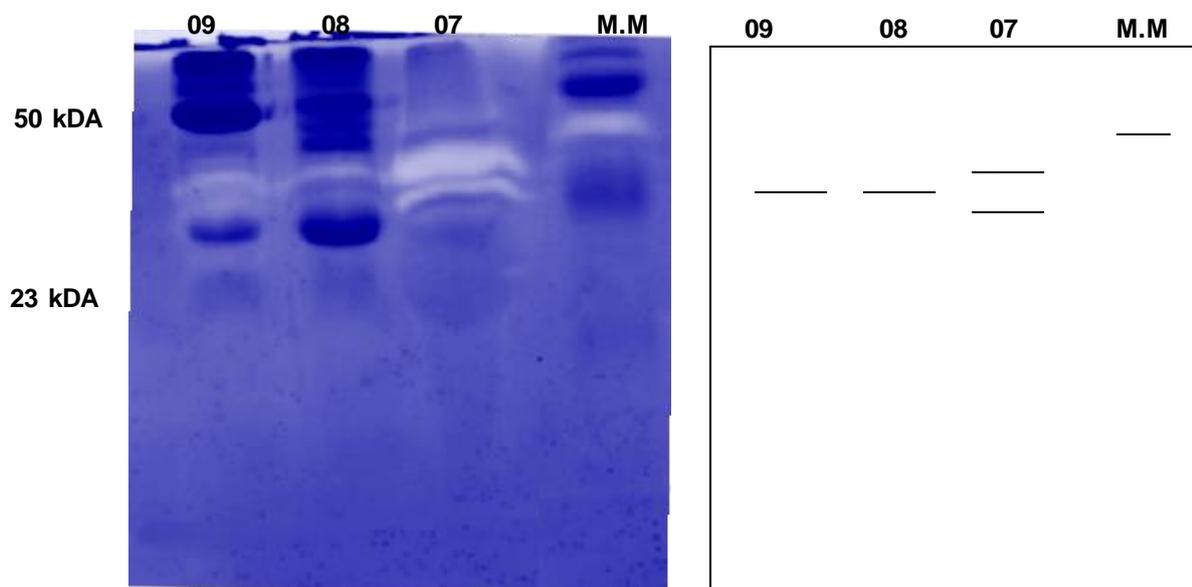


**Figura 22.** Zimograma dos picos 01 e 02 sobre gelatina obtido por CLAE em filtração molecular e o veneno de *C.d. ruruima*. foi utilizado como marcador molecular (M.M)

As figuras 21 e 22 mostram, respectivamente, os perfis da atividade proteolítica das frações 01 e 02, obtidos por cromatografia por filtração molecular, sob fibrinogênio e gelatina. Na figura 21 nas duas frações avaliadas foram observadas atividades sob o substrato fibrinogênio, sugere proteases com massas moleculares na faixa de ~25 a 40 kDA. Na figura 22 somente foi observada a atividade proteolítica sob gelatina na fração 02, sugerindo uma protease com massa molecular de ~25 kDA. Foi detectada uma variação na intensidade da atividade proteolítica quando as frações foram incubadas com inibidores de serinoproteases e coquetel de inibidores. Não foi observada inibição total das atividades proteolíticas sob fibrinogênio.



**Figura. 23.** Zimograma dos picos, 07, 08, 09 sobre fibrinogênio, obtido por CLAE em fase reversa. Veneno *B. atrox* foi utilizado como marcador molecular (M.M).



**Figura. 24.** Zimograma dos picos, 07, 08, 09 sobre gelatina, obtido por CLAE em fase reversa. Veneno *B. atrox* foi utilizado como marcador molecular (M.M).

Segundo as figuras 23 e 24 podemos observar atividades proteolíticas dos picos 07, 08 e 09 sob fibrinogênio e gelatina. Observa-se atividade proteolítica que sugerem proteases com massas moleculares de ~ 32 kDA, em todas as frações avaliadas.

#### 4.7.3. DETERMINAÇÃO DA DOSE MÍNIMA COAGULANTE EM PLASMA HUMANO E INIBIÇÃO DA ATIVIDADE COAGULANTE DAS FRAÇÕES OBTIDAS POR FILTRAÇÃO MOLECULAR.

**TABELA 05.** Dose mínima coagulante sob plasma humano das frações do veneno amarelo de *C. d. ruruima* obtidas por filtração molecular.

Frações	DMC – P (mg / l)
Fração 01	13,4
Fração 02	16,3
Veneno <i>C.d.r</i>	25,4

Segundo a tabela 06, para coagular 1 litro de plasma humano são necessários 13,4 mg e 16,3 mg das frações 01 e 02 respectivamente.

**TABELA 06.** Inibição da atividade coagulante das frações do veneno amarelo de *C.d.ruruima* obtidos por filtração molecular.

Frações	Inibição (%)			
	EDTA+ Plasma humano	EDTA+PMSF+ Plasma humano	PMSF+ Plasma humano	Coquetel de inibidores+ Plasma humano
Fração 01	0	100	100	100
Fração 02	0	100	100	100

Os testes de inibição da atividade coagulante utilizando inibidores de proteases, PMSF (serinoproteases) e coquetel de inibidores de proteases, SIGMA, (serinoproteases, metaloproteases, aminopeptidases, cisteinoproteases) sob as DMC – P de cada uma das frações 01 e 02 apresentaram inibição da atividade coagulante, considerando-se 100% de inibição da atividade coagulante, o início da coagulação do plasma humano após 180 segundos. Quando as frações 01 e 02 foram tratadas com EDTA (inibidor de metaloproteases) o tempo de início da coagulação foi o mesmo do controle, 60 segundos. Os dados de inibição segundo a tabela 06 sugerem que a enzima que promove a atividade coagulante, *in vitro*, seja uma serinoprotease.

#### 4.7.4. ATIVIDADE BIOLÓGICA DAS FRAÇÕES DE *Crotalus durissus ruruima* OBTIDAS POR CROMATOGRÁFIA FASE REVERSA

##### 4.7.4.1. ATIVIDADE COAGULANTE SOB FIBRINOGÊNIO BOVINO.

**Tabela 07.** Atividade das frações obtidas por cromatografia fase reversa sob fibrinogênio bovino.

Fração	Atividade sob fibrinogênio
Fração 04	(--)
Fração 05	(+)
Fração 06	(--)
Fração 07	(+)
Fração 08	(+)
Fração 09	(+)
Fração 10	(--)

(--) Não apresentou atividade sob fibrinogênio, (+): Apresentou atividade sob fibrinogênio. Para cada teste foram utilizados 10 µL de cada fração.

De acordo com a tabela 07, a atividade sob fibrinogênio das frações obtidas por cromatografia fase reversa, foi verificada nas frações 05, 07, 08, e 09, porém a

fração 05 induziu a formação de muito fraco e as frações 07, 08 e 09 que induziram um coágulo forte.

**Tabela 08.** Atividade coagulante sob fibrinogênio das frações obtidas por cromatografia fase reversa, das frações 07, 08 e 09 do veneno amarelo de *C.d.ruruima* obtidas por cromatografia fase reversa.

µg de fração	Tempo de início da coagulação em segundo		
	Fração 07	Fração 08	Fração 09
10	91	73	41
5	143	120	41
2,5	222	190	161
1,25	267	264	171

A tabela 08 apresenta atividade das frações 07, 08 e 09 sob fibrinogênio bovino em diversas concentrações, sendo a fração 09 que apresentou uma melhor atividade, pois com todas as concentrações testadas, quando comparada com as demais frações, a fração 09 induziu o início da coagulação do fibrinogênio em menor tempo.

**Tabela 09.** Atividade desfibrinogenante, *in vivo*, em camundongos, das frações 07, 08 e 09 do veneno amarelo *C. d .ruruima* obtidas por cromatografia fase reversa.

Fração	Atividade desfibrinogenante
07	(--)
08	(--)
09	(+)
Veneno <i>C.d.ruruima</i> (†)	(--)

(--): sangue coagulável, (+): sangue incoagulável após uma hora da sangria dos animais.

† na concentração testada os animais morriam aproximadamente após uma hora da inoculação do veneno. Foram injetados v.i. 4µg de cada amostra em 100 µL de solução salina fisiológica.

De acordo a tabela 09, a atividade desfibrinogenante, *in vivo*, foi somente detectada na fração 09, na dose testada, não sendo detectada a atividade desfibrinogenante nas frações 07 e 08.

**Tabela 10.** Atividade do soro humano sob atividade desfibrinogenante da fração 09 do veneno amarelo de *C. d. ruruima* obtidas por cromatografia fase reversa.

Sistema (Fração / Soro Humano)	Atividade desfibrinogenante
Fração 09	(+)
Fração 09+ soro humano (1 : 05)	(+)
Fração 09+ soro humano (1 : 1)	(+)

(+): sangue incoagulável após uma hora da sangria dos animais

A dose de fração 09 utilizada foi de 4µg. A mistura, veneno + soro humano, após incubada a 37°C foi injetada v.i em camundongos.

Segundo os dados da tabela 10, as concentrações de soro humano utilizado não inibiram a atividade desfibrinogenante *in vivo* da fração 09 do veneno de *C.d.ruruima*.

Durante o processo experimental foram também observadas em camundongos injetados com a fração 09 manifestações como “síndrome da giroxina”, que são movimentos giratórios do corpo ao longo do eixo longitudinal, hiperatividade seguida de perda dos reflexos e opistotonus. Os camundongos injetados com as frações 07 e 08 não apresentaram nenhuma manifestação.

Os camundongos injetados com o veneno bruto de *C. d. ruruima* morreram em aproximadamente uma hora após a injeção; não foram observadas mortes nos camundongos injetados com as frações 07, 08 e 09.

## 5. DISCUSSÃO

A espécie *Crotalus durissus* apresenta uma ampla distribuição no continente americano. A ampla distribuição sugere mudanças morfológicas e fisiomoleculares adaptativas que podem gerar variação intraespecífica nas composições dos venenos com efeitos na clínica e na terapêutica. A composição dos venenos de serpentes é uma mistura complexa de proteínas com função biológica de imobilização / morte das presas, e promover a digestão inicial destas (MEBS, 1999; SARAVIA *et al.*, 2002; DOS-SANTOS *et al.*, 2005).

Venenos de subespécies podem diferir nos seus constituintes, conseqüentemente na sua toxicidade e apresentar variações nas suas atividades biológicas (SALAZAR *et al.* 2006). A diversidade química e das atividades biológicas dos venenos de serpentes são processos evolutivos adaptativos à classe da presa (dieta) e ontogenia da serpente.

Análise do perfil molecular dos venenos individuais de *C. d. ruruima* realizado por SDS – PAGE apresentou principalmente bandas protéicas com massas moleculares de 50, ~30, e 14 kDA. Dos Santos *et al.*(1993) e Muniz (2002) detectaram atividade hemorrágica nos venenos de *C. d. ruruima*. Resultados obtidos por Muniz (2002) sugerem que componentes com massa molecular de ~50 kDA que só foram detectados nos venenos de *C. d. ruruima* com atividade hemorrágica possivelmente estejam relacionados com essa atividade. Dos Santos (1993), utilizando anticorpos policlonais anti-fator hemorrágico do veneno de *Bothrops atrox*, obteve uma reatividade cruzada com a banda de ~ 50 kDA do veneno amarelo de *C. d. ruruima*, sugerindo desta maneira a possibilidade destas proteínas serem fatores hemorrágicos.

Tanto no veneno bruto, quanto nas frações, por métodos eletroforéticos uni e bidimensionais, também detectamos proteínas com massas moleculares de ~ 50 kDA, sugerindo que alguma dessas proteínas sejam fatores hemorrágicos previamente descritos por Dos Santos *et al.* (1983) e Muniz (2002).

O veneno amarelo de *C. d. ruruima*, como observado por Muniz (2002), apresenta várias atividades biológicas *in vitro* e *in vivo* como atividade desfibrinogenante, atividade hemorrágica, atividade miotóxica, atividade proteolítica entre outras.

No gel de eletroforese bidimensional do veneno amarelo de *C. d. ruruima* pode-se observar substâncias proteicas com massas moleculares maiores de 50 kDA com

pI ácido ~ 4 (“spot” 01). L – amino oxidases (LAO) são encontradas em venenos de serpentes (como viperídeos, crotalídeos e elapídeos), são flavoenzimas diméricas (PAWELEK *et al.* 2000) ou monoméricas (ALI *et al.* 2000) e a massa molecular dessas toxinas podem variar de aproximadamente 55 a 66 kDA nas formas monoméricas até aproximadamente 120 a 150 kDA na sua forma nativa, (se apresenta em forma de dímeros) (ALI *et al.* 2000). Geralmente as LAOs apresentam pI de ~ 4.5 com exceção da L – amino oxidase encontrada no veneno de *Naja naja kaouthia* que apresenta um pI de ~ 8,12 (N.-H. TAN *et al.* 2001). A cor amarela dos venenos de serpentes é devido ao cofator FAD das LAOs. Nossos dados sugerem que o “spot” 01 com ~ pI 4 detectado no gel de eletroforese bidimensional do veneno amarelo de *C. d. ruruima* possa ser uma LAO.

Crotamina é um polipeptídeo de 42 resíduos de aminoácidos, possui uma massa molecular de ~ 4,8 kDA e um pI de ~ 10,8. A crotamina apresenta um grau de similaridade com outras crotaminas isoladas de outras serpentes do gênero *Crotalus* que varia de 83 a 98% (OWNBY 1998; OGUIURA *et al.* 2005). Estudos realizados têm mostrado divergências na sua composição, como variação geográfica (OGUIURA *et al. apud* SCHENBERG, 2005), variação na quantidade de crotamina (OGUIURA *et al.* 2000) e variação na sequência de crotamina (TOYAMA *et al.* 2000). O gene da crotamina foi mapeado no cromossomo 2 e a intensidade de sinal contrasta entre dois homólogos. Esse resultado sugere a presença de diferentes números de cópias do gene, podendo explicar a variação da quantidade de crotamina nos venenos individuais de *C. d. terrificus* (OGUIURA *et al.* 2000). Foi detectado em gel de poliacrilamida SDS – PAGE TRIS – TRICINA (figura 15) massas moleculares de ~ 5 kDA no veneno amarelo de *C. d. ruruima* que sugere ser a crotamina. Estudos de Muniz (2002) por espectrometria de massa sistema MALDI – TOF observou que o veneno amarelo de *C. d. ruruima* apresentava espectros similares a venenos crotamina positivo de *C. d. terrificus*, apresentando íons moleculares com m/z de ~5 kDa e formação de multímeros de ~5 kDa com diminuição progressiva da intensidade dos íons, e demonstrou também que nos venenos de *C. d. ruruima* crotamina negativo não foram observados íons moleculares com m/z de ~5 kDa e nem a formação de multímeros de ~5 kDa, sugerindo que a detecção do íon molecular da região da crotamina bem como os mutímeros de 5 kDa estariam relacionados com a concentração de moléculas crotamina – símile.

Estudos recentes têm mostrado o efeito da crotamina em fibras musculares esqueléticas, alterando a permeabilidade destas ao íon sódio, atuando em canais de

sódio. A maior permeabilidade faz com que haja um maior influxo destes íons para o interior da célula, levando a uma despolarização e contração da fibra (CHANG & TSENG, 1978).

Nas amostras dos venenos individuais analisados neste trabalho, foram detectadas bandas proteicas com massas moleculares de ~14 kDA quando analisados por eletroforese unidimensional, massa molecular e similar a fosfolipases A<sub>2</sub> amplamente distribuídos nos venenos de serpentes.

Muniz (2002) induziu diferentes níveis de liberação de creatinofosfoquinase pela inoculação intramuscular do veneno de *C. d. ruruima* sugerindo possíveis variações quantitativas e / ou qualitativas de isoformas da crotoxina. Crotoxina é a proteína mais abundante nos venenos das subespécies de cascavéis brasileiras, sendo uma potente neurotoxina associada com uma potente atividade miotóxica (PONCE – SOTO *et al.* 2007). A crotoxina bloqueia transmissão de sinal nas junções neuromusculares (SANTOS *et al. apud* BON *et al.* 2007). A crotoxina é um complexo heterodimérico composto por duas subunidades: um componente B, básico, de massa molecular 14,2 kDA, apresentando um pI de 8.2 que apresenta atividade fosfolipásica A<sub>2</sub>, e um componente A, ácido, com massa molecular de 9,4 kDA e pI 3.4, conhecida como crotapotina que isolada não apresenta atividade catalítica e não é tóxica (SANTOS *et al.* 2007). No gel de eletroforese bidimensional do veneno amarelo de *C. d. ruruima* observou-se o “spot” 13 com pI ácido de ~3,5 e o “spot” 17 em pI básico de ~8, sugerindo que esses “spots sejam os componentes (A) e (B) da crotoxina respectivamente, necessitando de mais estudos proteômicos e teste de atividades biológicas para confirmação destas possíveis toxinas. A atividade fosfolipase A<sub>2</sub> detectadas no veneno e / ou fração é devida a presença de PLA<sub>2</sub> básica da crotoxina.

Todos os venenos de filhotes de *C. d. ruruima* utilizados nos testes de atividade biológica *in vitro* apresentaram ação coagulante sobre plasma humano e sobre fibrinogênio bovino. Gutiérrez *et al.* (1991) mostrou que venenos de filhotes apresentam grande atividade em plasma humano e fibrinogênio. Muniz (2002) utilizando “pool” de veneno de filhotes de *C. d. ruruima* demonstrou uma maior atividade coagulante sobre plasma humano e sobre fibrinogênio bovino em relação ao “pool” de diversos venenos de adultos de diversas áreas do Estado de Roraima. A maior atividade coagulante dos venenos de filhotes testados mostrou uma variação intraespecífica possivelmente pela variação qualitativa / quantitativa nos venenos de filhotes potencializando sua atividade coagulante.

Mackessy *et al.* (2003) observou um aumento na atividade trombina –símile de *C. o. concolor* conforme a ontogenia da serpente, detectou também uma maior quantidade de serinoproteases nos venenos de serpentes de filhotes quando comparado com venenos de serpentes adultas. A não detecção de atividade proteolítica no zimograma por proteases com massas de ~ 23 kDA do “pool” de veneno amarelo de *C. d. ruruima* sugere uma diferença ontogenética no veneno de *C. d. ruruima*.

Serinoproteases de venenos de serpentes, que realizam a atividade enzimática da trombina formando fibrina I, por proteólise limitada do fibrinogênio sem a ativação de fator XIII, são denominadas trombina – símile (STOKER *et al.* 1982).

Os zimogramas da atividade proteolítica sobre substrato fibrinogênio bovino das frações obtidas por CLAE demonstraram atividade trombina – símile, com proteínas de massas moleculares acima de 23 kDA e inferior a 50 kDA. Determinadas frações do veneno de *C. d. ruruima*, obtidos por processos cromatográficos, apresentaram atividade coagulante sob fibrinogênio bovino e plasma humano e atividade desfibrinogenante quando injetada via i.v em camundongos.

A atividade proteolítica por zimograma dos venenos individuais de filhotes sobre fibrinogênio sugere a presença de enzimas tipo trombina – símile com massas moleculares de ~ 25 a 40 kDA, desta maneira sugere que a atividade coagulante detectada nos venenos seja devido à presença de enzimas do tipo trombina – símile, pois outros tipos de enzimas que induzem a formação de coágulo não têm sido detectadas nos venenos das subespécies encontradas no Brasil pertencentes ao gênero *Crotalus* (MUNIZ 2002).

Dados da literatura indicam uma grande diversidade bioquímica das TSVSs, principalmente referente às suas massas moleculares. TSVSs podem apresentar, por SDS – PAGES, massas moleculares que variam de 25 a 70 kDA, com faixa de pI de, 4,2 a 6,6, apesar de sua estrutura primária indicar massas moleculares de ~ 28 kDA, sugerindo a importância, na variação da massa molecular, de modificações pós – traducionais, como glicosilações, em TSVSs (SILVA-JUNIOR *et al.* 2007).

Isso sugere que a variação na massa molecular dos oligossacarídeos ligados às sequências de aminoácidos das TSVSs detectados nos venenos de *C. d. ruruima*, sejam responsáveis pelas diferentes massas moleculares das proteínas TSVS detectadas por zimograma.

Inibidores clássicos de serinoproteases, PMSF, AEBSF, Aprotina etc., inibem TSVSs. O PMSF tem a capacidade de ligar-se a um aminoácido essencial dessa

classe de proteínas, a serina, do sítio catalítico, provocando uma ligação irreversível e inativando – a, confirmando a função da serinoprotease da enzima (PIRKLE 1998; SANT’ANA 2005). A atividade proteolítica, *in vitro* DMC – P, das frações do veneno de *C. d. ruruima*, foram inibidas por PMSF, EDTA+PMSF e Coquetel de inibidores, incluindo inibidores de serinoproteases, mas essas enzimas não foram inibidas por EDTA, confirmando que a atividade proteolítica coagulante deve-se uma enzima serinoprotease trombina – símile. A não inibição total das frações, 01 e 02, por inibidores de serinoproteases e coquetel de inibidores, em zimograma, sugere que a relação inibidor enzima não foi suficiente para inibir totalmente a atividade proteolítica da enzima, nas condições experimentais realizadas.

A interação da enzima trombina – símile dos venenos de serpentes com o fibrinogênio e com os inibidores plasmáticos pode ser uma interação espécie específica. Enzimas trombina –símeles do veneno de *Trimeresurus flavoviridis* libera fibrinopeptídeo quase que exclusivamente do fibrinogênio de coelho, já batroxobina do veneno de *B. atrox* dificilmente atua sobre fibrinogênio de coelho, porém atua sob o fibrinogênio de rato, humano, bovino, cachorro e ovelha (STOCKER & MEIER, 1988). A enzima trombina – símile de *Agkistrodon condortrix condortirx* quebra as cadeias A $\alpha$  e B $\beta$  do fibrinogênio humano, liberando primeiro o fibrinopeptídeo B e depois o fibrinopeptídeo A, induzindo coágulos de fibrina em plasma humano. Esta enzima atua de forma similar *in vitro* sob fibrinogênio de rato e em plasma de rato não induz coágulo de fibrina, sugerindo interação com os inibidores de proteases do plasma de rato. A atividade desfibrinogenante, *in vivo*, provocada pela fração 09 do veneno amarelo de *C. d. ruruima* não foi inibida pelos inibidores de serinoprotease do plasma humano sugerindo que esta enzima tenha potencial biotecnológico como futuro medicamento trombolítico necessitando de mais estudos proteômicos e de atividades biológicas para confirmar o seu potencial biotecnológico. Portanto relações espécie específica entre fibrinogênio, enzimas trombinas – símeles e os inibidores plasmáticos determinam fortemente as propriedades farmacológicas e potenciais aplicações práticas das enzimas trombinas símeles dos venenos de serpentes. Não foram detectadas atividades desfibrinogenantes, *in vivo*, das frações 07 e 08 obtidas por fase reversa, isto sugere que as frações 07 e 08 sejam variantes de trombina-símile no veneno de *C. d. ruruima*, pois apresentaram atividades sob plasma humano e atividade proteolítica sob fibrinogênio detectado por zimograma, mas que são inibidas por inibidores plasmáticos de serinoproteases do camundongo. O sangue humano apresenta inúmeros inibidores de serinoproteases, ATIII,  $\alpha_2$  – macroglobulina,  $\alpha_1$  – antitripsina (STOCKER 1990). Têm sido

reportadas inibições de TSVSs por  $\alpha_2$  – Macroglobulina, inibidores de caliceínas, heparina, hirudina e inibidores de trombina (STOCKER & MEIER, 1988).

A atividade desfibrinogente, *in vivo*, foi observada na fração 09 do veneno de *C. d. ruruima* obtida por CLAE FR, sinais de giro em torno do próprio eixo longitudinal quando injetado em camundongo. Giroxina é uma glicoproteína isolada por Barrio (1961) do veneno de *C. d. terrificus* que possui massa molecular de aproximadamente 29 kDA (ALEXANDER *et al.* 1988). Injeções via i.v. em camundongos podem produzir “síndrome da giroxina” com movimentos giratórios do corpo ao longo do eixo longitudinal, hiperatividade seguida de perda dos reflexos e opistotonus. Alexander *et al.* (1988) purificaram uma enzima trombina – símile semelhante à obtida por Raw *et al.* (1986), e observaram que esta proteína apresentava o mesmo efeito daqueles verificados por Barrio (1961) para a giroxina. Observaram também que a proteína purificada do veneno de *C. d. terrificus* apresentava atividades trombina – símile e da giroxina. A atividade giroxina também foi observada em mais duas trombinas – símiles purificadas dos venenos de *Crotalus adamanteus* e *Crotalus durissus durissus* (MUNIZ, 2002). Os camundongos injetados com as frações 07 e 08 não apresentaram nenhuma manifestação, sugerindo que a fração 09 do veneno amarelo de *C. d. ruruima* apresenta atividade giroxina provocando, também, atividade desfibrinogente *in vivo*.

Torrent e colaboradores (2007) avaliaram que injetando 1,5 – 4  $\mu$ g veneno total de *C. d. terrificus* via i.v. em camundongo, pode – se observar comportamentos giratórios, entretanto quando isolada a fração trombina – símile (fração que deve corresponder a giroxina) e injetada via i.v em camundongos em diversas concentrações de 1.5 – 10  $\mu$ g observa-se estados transitórios de opistotonus, porém não foi observada movimentos rotatórios em torno do eixo axial do animal (TORRENT *et al. apud.* STOCKER 2007).

TSVSs dos venenos de serpentes são ferramentas interessantes para investigar o complexo mecanismo de agregação plaquetária. Algumas TSVSs induzem agregação plaquetária na presença de fibrinogênio exógeno com menos eficiência que a trombina, liberando ADP. Agregação plaquetária é um processo que precisa de plaquetas metabolicamente ativas. Agregação plaquetária induzida por ADP tem função principal no desenvolvimento e extensão da trombose arterial. Algumas TSVSs não necessitam de fibrinogênio para promover agregação plaquetária como PA-BJ isolada do veneno de *Bothrops jararaca*. Inibidores específicos de ADP são utilizados como

antitrombóticos (GACHET *et al.* 1997). Não foi avaliada a agregação plaquetária das frações com atividade coagulante do veneno de *C. d. ruruima*.

Diversas enzimas, incluindo algumas TSVSs, degradam cininogênio e liberam cinina provocando um efeito hipotensivo. Curiosamente elegaxobin II, uma TSVSs isolado do veneno de *Trimeresurus elegans*, é a única TSVSs citada, atualmente, capaz de liberar Lis – bradiginina. Não foi avaliada a atividade da liberação de bradiginina das frações com atividade coagulante do veneno de *C. d. ruruima*.

TSVSs, excluindo algumas exceções, não ativam fator XIII da cascata de coagulação. Fator XIII é um importante zimogênio ativado pela trombina, atua como estabilizador de coágulo, fazendo com que seja facilmente degradado pela plasmina, o fator XIII não reconhece os polímeros anormais de fibrina formados pela TSVSs. Os coágulos de fibrina I (coágulo fraco) gerados pela trombina – símile, dispersados na forma de micro coágulos, são rapidamente degradados pela atividade proteolítica da plasmina, uma serinoprotease que degrada a malha de fibrina. TSVSs que induzem a formação de fibrina I podem ter aplicação clínica como droga trombolítica. Frações coagulantes do veneno de *C. d. ruruima* sugerem que induzem a formação de fibrina I, com potencial de futura aplicação clínica como droga trombolítica.

Em resumo o veneno de *C. d. ruruima* apresenta serinoproteases com atividade trombina – símile *in vitro* e atividade desfibrinogenante, *in vivo*, quando avaliada em camundongo e, nos testes realizados, essas enzimas não foram inibidas por inibidores do plasma humano. Essas trombinas – símiles sugerem ter um potencial biotecnológico como futuras drogas trombolíticas. Utilizando, assim, de forma racional, a biodiversidade da Amazônia para o bem-estar da sociedade.

## 6. CONCLUSÕES

Neste trabalho apresentamos o estudo de Proteômica e Potencial da Atividade Trombolítica da Propriedade Desfibrinogenante, *in vivo*, do Veneno da Serpente Amazônica *Crotalus durissus ruruima* (Houge 1965).

Métodos de eletroforese, uni e bidimensionais, do veneno de *C. d. ruruima* apresentam constituintes proteicos principalmente com massas moleculares entre ~ 05 a 50 kDA.

Testes *in vitro* mostraram a variação na atividade coagulante do veneno de *C. d. ruruima* sob fibrinogênio bovino e plasma humano.

Análises individuais dos venenos de filhotes de *C. d. ruruima*, por zimograma, mostraram proteínas com massas moleculares de ~ 23 a 40 kDA, que degradam fibrinogênio bovino e gelatina.

Utilizando técnicas cromatográficas, de filtração molecular e fase reversa, foi possível obter frações do veneno de *C. d. ruruima* que, *in vitro*, degradam fibrinogênio bovino.

A atividade proteolítica sob fibrinogênio bovino foi inibida só por PMSF, sugerindo que a enzima coagulante é uma protease da classe trombina – similar.

As frações 07 e 08 obtidas por CLAE – FR apresentaram atividade coagulante, *in vitro*, sob fibrinogênio e plasma humano, mas não apresentou atividade desfibrinogenante, *in vivo*, avaliada em camundongo.

Foi detectada atividade desfibrinogenante, *in vivo*, em camundongo da fração 09 obtida por CLAE – FR. A atividade desfibrinogenante não foi inibida por soro humano nas concentrações testadas. A fração sugere ser enzima trombina – similar com potencial biotecnológico como trombolítico.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUIAR, A.S., ALVES, C.R., MELGAREJO, A., GIOVANNI-DE-SIMONE, S., 1996. Purification and partial characterization of a thrombin-like/gyroxin enzyme from bushmaster (*Lachesis muta rhombeata*) venom. *Toxicon* 34, 555–565.

ALEXANDER, G; GRUTHUSEN, J; ZEPEDA, H. & SCHWRTZON, R.J. 1988 Gyroxin, a toxin from the venom of *Crotalus durissus terrificus*, is a thrombin-like enzyme. *Toxicon*. 26: 953-960.

ALI, S. A., STOEVA, S., ABBASI, A., ALAM, J. M., KAYED, R., FAIGLE, M., NEUMEISTER, B., VOELTER, W., 2000. Isolation, structural, and functional characterization of an apoptosis-inducing L-amino acid oxidase from leaf-nosed viper (*Eristocophis macmohoni*) snake venom. *Arch. Biochem. Biophys.* 384, 216–226.

AMARAL, C. F. S; MAGALHÃES, R. A.; REZENDE, N. A. 1991. Comprometimento respiratório secundário a acidentes ofídicos crotálicos (*Crotalus durissus*) *Rev. Inst. Trop. São Paulo*, 33 251-255.

AMICONI, G., AMORESANO, A., BOUMIS, G., BRANCACCIO, A., DE CRISTOFARO, R., DE PASCALIS, A., DI GIROLAMO, S., MARAS, B., SCALONI, A., 2000. A novel venombin B from *Agkistrodon contortrix contortrix*: evidence for recognition properties in the surface around the primary specificity pocket different from thrombin. *Biochemistry* 39, 10294–10308.

ANTOSK. F. S., MURAKAMI M. T., A. CINTRA C. O., TOYAMA M. H., MARANGONI S., FORRER V. P., NETO J. R. B., POLIKARPOV I., ARNI R. K. 2007. Crystallization and preliminary X-ray crystallographic analysis of the heterodimeric crotoxin complex and the isolated subunits crotapotin and phospholipase A2. *Acta Cryst.* 63:287–290.

BAEK, S., KWON, T. K., LIM, J., LEE, Y., CHANG, H., LEE, S., KIM, J., KWUN, K. 2000. Secretory Phospholipase A<sub>2</sub>-Potentiated Inducible Nitric Oxide Synthase Expression by Macrophages Requires NF- $\kappa$ B Activation *J. Immunol.* 164, 6359–6365.

Barrio, A., 1961. Gyroxin, a new neurotoxin of *Crotalus durissus terrificus* venom. *Acta Physiol. Latinoamer.* 11, 22.

BON C., HANGEUXJ.-P. C, JENG T.-W., FRAENKEL-CONRAT H. 1979. Postsynaptic Effects of Crotoxin and of Its Isolated Subunits. *Eur. J. Biochem.* 99, 471-481.

BOON, G. D. 1993. An overview of hemostasis. *Toxicol. Pathol.* v. 21(2), p.170-179,

BRADFORD M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.

BRASIL, 1999. Manual de diagnóstico e Tratamento de Acidentes por Animais Peçonhentos. Ministério da Saúde. 131.

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

CARDOSO, D. F. & MOTA, I. 1997. Effect of *Crotalus* venom on the humoral and cellular immune response. *Toxicon*, 35 607-612.

CASTRO, H.C., SILVA, D.M., CRAIK, C., ZINGALI, R.B., 2001. Structural features of a snake venom thrombin-like enzyme: thrombin and trypsin on a single catalytic platform?. *Biochim. Biophys. Acta.*1547, 183–195.

\_\_\_\_\_ ; ZINGALI, R.B.; ALBUQUERQUE, M.G.; PJOL-LUZ, M.; RODRIGUES, C.R.. 2004. Snake venom thrombin-like enzymes: from reptilase to now. *CMLS.* V. 61, p. 843-856

CASTRO, I. O MUNDO DA SAÚDE São Paulo: 2006: out/dez 30 (4): 644-653.

CHANG M. C. & HUANG T.F. 1995. Characterization of a thrombin-like enzyme, grambin, from the venom of *Trimeresurus gramineus* and its *in vivo* antithrombotic effect. *Toxicon*, 33: 1087-1098.

CORIN, R. E., VISKATIS, L. J., VIDAL, J. C., ETCHEVERRY, M. A. 1993. Cytotoxicity of CrTX on murine erythroleukemia cells *in vitro*. *Invest. New Drugs* 11 11–15.

CURA, J. E., BLANZACO, D. P., BRISSON, C., CURA, M. A., CABROL, R., LARRATEGUY, L., MENDEZ, C., MENDEZ, C., SECHI, J. C., SIVEIRA, J. S., THEILLER, E., DE ROODT, A. R., VIDAL, J. C. 2002. Phase I and pharmacokinetics study of Cro (cytotoxin PLA<sub>2</sub>, NSC-624244) in patient with advanced cancer. *Clin Cancer Res* 8: 1033-1041.

DICERA E., DANG Q. D. Y., AYALA M. 1997. Molecular mechanisms of thrombin function. (CMLS) 53 701-730.

\_\_\_\_\_, DANG Q. D., AYALA Y. M. 1997. Molecular mechanisms of thrombin function. *Cell. Mol. Life Sci.* 53:701–730.

DOS-SANTOS M. C, FERREIRA L. C. L., DIAS DA SILVA W., FURTADO M. F. D. 1993. Caracterizacion de las actividades biologicas de los venenos ‘amarillo’ y ‘blanco’ de *Crotalus durissus ruruima* comparados con el veneno de *Crotalus durissus terrificus*. Poder neutralizante de los antivenenos frente a los venenos de *Crotalus durissus ruruima*. *Toxicon* 31; 1459-1469.

\_\_\_\_\_, ASSIS E. B., MOREIRA T. D., PINHEIRO J., FORTES-DIAS C. L. 2005. Individual venom variability in *Crotalus durissus ruruima* snakes, a subspecies of *Crotalus durissus* from the Amazonian region. *Toxicon* 46: 958-961.

EARPS L., SHOOLINGIN-JORDAN P.M. 1998. Molecular modelling of batroxobin on kallikreins. *Biochem Soc Trans.* 26: 283.

ESMON, C.T., OWEN, W.G., 1981. Identification of an endothelial cell cofactor for thrombin-catalyzed activation of protein C. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 78, 2249–2252.

FAURE, G., VILLELA, C., PERALES, J., BON, C. 2000. Interaction of the neurotoxic and nontoxic secretory phospholipases A<sub>2</sub> with the crotoxin inhibitor from *Crotalus* serum. *Eur. J. Biochem.* 267, 4799–4808.

FRANÇA, F.O.S.; MÁLAQUE, C.M.S. , 2003. Acidente Botrópico. In: *Animais Peçonhentos no Brasil: Biologia, Clínica e Terapêutica dos acidentes.* 72-86.

FUSTER-LLUCH O., GALINDO M.F., CEÑA V., JORDÁN J. 2004. Las serina proteasas y su función en los procesos de muerte neuronal. *Rev neurol* 38:449-457.

GELB, M. H., JAIN, M. K., HANEL, A. M. & BERG, O. G. 1995. Interfacial Enzymology of Glycerolipid Hydrolases: Lessons from Secreted Phospholipases A<sub>2</sub>. *Annu. Rev. Biochem.* 64: 653–688.

GENÉ J. A., ROY G, GUTIÉRREZ J. M., CERDAS L. 1989. Comparative study on coagulant, defibrinating, fibrinolytic and fibrinogenolytic activities of Costa Rican snake venoms and their neutralization by polyvalent antivenom. *Toxicon* 27: 841–848.

Gornitskaia, O.V, Platonova T.N, Volkov G.L. 2003. Enzymes of snake venoms. *Ukr Biokhim Zh;* 75:22–32.

GUTIÉRREZ, J. M. DOS SANTOS M. C., FURTADO M. F., ROJAS G. 1991. Biochemical and pharmacological similarities between the venoms of newborn *Crotalus durissus durissus* and adult *Crotalus durissus terrificus* rattlesnakes *Toxicon* 29: 1273-1277.

Heise, P.J. Maxson. L.R., Dowling, H.G, Hedges, S.B. 1995. Higher-level snake phylogeny inferred from mitochondrial DNA sequences of 12S rRNA genes. *Mol Biol Evol* 12:259–65.

HENSCHEN-EDMAN, A.H., THEODOR, I., EDWARDS, B.F., PIRKLE, H., 1999. Crotalase, a fibrinogen-clotting snake venom enzyme: primary structure and evidence for a fibrinogen recognition exosite different from thrombin. *Thromb. Haemost.* 81, 81–86.

HOGUE, A.R. 1965, Preliminary account on neotropical Crotalinae (Serpentes Viperidae) Mem. Inst Butantan, 32 109-184.

HUANG, Q.Q., TENG, M.K., NIU, L.W., 1999. Purification and characterization of two fibrinogen-clotting enzymes from five-pace snake (*Agkistrodon acutus*) venom. *Toxicon* 37,999–1013.

ISETTI G. & MAURER M. C. 2004. Thrombin activity is unaltered by N-terminal truncation of factor XIII activation peptides. *Biochemistry*, 43, 4150 -4159.

ITOH N, TANAKA N, MIHASHI S, YAMASHINA I. 1988 Molecular cloning and sequence analysis of cDNA for batroxobin, a thrombin-like snake venom enzyme. *J Biol Chem*; 262: 3132–5.

JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO, I.L., HO, P.L., 2002. A survey of gene expression and diversity in the venom glands of the pitviper snake *Bothrops insularis* through the generation of expressed sequence tags (ESTs). *Gene* 299, 279–291.

KARALLIEDDE, I. 1995. Animal Toxin. *Br. J. Anaesth.* 74: 319 – 327.

KINI, R.M., 1997. Phospholipase A2—a complex multifunctional protein puzzle, in: Kini, R.M. (Ed.), *Venom Phospholipase A2 Enzymes: Structure, Function and Mechanism*. Wiley, England, pp. 1–28.

KIRBY, E.P., NIEWIAROWSKI, S., STOCKER, K., KETTNER, C., SHAW, E., BRUDZYNSKI, T.M., 1979. Thrombocytin, a serine protease from *Bothrops atrox* venom 1. Purification and characterization of the enzyme. *Biochemistry* 18, 3564–3570.

KISIEL, W., KONDO, S., SMITH, K.J., MCMULLEN, B.A., SMITH, L.F., 1987. Characterization of a protein C activator from *Agkistrodon contortrix contortrix* venom. J. Biol. Chem. 262, 12607–12613.

KOCHVA, E. 1987. The origin of snake and evolution of the venom apparatus. Toxicon 25 (1): 65-106.

KOH, Y.S., CHUNG, K.H., KIM, D.S., 2001. Biochemical characterization of a thrombin-like enzyme and a fibrinolyticserine protease from snake (*Agkistrodon saxatilis*) venom. Toxicon 39, 555–560.

KREM M. M. & DI CERA E. 2001. Molecular markers of serineprotease evolution. EMBO J. 20: 3036–3045.

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

LIMA D. C., ABREU P. A., DE FREITAS C. C., D. O. SANTOS, BORGES R. O., DOS SANTOS T. C., CABRAL L. M., RODRIGUES C. R., CASTRO H. C. 2005. Snake Venom: Any Clue for Antibiotics and CAM? Evid. Based Complement. Altern. Med. 2: 39-47.

LÓPEZ – LOZANO, J. L. 2002. Venenos de serpentes da Amazônia-Propriedades e Relações Moleculares fisiológicas e taxonômicas. Tese de Doutorado em Biologia Molecular. Universidade de Brasília. Brasília.

MAGALHÃES H. P. B., AGALHÃESA M, JULIANO L., NELSON D. L., ROGANA E. 2006. Mechanism of action and determination of the best substrate for a thrombin-like enzyme from *Lachesis muta muta* venom by regression analysis of the kinetic parameters determined with peptidyl *p*-nitroanilide substrates Toxicon 47: 453-458.

MARKLAND JR., F.S., 1998. Snake venoms and the hemostatic system. Toxicon 36, 1749–1800.

MAROUN, R.C., 2001. Molecular basis for the partition of the essential functions of thrombin among snake venom serineproteinases: the case of thrombin-like enzymes. *Haemostasis*31, 247–256.

MARSH, N.; WILLIAMS, V. , 2005. Pratical applications of snake venom toxins in haemostasis. *Toxicon. In press.* p. 1-11.

MATSUI, T., SAKURAI, Y., FUJIMURA, Y., HAYASHI, I., OH-ISHI, S.,SUZUKI, M., HAMAKO, J., YAMAMOTO, Y., YAMAZAKI, J., KINOSHITA, M., TITANI, K., 1998. Purification and amino acid sequence of halystase from snake venom of *Agkistrodon halys blomhoffii*, a serine protease that cleaves specifically fibrinogenand kininogen. *Eur. J. Biochem.* 252, 569–575.

\_\_\_\_\_; FUJIMURA, Y. TITANI, K. 2000. Snake venom proteases affecting hemostasis and thrombosis. *BBA*, v. 1477, p.146-156.

MEBS, D., 1999. Snake venom composition and evolution of Viperidae. *Kaupla* 8, 145–148.

MELGAREJO, A.R., 2003. Serpentes Peçonhentas do Brasil. In: *Animais Peçonhentos no Brasil: Biologia, Clínica e Terapêutica dos acidentes.* p. 33-59.

MUNIZ, E. G. 2002. Veneno de *Crotalus durissus ruruima* Propriedades moleculares, farmacológicas e imunológicas. Dissertação de Mestrado em Patologia Tropical. Universidade Federal do Amazonas, Amazonas.

MURAKAMI, M. T. & ARNI, R. K. (2003). A structure based model for liposome disruption and the role of catalytic activity in myotoxic phospholipase A<sub>2</sub>s. *Toxicon* 42: 903–913.

NARAYANAN, S.; HAMASAKI, N. 1998. Current concepts of coagulation and fibrinolysis. *Adv. Clin. Chem.* v. 33, p.133-68.

NEWMAN, R. A., VIDAL, J. C., VISKATIS, L. J., JOHNSON, J., ETCHEVERRY, M. A. 1993. VRCTC-310—a novel compound of purified animal toxins separates anti-tumor efficacy from neurotoxicity.. *Invest. New Drugs* 11 (2–3), 151–159.

NIEWIAROWSKI, S., KIRBY, E.P., BRUDZYNSKI, T.M., STOCKER, K., 1977. Thrombocytin, a serine protease from *Bothrops atrox* venom 2. Interaction with platelets and plasma-clotting factors. *Biochemistry* 18, 3570–3577.

NIKAI T, OHARA A, KOMORI Y, FOX JW, SUGIHARA H. 1995. Primary structure of a coagulant enzyme, bilineobin, from *Agkistrodon bilineatus* venom. *Arch Biochem Biophys*; 318: 89–96.

NUSTAD K, ORSTAVIK T.B., GAUTVIK K.M., PIERCE J.V. 1978. Glandular kallikreins. *Gen Pharmacol.* 9: 1-9.

OGUIURA N., BONI-MITAKE M., RÁDIS-BAPTISTA G. 2005. New view on crotamine, a small basic polypeptide myotoxin from South American rattlesnake venom. *Toxicon* 46: 363-370

\_\_\_\_\_, CAMARGO M. E., DA SILVA A. R. P., HORTON D. S. P. Q. 2000. Quantification of crotamine, a small basic myotoxin, in South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*) venom by enzyme-linked immunosorbent assay with parallel-lines analysis. *Toxicon* 38: 443-448.

OLDRA, M. B. 2003. Abordagem fisioterapêutica no tratamento e na prevenção das hemartroses em hemofílicos: Revisão sistemática. Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Universidade Estadual do Oeste do Paraná. Paraná.

OWNBY, C.L. 1998. Structure, function and biophysical aspects of the myotoxins from snake venoms. *J. Toxicol: Toxin Rev.* 17, 213-238.

PARRY, M.A., JACOB, U., HUBER, R., WISNER, A., BON, C., BODE, W., 1998. The crystal structure of the novel snake venom plasminogen activator TSV-PA: a prototype structure for snake venom serine proteinases. *Structure* 6, 1195–1206.

PASSERO L. F. D., TOMOKANE T. Y., CORBETT C. E. P., LAURENTI M. D., TOYAMA M. H.. 2007. Comparative studies of the anti-leishmanial activity of three *Crotalus durissus* ssp. venoms. *Parasitol Res.* 101:1365–1371.

PAWELEK, P., CHEAH, J., COULOMBE, R., MACHEROUX, P., GHISLA, S., VRIELINK, A. 2000. The structure of l-amino-acid oxidase reveals the substrate trajectory into an enantiomerically conserved active site. *EMBO J.* 19: 4204 – 4215.

PIRKLE H. 1998. Thrombin-like Enzymes from Snake Venoms: An Updated Inventory. *Thromb Haemost* 79: 675–83.

PONCE-SOTO L. A., LOMONTE B., RODRIGUES-SIMIONI L., NOVELLO J.C., MARANGONI S. 2007. Biological and Structural Characterization of Crotoxin and New Isoform of Crotoxin B PLA<sub>2</sub> (F6a) from *Crotalus durissus collilineatus* Snake Venom. *Protein J* 26: 221-230.

RANGEL-SANTOS, A., DOS-SANTOS, E. C., LOPES-FERREIRA, M., LIMA, C., CARDOSO, D. F.,MOTA, I. 2004. A comparative study of biological activities of crotoxin and CB fraction of venoms from *Crotalus durissus terrificus*, *Crotalus durissus cascavella* and *Crotalus durissus collilineatus*. *Toxicon*, 43, 801–810.

\_\_\_\_\_, LIMA, C., LOPES-FERREIRA, M., CARDOSO, D. F. 2004. Immunosuppressive role of principal toxin (crotoxin) of *Crotalus durissus terrificus* venom. *Toxicon*, 44, 609–616.

RAW, I., ROCHA, M.C; ESTEVES, M.I. & KAMIGUTI, A.S. 1986. Isolation and characterization of a thrombin like enzyme from the venom of *Crotalus durissus terrificus*. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 19: 333-338.

ROSING J., GOVERS-RIEMSLAG J. W., YUKELSON L. TANS G. 2001. Factor V activation and inactivation by venom proteases. *Haemostasis* 31: 241–246

RUDD, C.J., VISKATIS, L.J., VIDAL, J.C., ETCHEVERRY, M.A., 1994. In vitro comparison of cytotoxic effects of Cro against three human tumors and normal human epidermal keratinocyte cell line. *Invest New Drugs* 12: 183-184.

SALAZAR, A. M., RODRIGUEZ-ACOSTA, A., GIRO N., AGUILAR M. E I., GUERRERO, B., 2006. A comparative analysis of the clotting and fibrinolytic activities of the mapanare (*Bothrops atrox*) snake venom from different geographical areas in Venezuela. *Thromb. Res.*, in press

SAMPAIO, S. C., SANTOS, M. F., COSTA, E. P., RANGEL-SANTOS, A. C., CARNEIRO, S.M., CURI, R., CURY, Y. 2006. Lipxygenase-derived eicosanoids are involved in the inhibitory effect of *Crotalus durissus terrificus* venom or crotoxin on rat macrophage phagocytosis. *Toxicon* 47, 313-321.

SAMY R P., PACHIAPPAN A., GOPALAKRISHNAKONE P., THWIN M. M., HIAN Y. E., CHOW V. TK. , BOW H., WENG J. T. 2006. In vitro antimicrobial activity of natural toxins and animal venoms tested against *Burkholderia pseudomallei* *BMC Infectious Diseases* 6:100 1-16.

SANT'ANA C. D. 2005. Caracterização funcional e estrutural de uma nova serinoprotease do veneno de *Bothrops jararacussu*. Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Toxicologia. Universidade de são paulo Ribeirão Preto.

\_\_\_\_\_, TICLI F. K., OLIVEIRA L. L., GIGLIO J. R., RECHIA C. G. V., FULY A. L., SELISTRE DE ARAÚJO H. S., FRANCO J. J., STABELI R. G., SOARES A. M., SAMPAIO S. V. 2007. BjussuSP-I: A new thrombin-like enzyme isolated from *Bothrops jararacussu* snake venom. *CBP in press*: 01-12.

SANTOS, B.F., SERRANO, S.M., KULIOPULOS, A., NIEWIAROWSKI, S., 2000. Interaction of viper venom serine peptidases with thrombin receptors on human platelets. *FEBS Lett.* 477, 199–202.

SARAVIA, P., ROJAS, E., ARCE, V., GUEVARA, C., LOPEZ, J.C., CHAVES, E., VELASQUEZ, R., ROJAS, G., GUTIERREZ, J.M., 2002. Geographic and ontogenic

variability in the venom of the Neotropical rattlesnake *Crotalus durissus*: pathophysiological and therapeutic implications. *Rev. Biol. Trop.* 50: 337–346.

SCHMAIER, A.H., COLMAN, R.W., 1980. Crotalocytin: characterization of the timber rattlesnake platelet activating protein. *Blood* 56, 1020–1028.

SEGRS K., ROSING J., NICOLAEG. A.F. S. 2006. Structural models of the snake venom factor V activators from *Daboia russelli* and *Daboia lebetina*. *Proteins* 64: 4968 – 984.

SERRANO, S. M. T. & MAROUN R. C 2005, Snake venom serine proteinases: sequence homology vs. substrate specificity, a paradox to be solved. *Toxicon* 45 8: 1115-1132.

\_\_\_\_\_, MATOS, M.F., MANDELBAUM, F.R., SAMPAIO, C.A., 1993. Basic proteinases from *Bothrops moojeni* (caissaca) venom-I Isolation and activity of two serine proteinases, MSP 1 and MSP 2, on synthetic substrates and on platelet aggregation. *Toxicon* 31, 471–481.

SILVA-JUNIOR F. P., GUEDES H. L.M., GARVEY L. C., AGUIAR A. S., BOURGUIGNON S. C., DI CERA E., GIOVANNI-DE-SIMONE S. 2007. BJ-48, a novel thrombin-like enzyme from the *Bothrops jararacussu* venom with high selectivity for Arg over Lys in P1: Role of N-glycosylation in thermostability and active site accessibility. *Toxicon* 50, 18-31

\_\_\_\_\_, GUEDES H. L.M., LAURA C. ANIESSE G., AGUIAR S., BOURGUIGNON S. C., DI CERA E., GIOVANNI-DE-SIMONE S. 2007. BJ-48, a novel thrombin-like enzyme from the *Bothrops jararacussu* venom with high selectivity for Arg over Lys in P1: Role of N-glycosylation in thermostability and active site accessibility *Toxicon*. 50: 18-31.

STOCKER, K. (1990b) Snake venom protein affecting hemostasis and Fibrinolysis. In *Medical Use of Snake Venom Proteins*, ed. K. F. Stocker, pp. 97±160. CRC Press, Boca Raton.

\_\_\_\_\_, FISCHER, H., MEIER, J., 1982. Thrombin-like snake venom proteinases. *Toxicon* 20, 265–273.

STUBBS, M.T., BODE, W., 1993. A player of many parts: the spotlight falls on thrombin structure. *Thromb. Res.* 69, 1–58.

TAKATSUKA, H., SAKURAI, Y., YOSHIOKA, A., KOKUBO, T., USAMI, Y., SUZUKI, M., MATSUI, T., TITANI, K., YAGI, HIDEO, MATSUMOTO, M., FUJIMURA, Y., 2001a. Molecular characterization of L-amino acid oxidase from *Agkistrodon halys blomhoši* with special reference to platelet aggregation. *Biochim. Biophys. Acta* 1544, 267–277.

\_\_\_\_\_, SAKURAI, Y., YOSHIOKA, A., KOKUBO, T., USAMI, Y., SUZUKI, M., MATSUI, T., TITANI, K., YAGI, H., MATSUMOTO, M., FUJIMURA, Y., 2001b. Molecular characterization of L-amino acid oxidase from *Agkistrodon halys blomhoffii* with special reference to platelet aggregation. *Biochim. Biophys. Acta* 1544 (1–2), 267–277.

THEAKSTON, R. D. G; & REID, H. A. 1983. The development of simple standard assay procedures for the characterization of snake venoms. *Bull WHO* 61: 949 – 956.

TOKUNAGA, F., NAGASAWA, K., TAMURA, S., MIYATA, T., IWANAGA, S., KISIEL, W., 1988. The factor V-activating enzyme (RVV-V) from Russell's viper venom Identification of isoproteins RVV-V alpha, -V beta, and -V gamma and their complete amino acid sequences. *J. Biol. Chem.* 263, 17471–17481.

TORRENT R. M. R., BONGIOVANNI B., LEIVA L. C., DUFFARD, A. M. E., RODRIGUEZ J. P., PEREZ O. C. A., DUFFARD R.. 2007. Neurotoxicological effects of a thrombin-like enzyme isolated from *Crotalus durissus terrificus* venom (preliminary study) *Toxicon* 50: 144–152.

TOYAMA M. H., CARNEIRO E. M., MARANGONI S., BARBOSA R. L., G. CORSO., BOSCHERO A. C. 2000. Biochemical characterization of two crotamine isoforms isolated by a single step RP-HPLC from *Crotalus durissus terrificus* (South American rattlesnake) venom and their action on insulin secretion by pancreatic islets *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)* 1474, 1, 56-60.

\_\_\_\_\_, TOYAMA D. D. O., PASSERO L. F. D., LAURENTI M. D., CORBETT C. E., TOMOKANE T. Y., FONSECA F. V, ANTUNES E., JOAZEIRO P. P., BERIAM L. O. S., MARTINS M. A. C., MONTEIRO H. S. A., FONTELES M. C. 2006. Isolation of a new L-amino acid oxidase from *Crotalus durissus cascavella* venom. *Toxicon* 47: 47-57.

VADAS, P., BROWNING, J., EDELSON, J., PRUZANSKI, W. 1993. Extracellular phospholipase A2 expression and inflammation: the relationship with associated disease states. *J. Lipid Mediat.* 8,1-30.

WANG, Y.M., WANG, S.R., TSAI, I.H., 2001. Serine protease isoforms of *Deinagkistrodon acutus* venom: cloning, sequencing and phylogenetic analysis. *Biochem. J.* 354, 161-168.

YONG-HONG, J. I. A.; YANG, J.I. N.; QIU-MIN, L.; SHENG, D. L. I.; WAN-YU, W.; YU-LIANG, X. 2003. Jerdonase, a novel serine protease with kini-realising and fibrinolytic activity from *Trimeresurus jerdonii* venom. *Acta. Biochim. Biophys. Sinica.* v. 35(8), p. 689-694.

ZHANG S., MA B., SAKAI J., SHIONO H., MATSUI T., SUGIE I. 2001. Characterization of a thrombin-like serine protease, Kangshuanmei, isolated from the venom of a Chinese snake, *Agkistrodon halys brevicaudus stejnegeri*. *J. Nat. Toxins* 10:221-238.

ZHANG Y. L., HERVIO L., STRANDBERG L. MADISON E. L. 1999. Distinct contributions of residue 192 to the specificity of coagulation and fibrinolytic serine proteases. *J. Biol.Chem.* 274: 7153-7156.

ZHANG, H. L., HAN, R., CHEN, Z. X., CHEN, B. W., GU, Z. L., REID, P. F., RAYMOND, L. N. & OIN, Z. H. 2006. Oplate and acetylcholine-independent analgesic actions of crotoxin isolated from *Crotalus durissus terrificus* venom. *Toxicon* 48: 175-182.