

Instituto Oswaldo Cruz  
Mestrado em Biologia Celular e Molecular

PO41, uma anti-hemorragina presente no soro  
de *Philander opossum*: isolamento, caracterização e  
interação com metaloproteases isoladas do veneno  
de *Bothrops jararaca*

Patrícia Barbosa Jurgilas

Rio de Janeiro  
Setembro de 2000

Ministério da Saúde  
Fundação Oswaldo Cruz  
Instituto Oswaldo Cruz  
Curso de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular

PO41, uma anti-hemorragina presente no soro  
de *Philander opossum*: isolamento, caracterização e  
interação com metaloproteases isoladas do veneno  
de *Bothrops jararaca*

Tese submetida ao curso  
de Pós-graduação em  
Biologia Celular e Molecular  
da Fundação Oswaldo Cruz,  
visando a obtenção do grau  
de Mestre em Ciências.

Rio de Janeiro  
Setembro de 2000

Fundação Oswaldo Cruz  
Instituto Oswaldo Cruz

PO41, uma anti-hemorragina presente no soro  
de *Philander opossum*: isolamento, caracterização e  
interação com metaloproteases isoladas do veneno  
de *Bothrops jararaca*

Orientadores: Dr. Jonas Perales  
Dr. Gilberto Domont

**Patrícia Barbosa Jurgilas**

Rio de Janeiro  
Setembro de 2000

## Ministério da Saúde

Jurgilas, P.B.

PO41, uma anti-hemorragina presente no soro de *Philander opossum*: isolamento, caracterização e interação com metaloproteases isoladas do veneno de *Bothrops jararaca*.

Rio de Janeiro, FIOCRUZ, Departamento de Fisiologia de Farmacodinâmica, 2000.

Tese: Mestrado em Ciências (Biologia Celular e Molecular)

1. Resistência natural; 2. Veneno de *Bothrops jararaca*; 3. Metaloproteases.

I. Instituto Oswaldo Cruz

II. Título

Fundação Oswaldo Cruz  
Instituto Oswaldo Cruz

PO41, uma anti-hemorragina presente no soro  
de *Philander opossum*: isolamento, caracterização e  
interação com metaloproteases isoladas do veneno  
de *Bothrops jararaca*

Patrícia Barbosa Jurgilas  
Orientador: Dr. Jonas Perales

Banca Examinadora:

Dra. Patrícia Machado Rodrigues da Silva Martins- Lab. Inflamação - DFF/IOC  
- FIOCRUZ.

Dr. Paulo Melo - Dept. Farmacologia Básica e Clínica- ICB/CCS- UFRJ.

Dr. Salvatore Giovanni De Simone - Lab. de Microseqüenciamento-  
DBBM/IOC- FIOCRUZ.

Suplentes:

Dra. Marcia Coronha Ramos Lima- Lab. Inflamação- DFF/IOC- FIOCRUZ.

Dr. Gilberto Barbosa Domont - Lab. Bioquímica de Proteínas - IQ /CT-UFRJ.

Rio de Janeiro  
Setembro 2000

À minha família, pelo exemplo de amor e respeito,  
os quais me proporcionam força para lutar pelos meus  
objetivos.

## AGRADECIMENTOS

Eterno agradecimento ao Dr. Haity Moussatché (*In memoriam*) pela oportunidade de ingressar no laboratório de Toxinologia e principalmente puder compartilhar do seu exemplo de amor e dedicação a ciência.

Ao meu orientador Dr. Jonas Perales pela confiança, incentivo, ensinamentos e apoio sempre.

Ao meu co-orientador Dr. Gilberto Domont, que foi indispensável para a realização desta tese, com suas brilhantes idéias, sugestões e soluções.

A minha co-orientadora Ana Gisele da Costa Neves-Ferreira, revisora em todas as etapas desta tese, que além de uma excelente profissional, é uma amiga.

À Dra. Belsy Guerrero Guerrero pelo exemplo profissional, pela amizade e principalmente pela confiança.

À Dra. Patrícia Martins pelas excelentes sugestões e senso crítico na leitura da tese.

À Surza Lucia Gonçalves da Rocha e Simone de Amorim Chermont, que muito mais do que grandes companheiras de trabalho, são grandes amigas; e Monique de Oliveira Ramos, que tornam o convívio do dia-dia no laboratório, a minha segunda casa.

À Christina Gaspar Villela por compartilhar muitos sonhos e realidades.

Ao amigo Richard Hemmi Valente pela confiança e grande ajuda nos experimentos realizados nos Estados Unidos.

Ao amigo Hilton Jorge pelos inúmeros auxílios nos experimentos, além da ótima companhia sempre.

Ao Romney Lima, do laboratório de produção e processamento de imagens pela competência e dedicação.

Ao Amarildo e Nelson pelo apoio técnico e paciência nas etapas de obtenção do soro da cuíca.

As minhas grandes amigas, Carla Schmidt, Juliana de Meis e Ana Tereza Rollemberg pela irmandade.

Aos meus pais, Alexandre e Marcia, que suportaram minha ausência e em alguns momentos a minha presença.

Ao Daniel, que me ensinou o verdadeiro significado de intensidade.

A todos do Departamento de Fisiologia e Farmacodinâmica que contribuíram de alguma forma para realização desta tese, em especial para Sandra Aurora Perez e Carmen Penido.

Ao apoio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES), do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ).

# ÍNDICE

	páginas
<b>Lista de figuras e tabelas.....</b>	<b>VIII</b>
<b>Lista de abreviações .....</b>	<b>X</b>
<b>Abreviações de aminoácidos .....</b>	<b>XI</b>
<b>Resumo .....</b>	<b>XVII</b>
<b>Abstract .....</b>	<b>XVIII</b>

## CAPÍTULO I: INTRODUÇÃO

I.1 Envenenamentos.....	1
I.1a) Ocorrência	
I.1b) Alterações fisiopatológicas.....	2
I.1c) Composição dos venenos.....	4
I.2 Metaloproteases .....	6
I.3 Terapia antiveneno convencional.....	9
I.4 Inibidores naturais	10
I.4a) Antineurotóxicos .....	11
I.4b) Antimiotóxicos	12
I.4c) Anti-hemorrágicos .....	13
I.5 Venenos de serpentes e inibidores como ferramentas e/ou agentes terapêuticos.....	17
I.6 Objetivos.....	19

## CAPÍTULO II: MATERIAL E MÉTODOS

II. 1 Animais .....	20
II. 2 Venenos e proteínas padrões	20
II. 3 Reagentes .....	20
II. 4 Géis de cromatografia.....	21
II. 5 Equipamentos .....	21

II. 6	Obtenção do soro de <i>Philander opossum</i> .....	21
II. 7	Isolamento da fração antibotrópica .....	22
II. 8	Isolamento de PO41 .....	22
II. 9	Dosagem de proteínas .....	23
II.10	Eletroforese em gel de poliacrilamida .....	23
II.11	Detecção de glicoproteínas .....	23
II.12	Determinação de teor de glicosilação .....	24
II.13	Determinação do ponto isoelétrico .....	24
II.14	Imunorevelação .....	25
II.15	Determinação da composição de aminoácidos.....	25
II.16	Seqüenciamento de aminoácidos .....	26
II.17	Determinação da massa molecular de PO41	26
II.18	Isolamento das enzimas do veneno .....	27
II.19	Purificação da jararagina.....	27
II.20	Purificação da proteína de baixo peso molecular ....	28
II.21	Fracionamento da proteína (BP).....	28
II.22	Determinação da massa molecular de BP .....	29
II.23	Inibição hidrólise do fibrinogênio .....	29
II.24	Inibição da atividade enzimática em substrato sintético .....	30
II.25	Inibição da atividade hemorrágica da jararagina ....	30
II.26	Formação de complexo .....	30

### CAPÍTULO III: RESULTADOS

III. 1	Isolamento da subunidade de 41kDa de <i>Philander opossum</i> .....	32
III. 2	Determinação da massa molecular de PO41 .....	32
III. 3	Seqüência N-terminal de PO41 .....	35
III. 4	Natureza glicoprotéica de PO41 .....	36

III. 5	Imunotransferência de PO41 .....	37
III. 6	Focalização isoelétrica de PO41 .....	38
III. 7	Composição de aminoácidos de PO41 .....	39
III. 8	Desglicosilação enzimática de PO41 .....	40
III. 9	Isolamento da jararagina do veneno	41
III.10	Purificação da proteína de baixo peso molecular do veneno de <i>Bothrops jararaca</i> .....	45
III.11	Determinação da massa molecular de BP .....	46
III.12	Fracionamento de BP .....	47
III.13	Seqüenciamento das BPs .....	47
III.14	Atividade fibrinogenolítica .....	49
III.15	Inibição da atividade fibrinogenolítica.....	49
III.16	Atividade hemorrágica e anti-hemorrágica .....	49
III.17	Inibição da atividade enzimática da jararagina.....	52
III.18	Formação de complexo	53

#### CAPÍTULO IV: DISCUSSÃO

<b>Discussão</b> .....	58
<b>Conclusões</b> .....	64a

#### CAPÍTULO V: REFERÊNCIAS

<b>Referências</b> .....	65
--------------------------	----

## LISTA DE FIGURAS E TABELAS

### **Figuras:**

<b>Figura 1A:</b> Cromatografia de troca iônica do soro total de <i>Philander opossum</i> .....	33
<b>Figura 1B:</b> Cromatografia de interação hidrofóbica da fração antibotrópica.....	33
<b>Figura 2:</b> Perfil eletroforético da purificação .....	33
<b>Figura 3:</b> Massa molecular por MALDI-TOF .....	34
<b>Figura 4:</b> Curva da massa molecular de PO41.....	34
<b>Figura 5:</b> Comparação das seqüências N-terminais de fatores anti-hemorrágicos .....	35
<b>Figura 6:</b> Natureza glicoprotéica de PO41.....	36
<b>Figura 7:</b> Imunotransferência .....	37
<b>Figura 8:</b> Focalização isoeletrica .....	38
<b>Figura 9A:</b> Desglicosilação enzimática.....	40
<b>Figura 9B:</b> Desglicosilação enzimática.....	40
<b>Figura 10:</b> Cromatografia de filtração em gel do veneno de <i>Bothrops jararaca</i> .....	42
<b>Figura 11:</b> Perfil eletroforético da purificação .....	42
<b>Figura 12:</b> Cromatografia de interação hidrofóbica da jararagina.....	43
<b>Figura 13:</b> Perfil eletroforético.....	43
<b>Figura 14:</b> Cromatografia de troca iônica da jararagina	44
<b>Figura 15:</b> Perfil eletroforético.....	44
<b>Figura 16:</b> Cromatografia de interação hidrofóbica da proteína de baixo peso molecular (BP) .....	45

<b>Figura 17:</b> Perfil eletroforético.....	46
<b>Figura 18:</b> Curva da massa molecular de BP.....	46
<b>Figura 19:</b> Cromatografia de filtração em gel de BP .....	48
<b>Figura 20:</b> Perfil eletroforético.....	48
<b>Figura 21:</b> Atividade fibrinogenolítica da jararagina .....	50
<b>Figura 22:</b> Atividade fibrinogenolítica de BP .....	50
<b>Figura 23:</b> Inibição da atividade fibrinogenolítica da jararagina.....	51
<b>Figura 24:</b> Inibição da atividade fibrinogenolítica de BP.	51
<b>Figura 25:</b> Formação de complexo (PO41 e jararagina) ..	54
<b>Figura 26:</b> Perfil eletroforético.....	54
<b>Figura 27:</b> Gráfico de áreas.....	55
<b>Figura 28 A e B:</b> Formação de complexo (PO41 e BPs) ..	56
<b>Figura 29:</b> Perfil eletroforético.....	56

## **TABELAS:**

<b>Tabela I:</b> Composição de aminoácidos de PO41 .....	39
<b>Tabela II:</b> Inibição da atividade hemorrágica .....	49
<b>Tabela III:</b> Inibição da atividade enzimática da jararagina.....	52

## LISTA DE ABREVIACOES

Abs- Absorbância

ADAM- Proteína de superfície celular contendo domínios tipo-metaloprotease e tipo-desintegrina

ADP- Adenosina di-fosfato

BP- Proteína de baixo peso molecular isolada do veneno de *Bothrops jararaca*

BSA- Soro albumina bovina

CA-Subunidade ácida da crotoxina

CB - Subunidade básica da crotoxina

CICS- Inibidor de crotoxina presente no soro de *Crotalus*

CK - Creatina quinase

CNF- Fator neutralizador de *Crotalus* e rico em cisteína

DHM- Dose hemorrágica mínima

Di-BSA- Forma dimérica de soro albumina bovina

DM- *Didelphis marsupialis*

EDTA- cido etilenodiaminotetracético

ELISA- Ensaio enzimático de imuno-aderência ligado à enzima

FAB - Frao antibotrópica

IUBMB - União internacional de bioquímica e biologia molecular

kDa- Quilodalton

LDH- Desidrogenase láctica

MALDI-TOF - Análise por espectrometria de massa por ionizao a laser assistida por matriz -tempo de vo

MDC- Proteína contendo domínios metaloprotease, tipo- desintegrina e rico em cisteína

mL- Mililitros

MMP- Metaloprotease de matriz extracelular

pI- Ponto isoelétrico

PLA<sub>2</sub> - Fosfolipase A<sub>2</sub>

PO- *Philander opossum*

PVDF- Polivinildifluoreto

SDS- Dodecil-sulfato de sódio

SVMP- Metaloprotease de veneno de serpente

TACE- Enzima conversora de TNF- $\alpha$

TCA- cido tricloroacético

TIMP- Inibidor tecidual de metaloprotease

TNF- $\alpha$  - Fator de necrose tumoral alfa

u.m.a - Unidade de massa atmica

vBj- Veneno de *Bothrops jararaca*

x g- número de vezes a acelerao da gravidade

C- grau Celsius

## ABREVIACÕES DE AMINOÁCIDOS

A- alanina  
R- arginina  
N- asparagina  
D- aspartato  
C- cisteína  
F- fenilalanina  
G- glicina  
E - glutamina  
Q - glutamina  
H - histidina  
I - isoleucina  
L- leucina  
K- lisina  
M-metionina  
P-prolina  
S- serina  
Y- tirosina  
T- treonina  
W- triptofano  
V- valina  
X- resíduo no determinado

## ABSTRACT

An antihaemorrhagic factor from *Philander opossum* serum was isolated and characterized. In order to study the neutralization effect of this inhibitor, we have developed a new methodology to isolate a PI as well as PIII SVMP from *Bothrops jararaca* venom (*Bjv*).

The antihaemorrhagic protein was isolated from *Philander opossum* serum by DEAE-Sephacel, Phenyl Superose and Superdex 200 chromatographies. The homogenous protein presented a molecular mass of 41,330 amu by MALDI-TOF mass spectrometry and was named PO41. By gel filtration chromatography, we have obtained a molecular mass of 61,5 kDa on native conditions. From Edman sequencing, PO41 and DM43, another SVMP inhibitor, presented similar amino termini through the first 27 residues. Identical immunoblotting patterns were obtained when both inhibitors were developed with polyclonal antibodies raised against *Didelphis marsupialis* active serum fraction. Isoelectric points were estimated to be less than 3.5 for both proteins.

The new methodology to purify jararhagin (a PIII SVMP) and botrolysin (a PI SVMP) was based on chromatographies using Superdex 200 and Phenyl Superose. Jararhagin was further submitted to a Mono Q column. The proteolytic and haemorrhagic effects of the haemorrhagins were neutralized by PO41. Both haemorrhagins formed stable complexes with PO41, as observed by gel filtration on Superdex 200.

The results suggest that PO41 presents similar physicochemical, structural, immunoreactive and biological properties with the SVMP inhibitors, including DM40 e DM43. These inhibitors belong to the supergene family of immunoglobulins.

## RESUMO

Em 1994, Perales e colaboradores isolaram e caracterizaram parcialmente frações antibotrópicas (FAB) do soro de vários marsupiais brasileiros, dentre eles o *Didelphis marsupialis* (DM) e o *Philander opossum* (PO). No presente trabalho, objetivamos isolar e caracterizar o fator anti-hemorrágico de *Philander opossum*. Além disto, para o estudo da capacidade inibitória deste fator sobre metaloproteases, desenvolvemos uma nova metodologia de isolamento destas enzimas, jararagina e botrolisina, a partir do veneno de *Bothrops jararaca*.

A proteína anti-hemorrágica isolada foi denominada de PO41, pois apresentou 41,330 u.m.a. por MALDI-TOF. Por filtração em gel verificamos que esta proteína possuía massa molecular de 61,5kDa e apresentou identidade nos 27 resíduos N-terminais com dois inibidores isolados do soro de *Didelphis marsupialis*, DM40 e DM43. Por imunotransferência, obtivemos padrões de mobilidade idênticos quando revelamos PO41 e DM43, com anticorpo policlonal preparado contra a fração antibotrópica de *Didelphis marsupialis*. Por focalização isoeletrica estimamos para PO41 ponto isoeletrico abaixo de 3,5.

PO41 foi capaz de formar complexos não-covalentes com as enzimas isoladas do veneno de *Bothrops jararaca*. As atividades proteolíticas e hemorrágicas destas enzimas também foram inibidas por PO41.

Nossos resultados sugerem que PO41 é um inibidor de metaloproteases de venenos de serpentes e possui propriedades físico-químicas, estruturais, de imunoreatividade e biológicas similares às dos inibidores pertencentes a superfamília gênica das imunoglobulinas.

## I.1-Envenenamentos por serpentes

### I.1.a) Ocorrência

As serpentes pertencem à classe de vertebrados Reptilia, ordem Squamata, sub-ordem Ophidia. As espécies venenosas são classificadas na infra-ordem Caenophidia, que compreende as famílias *Elapidae*, *Viperidae*, *Atractaspididae* e *Colubridae* (Mebs, 1998).

Serpentes venenosas estão amplamente distribuídas e ocupam diversos tipos de habitats em todos os continentes, desde o nível do mar (podendo alcançar até 100m de profundidade no caso das espécies marinhas) até altitudes de mais de 5.000m, inclusive no Círculo Ártico (Warrell, 1996; David *et al.*, 1994).

A incidência mundial de acidentes ofídicos é de 5.400.000 casos, com cerca de 2.682.500 envenenamentos e 125.345 mortes anuais (4,7%). No Brasil, a estimativa é de 20.000 casos por ano, com 160 mortes (Chippaux, 1998). Porém, não se sabe ao certo qual o índice de acidentes que causam problemas crônicos, como amputações, deformidades e insuficiência renal crônica (Warrell, 1996).

As serpentes do gênero *Bothrops* (família *Viperidae*, subfamília *Crotalinae*) são responsáveis pela maior parte dos acidentes ofídicos na América Latina (cerca de 90%). Este gênero apresenta o maior número de espécies e engloba as serpentes mais agressivas, que atacam sem fazer barulho e habitam locais mais freqüentados por crianças, vítimas potenciais deste tipo de envenenamento. Os gêneros *Crotalus* e *Micrurus* também são de interesse médico pela gravidade com que se reveste o quadro clínico (Campbell e Lamar, 1989).

### **I.1.b) Alterações fisiopatológicas ocasionadas por venenos de serpentes**

Os venenos da família *Viperidae* (subfamília *Crotalinae*) podem causar efeitos locais, sistêmicos ou ambos. Os efeitos sistêmicos podem causar alterações na coagulação sanguínea, incluindo hemorragias distantes do sítio da picada, como na gengiva, púrpura, macro hematúria, epistaxis e hemorragia uterina. Podem ocorrer ainda, arritmias cardíacas, hipotensão transitória, choque, mioglobínúria e insuficiência renal aguda (Kamiguti *et al.*, 1996a). A insuficiência renal pode ser resultante da oclusão vascular, como conseqüência de coagulação intravascular disseminada e/ou da ação tóxica direta do veneno sobre o endotélio renal e vasoespasmo, o que pode levar a um quadro de hipotensão e choque (Amaral *et al.*, 1985).

Alguns venenos de subespécies *Crotalus durissus* podem provocar ainda, escurecimento da visão, dificuldade na abertura dos olhos, flacidez muscular e mialgia, dentre outros. Estes efeitos são conseqüência da ação das neurotoxinas que inibem a liberação de acetilcolina na fenda neuro-muscular, o que pode ocasionar a morte por parada respiratória (ação pré-sináptica) (Warrel e Fenner, 1993; Sanchez *et al.*, 1992). Os efeitos pós-sinápticos são verificados principalmente em acidentes com serpentes da família *Elapidae* (*Micrurus* ou coral). Os venenos elapídicos têm ação tipo-curare, e ligam-se especificamente à subunidade alfa do receptor colinérgico nicotínico, impedindo a ligação da acetilcolina (agonista fisiológico) e induzindo parada muscular e falência respiratória (Atassi, 1991).

Os efeitos locais mais característicos deste tipo de envenenamento são: a) o edema, que é causado pela ação direta do veneno sobre a vasculatura e pela liberação de mediadores endógenos, resultante da ação do veneno sobre os mastócitos, cininogênios e fosfolipídeos; b) a mionecrose produzida pela ação direta das miotoxinas sobre as fibras musculares esqueléticas ou a necrose das fibras musculares esqueléticas que é atribuída à isquemia causada pelas hemorraginas, que comprometem a microcirculação do tecido muscular (Gutiérrez e Lomonte, 1989; Gutiérrez, 1990; Dos-Santos *et al.*, 1992). É importante ressaltar que há boa regeneração muscular após a mionecrose resultante da ação direta das miotoxinas isoladas, pois os nervos e vasos sanguíneos mantêm-se intactos não havendo fibrose ou proliferação de fibroblastos. Isto sugere que as alterações microvasculares mais drásticas são induzidas por toxinas

hemorrágicas, o que gera uma pobre regeneração (Gutiérrez e Lomonte, 1995); c) a hiperalgesia que pode ocasionar injúria tecidual resultante da liberação local de uma variedade de substâncias químicas como, bradicinina, prostaglandinas e leucotrienos; e finalmente, d) a hemorragia que ocorre em consequência da atividade de metaloproteases (hemorraginas) sobre os capilares e/ou células endoteliais.

Os efeitos locais produzidos pelas hemorraginas são ocasionados por proteólise dos componentes da lâmina basal da microvasculatura (Bjarnason *et al.*, 1988). Existem dois mecanismos que explicam como é a fuga dos componentes sanguíneos dos vasos danificados por toxinas hemorrágicas. O primeiro deles é *per diapedesis*, causado por exudação lenta através de pequenas fissuras entre as células endoteliais; e o outro, *per rhexis*, com fluxo rápido por grandes rupturas na parede vascular, localizadas entre as células endoteliais danificadas (Marsh, 1994; Kamiguti *et al.*, 1996a).

O processo hemorrágico é muito rápido e os efeitos locais ou sistêmicos dependem da via de administração do veneno. Assim, injeções intradérmicas, subcutâneas e intramusculares produzem lesões locais, enquanto que injeções intraperitoniais e intravenosas tendem a produzir hemorragias sistêmicas, com lesões em órgãos distantes do sítio injetado (Marsh, 1994). Os estudos da especificidade de substratos destas metaloproteases demonstram que estas enzimas degradam a maioria das proteínas de matriz extracelular (Baramova *et al.*, 1989; 1990).

### **I.1.c) Composição dos venenos de serpentes**

Os venenos de serpentes são muito diversificados podendo sofrer variações qualitativas nas famílias, gêneros, inter ou intra-espécies, até variabilidade conforme a distribuição geográfica do ofídio (Chippaux *et al.*, 1991).

O aparato que produz o veneno das serpentes é composto por glândulas exócrinas modificadas. Os venenos são misturas complexas de proteínas e peptídeos (90-95%), que possuem inúmeras atividades biológicas. Outros componentes são cátions metálicos, carboidratos, nucleosídeos, aminas biogênicas, aminoácidos livres e lipídeos. O sódio é o cátion mais encontrado no veneno, apesar de ter função ainda desconhecida. O zinco e o cálcio estão presentes na maioria das metaloproteases de venenos

de serpentes, e os carboidratos aparecem principalmente na forma de glicoproteínas (Russell, 1980; Tu, 1996)

As principais substâncias protéicas dos venenos podem ser divididas em neurotoxinas, miotoxinas, hemorraginas, fatores que atuam sobre a coagulação sanguínea e enzimas com baixa toxicidade (Chippaux e Goyffon, 1998). Algumas proteínas encontradas nos venenos podem ser neurotoxinas de atuação pré ou pós- sinápticas, neurotoxinas ligantes de canal de potássio, citotoxinas, miotoxinas, cardiotoxinas ou ainda, inibidores de agregação plaquetária (desintegrinas) (para revisão, Markland, 1998).

As diferentes atividades enzimáticas estão relacionadas às fosfolipases, fosfodiesterases, fosfomonoesterases, L-amino ácido oxidases, acetilcolinesterases e enzimas proteolíticas tipo serino e metaloproteases. Existem ainda evidências da presença de tiol- e aspartato- proteases (Tu, 1996).

As fosfolipases (PLA<sub>2</sub>) estão associadas a inúmeros efeitos farmacológicos e/ou tóxicos, podendo desencadear danos musculares, efeitos neurológicos, atividade anticoagulante e inflamação (Lizano *et al.*, 1997). Elas foram classificadas em 10 grupos (I-X), de acordo com suas estruturas primárias e localizações das pontes de enxofre. As PLA<sub>2</sub> de venenos de serpentes localizam-se nos grupos I e II. No grupo I estão as fosfolipases da família *Elapidae* e do pâncreas de mamíferos; no grupo II estão as PLA<sub>2</sub> da família *Viperidae* e de tecidos não-pancreáticos de mamíferos (Balsinde *et al.*, 1999). As PLA<sub>2</sub> são Ca<sup>2+</sup>-dependentes e membros do grupo II podem ainda ser subdivididos em: PLA<sub>2</sub> D49, que possuem um resíduo de ácido aspártico em um dos sítio de ligação do cálcio e apresentam potente atividade enzimática; e em proteínas tipo-PLA<sub>2</sub> K49, que possuem uma lisina na posição 49 e têm pouca ou nenhuma atividade enzimática. A presença do ácido aspártico na posição 49 é crucial para ligação do cálcio, o que parece ser fundamental para atividade catalítica. Apesar da ausência do resíduo de ácido aspártico na posição 49 nas proteínas K49, estas são muito ativas na indução de mionecrose, por mecanismos ainda não completamente elucidados (Ownby *et al.*, 1999).

Dentre as enzimas proteolíticas é conhecido que as serinoproteases podem possuir ambas atividades fibrinolítica e fibrinogenolítica, ou apenas uma delas. No caso das que possuem somente atividade fibrinogenolítica e levam a indução de formação de coágulo são também conhecidas por proteases tipo-trombina. Poucas porém, apresentam uma única atividade, como por

exemplo, enzimas ativadoras de fator V isoladas do veneno de *Vipera russelli* e enzimas indutoras de agregação plaquetária (PA-BJ, isolada do veneno de *Bothrops jararaca*). Algumas serinoproteases podem apresentar ainda, atividade liberadora de bradicinina e são conhecidas como proteases tipo-caliceína (Matsui *et al.*, 2000).

As metaloproteases presentes nos venenos são extremamente tóxicas, o que resulta em severas conseqüências fisiopatológicas, incluindo interferência no processo de coagulação sangüínea e/ou degradação da membrana basal e componentes da matriz extracelular (Bjarnason e Fox, 1994).

## I.2- Metaloproteases

Mais de 100 metaloproteases de venenos de serpentes (incluindo as isoenzimas) já foram isoladas, sendo que apenas 20 delas possuem seqüências primárias conhecidas (Matsui *et al.*, 2000). Rawlings e Barrett, em 1995, classificaram as metaloproteases em clãs, o clã MB é subdividido nas famílias Astacina e Colagenase Intersticial. A família Astacina possui duas subfamílias Astacina e Reprolisina, nesta última estão localizadas as metaloproteases de venenos de serpentes (SVMPs-“Snake Venom MetalloProteinase) e as ADAMs (“A Disintegrin-like And Metalloproteinase”). A família da Colagenase Intersticial é composta pelas subfamílias das Serralisinas e subfamília das Matrizinas.

Todas as metaloproteases são zinco dependentes com um motivo conservado de ligação para o metal, com base nesta seqüência de consenso presente neste motivo conservado, Bode e colaboradores, em 1993, classificaram-nas como metzincinas, cujos membros apresentam além da homologia na região de ligação do zinco, similares topologias tridimensionais e uma região conservada que contém um resíduo de metionina (‘Met turn’) essencial para a integridade estrutural do sítio ativo (Stöcker *et al.*, 1995).

Em 1994, estudos estruturais das metaloproteases de veneno de serpente (SVMP) classificaram-nas em 4 classes (PI-PIV), de acordo com sua organização em domínios (Hite *et al.*, 1994). A classe PI possui apenas o domínio metaloprotease; a PII, com um domínio desintegrina além do metaloprotease; PIII, possui tanto

um domínio tipo-desintegrina, quanto um domínio rico em cisteína, além do metaloprotease, e, finalmente, a classe PIV, com estrutura similar à classe PIII e com um domínio tipo-lectina adicional (Jia *et al.*, 1996).

Os domínios pré- (seqüência sinal), pró- (zimogênio) e metaloprotease são comuns a todas as metaloproteases hemorrágicas (hemorraginas). A adição de outros domínios a esta estrutura básica resulta obviamente, no aumento gradual da massa molecular (Hati *et al.*, 1999).

As metaloproteases são sintetizadas na glândula de veneno como zimogênios, que são processados posteriormente gerando sua forma ativa. Este processamento é presumidamente dado pelo mecanismo de “cysteine-switch”, que implica proteólise do domínio pró- por outras metaloproteases do veneno e/ou por autólise (Jia *et al.*, 1996).

As desintegrinas são componentes de baixo peso molecular do veneno, não-enzimáticos, que possuem a seqüência RGD (arginina, glicina e ácido aspártico) pela qual ligam-se às integrinas da superfície plaquetária e, desta forma, inibem potentemente a agregação plaquetária (Scarborough *et al.*, 1993). Já foi proposto que elas são geradas a partir de proteólise da proteína precursora de metaloproteases da classe PII (para revisão, Markland, 1998). O domínio tipo-desintegrina das metaloproteases (classes PIII e IV) possui uma seqüência XXCD (geralmente SECD), que substitui a seqüência RGD do domínio desintegrina (Paine *et al.*, 1992). Kamiguti e colaboradores, em 1996b, demonstraram a capacidade da jararagina (proteína de 52kDa isolada do veneno de *Bothrops jararaca*, da classe PIII) em inibir a agregação plaquetária induzida por colágeno. Mais tarde, os mesmos autores reportaram que não só o domínio tipo-desintegrina participaria deste efeito, mas também o domínio metaloprotease.

Entretanto, Usami e colaboradores, em 1994, isolaram a jararagina C, proteína de 28kDa purificada a partir do veneno de *Bothrops jararaca*, constituída pelos domínios tipo-desintegrina e rico em cisteína idênticos aos da jararagina, e que provavelmente eram resultantes do processamento da região C-terminal desta por autólise. Esta proteína demonstrou ser um potente inibidor de agregação plaquetária induzida por colágeno e por ADP. Igualmente, Shimokawa e colaboradores, em 1997, demonstraram a capacidade da catrocolastatina-C isolada do veneno de *Crotalus atrox*, em inibir agregação plaquetária induzida por colágeno. Esta proteína possui seqüência C-terminal idêntica à encontrada para a catrocolastatina, proteína de 50kDa, da classe PIII, isolada do mesmo veneno. Corroborando, estes fatos, uma proteína

atrolisina A (Ht-a) recombinante, composta pelos domínios tipo-desintegrina e rico em cisteína, como a cotrocolastatina C e jararagina C, também se mostrou capaz de inibir agregação plaquetária induzida por colágeno e ADP (Jia *et al.*, 1997).

A subfamília reprotolisina também inclui as ADAMs ou MDC

(“metalloproteínase, disintegrin-like, cysteine-rich”), que apresentam homologia de cerca de 30% com os domínios metaloprotease e tipo-desintegrina das SVMps. Estas proteínas estão presentes em diversos organismos, incluindo mamíferos, répteis e invertebrados (Fox e Long, 1998).

Apesar de aproximadamente metade das ADAMs descritas até agora, possuir alterações na seqüência de ligação do zinco, as que a possuem intacta apresentam atividade proteolítica, como é o caso das ADAMs 10, 12 e 17. Além disto, podem participar de diversas funções, como adesão, fusão e sinalização intracelular (Stone *et al.*, 1999).

As ADAMs também estão relacionadas a alguns processos patogênicos. Um exemplo é a TACE (TNF- $\alpha$  convertase), uma enzima do subgrupo da ADAM 17 isolada do baço bovino, que é responsável pelo processamento do precursor do fator de necrose tumoral  $\alpha$  gerando sua forma ativa solúvel (Killar *et al.*, 1999).

As SVMps possuem 15% de identidade com as MMPs (Stöcker *et al.*, 1995), que são uma família de proteínas secretadas ou transmembranares capazes de digerir matriz extracelular e componentes da membrana basal, em condições fisiológicas e/ou patológicas (Chambers e Matrisian, 1997). São secretadas pela maioria das células do tecido conjuntivo (como fibroblastos e osteoblastos) e pelas células endoteliais (Docherty *et al.*, 1992). Estão envolvidas em importantes processos fisiológicos como embriogênese, morfogênese e no remodelamento tecidual (Fox e Bjarnason, 1998a).

Um importante mecanismo de regulação da atividade das MMPs é via ligação a inibidores teciduais de metaloprotease (TIMPs) (Brew *et al.*, 2000). Os TIMPs agem inibindo a atividade proteásica via formação de complexo não-covalente com as MMPs, com relação estequiométrica de 1:1 (Docherty *et al.*, 1992).

Os TIMPs formam uma família de proteínas composta por diferentes membros, que possuem 12 resíduos de cisteína conservados. São expressos em diferentes tipos celulares e estão presentes em muitos tecidos e fluidos corporais (Gomez *et al.*, 1997). O TIMP-1 é uma glicoproteína de 30 kDa, o TIMP-2 é uma proteína não-glicosilada de 23kDa; ambos apresentam-se na forma solúvel. Já o TIMP-3 possui uma massa molecular estimada de 21kDa e em sua seqüência C-terminal existe um sítio putativo de glicosilação, ainda que sua forma glicosilada ainda não tenha sido descrita (Murphy e Willenbrock, 1995), apresenta-se na forma insolúvel, ligada à matriz extracelular (Docherty *et al.*, 1992).

### I.3- Terapia antiveneno convencional

Na era pré-antiveneno, a estimativa de mortalidade por envenenamentos por serpentes no Brasil era de 25%. Com a introdução do antiveneno, estes índices caíram para 2,26% em 1943 (23.470 acidentes, com 530 mortes) e 0,60% em 1986-89 (20.170 acidentes, com 122 mortes por ano). Atualmente, a mortalidade por envenenamentos por serpentes do gênero *Bothrops*, entre os casos tratados com antivenenos é de 0,8%. Entretanto, estudos clínicos demonstram que a falência renal aguda é a principal causa de morte, além do choque e hemorragia intra-craniana. A incidência de deformidades secundárias ao envenenamento é desconhecida (Cardoso *et al.*, 1993).

A produção do soro antiofídico foi iniciada no Brasil no início do século por Vital Brazil. Os antivenenos hoje em dia são produzidos pelo Instituto Butantan (São Paulo), Instituto Vital Brazil (Rio de Janeiro) e Fundação Ezequiel Dias (Minas Gerais), sendo distribuídos gratuitamente pelo Ministério da Saúde para os hospitais em todo o país (Cardoso *et al.*, 1993).

Atualmente, os antivenenos são IgGs purificadas, produzidas em animais imunizados com veneno, geralmente cavalos. Estes anticorpos são purificados por precipitação com sulfato de amônio ("salting out"); digestão com pepsina (corta a porção Fc do

anticorpo que é responsável pela ativação do sistema complemento); e precipitação com ácido caprílico (precipita todas as frações à exceção das imunoglobulinas). O antiveneno deve ser administrado com solução fisiológica + adrenalina + esteróides + anti-histamínicos, para diminuir as prováveis reações alérgicas (Chippaux e Goyffon, 1998).

Além disto, foram desenvolvidos ensaios imunológicos que detectam a especificidade e quantidade do veneno presentes no sangue ou fluidos, podendo-se calcular a quantidade de antiveneno a ser administrada e monitorar os níveis de anticorpos antiveneno circulantes, tornando a terapêutica mais eficiente. Em geral, é administrada uma alta dose de antiveneno em prol da redução dos efeitos locais causados pelos envenenamentos, principalmente os botrópicos (Theakston, 1996), além disto, o nível de antiveneno circulante deve ser alto para evitar a redistribuição do veneno, acumulado nos tecidos (Theakston, 1996). Um dos principais problemas na neutralização dos efeitos locais é a rapidez com que estes fenômenos ocorrem, especialmente a hemorragia e mionecrose, que podem instalar-se em apenas alguns minutos após injeção do veneno (Marsh, 1994).

#### I.4- Inibidores naturais

São conhecidos diferentes mecanismos de inibição endógena dos venenos de serpentes. O primeiro deles é conhecido como latência sob a forma de zimogênios; desta forma as metaloproteases dos venenos de serpentes são sintetizadas. O segundo mecanismo envolve a presença de peptídeos inibidores no veneno bruto, que devem funcionar modulando a atividade proteolítica das metaloproteases, enquanto na glândula. Foram identificados no veneno bruto de serpentes das famílias *Viperidae* alguns peptídeos conhecidos como Piro-glutamil, que parecem ser importantes inibidores *in vivo* que mantêm a integridade do veneno (Robeva *et al.*, 1991). Portanto, as metaloproteases enquanto na glândula estão neutralizadas por altas concentrações de peptídeos piro-glutamil. Num envenenamento a concentração efetiva destes inibidores é diminuída por diluição.

O terceiro mecanismo abrange os inibidores endógenos que foram identificados no soro de serpentes (Fox e Bjarnason, 1998a). Freitas e colaboradores, em 1992 reportaram a presença do citrato nos venenos das famílias *Viperidae*, em concentrações relativamente altas para quelar potentemente os íons metálicos das proteínas dos venenos. A presença do citrato pode representar um importante mecanismo de proteção para as serpentes contra o seu próprio veneno (Odell *et al.*, 1998).

A resistência de alguns animais aos venenos de serpentes já foi amplamente reportada (para revisão, Fox e Bjaranason, 1998a; Thwin e Gopalakrishnakone, 1998; Domont *et al.*, 1991). Esta resistência é em parte devido à presença de fatores neutralizantes em animais resistentes. De acordo com os efeitos fisiopatológicos, estes fatores antiofídicos podem ser divididos em 3 principais grupos: proteínas anti-neurotóxicas, antimiotóxicas e anti-hemorragicas.

#### **I.4a) Antineurotóxicos**

Alguns destes fatores foram purificados do soro de algumas serpentes das famílias *Viperidae* e *Elapidae* ( Fortes-Dias *et al.*, 1991; Perales *et al.*, 1995). Estas proteínas são inibidores de fosfolipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>), que é um dos principais componentes dos venenos de serpentes e contribui para diversos efeitos patológicos, incluindo distúrbios hemostáticos, cardiotoxicidade, hipotensão, neurotoxicidade/miotoxicidade (Warrell, 1989).

Okhura e colaboradores, em 1997, classificaram os inibidores de PLA<sub>2</sub> em três tipos: a)  $\alpha$ , com estrutura tipo CRD (domínio de reconhecimento de carboidratos), que inclui inibidores isolados do plasma de *Trimerusurus flavoviridis* (Kogaki *et al.*, 1989) e de *Bothrops asper* (Lizano *et al.*, 1997); b)  $\beta$ , com estrutura rica em leucina, representado pelo inibidor isolado do plasma de *Agkistrdon blomhoffi sinitticus* (Ohkura *et al.*, 1997) e c)  $\gamma$ , com estrutura similar à superfamília das neurotoxinas e citotoxinas 'three fingers', presentes nos venenos de serpentes ( Fortes-Dias *et al.*, 1991; Perales *et al.*, 1995).

Foi isolado e caracterizado um inibidor de PLA<sub>2</sub> (tipo  $\gamma$ ) do soro da serpente *Crotalus durissus terrificus*, denominado CICS

(Crotoxin inhibitor from Crotalus serum) por Perales *et al.*, 1995, ou CNF (Crotalus neutralizing factor) por Fortes-Dias *et al.*, 1991;1994. Este fator é capaz de neutralizar a toxicidade do veneno autólogo. O mecanismo de inibição envolve a formação de complexo entre o inibidor e subunidade básica (CB) da crotoxina. A formação deste complexo envolve ainda, a dissociação da crotoxina, com liberação da subunidade ácida (CA) (Perales *et al.*, 1995; Fortes-Dias *et al.*, 1994).

CICS é uma proteína oligomérica de 130kDa, formada pela associação não-covalente de 2 subunidades de 23 e 25kDa. Os 30 primeiros resíduos N-terminais das 2 subunidades são idênticos, podendo haver diferenças ocasionadas por fenômenos pós-traducionais como glicosilações por exemplo, ou ainda por modificações em outras regiões da seqüência. CICS foi clonado e expresso em procarionte e gerou uma proteína recombinante de aproximadamente 20kDa (Villela, 2000).

#### **I.4b) Antimiotóxicos**

Durante os últimos anos vem aumentando o interesse pelo estudo dos componentes dos venenos responsáveis pela mionecrose e seu modo de ação. Várias miotoxinas foram isoladas dos venenos botrópicos e caracterizadas. Todas possuem estrutura de fosfolipase A<sub>2</sub>, mesmo que não indutoras de atividade enzimática; são proteínas básicas e muito estáveis devido ao grande número de pontes dissulfeto intra-cadeia (para revisão, Gutiérrez e Lomonte, 1995).

Melo e Suarez-Kurtz em 1988 demonstraram a atividade antimiotóxica dos soros do gambá *Didelphis marsupialis* e a cuíca *Philander opossum* contra o veneno de *Bothrops jararacussu*. Eles sugeriram que a inibição da liberação de enzimas sarcoplasmáticas do músculo esquelético (CK e LDH), indicadores de danos no sarcoplasma em condições experimentais, é dada via formação de um complexo ácido-base entre as miotoxinas (básicas) do veneno e componentes do soro dos marsupiais.

Lizano e colaboradores, em 1997, isolaram um fator antimiotóxico da serpente *Bothrops asper*. Este fator é um oligômero composto por 5 subunidades que inibem a atividade catalítica da PLA<sub>2</sub> *in vitro* e a miotoxicidade *in vivo*. Este fator

compartilha homologia estrutural com os inibidores de PLA<sub>2</sub> (tipo  $\gamma$ ) isolados de *T. flavoviridis*, *Agkistrodon b. siniticus* e todos os inibidores contendo domínios que reconhecem carboidratos, inclusive em receptores de fosfolipase presentes em humanos e coelhos, sugerindo uma evolução dos domínios comum entre os inibidores de PLA<sub>2</sub> de serpentes e os receptores de PLA<sub>2</sub> de mamíferos (Thwin e Gopalakrishnakone, 1998).

Nosso grupo, recentemente detectou a presença de uma proteína no soro do gambá *Didelphis marsupialis*, que reage com o anticorpo policlonal preparado contra as duas anti-hemorraginas (DM40 e DM43) isoladas deste mesmo soro. Esta proteína foi caracterizada como monomérica ácida, com 15% de glicosilação e massa molecular de 64kDa (DM64). Quando comparada com DM40 e DM43, demonstrou baixa atividade anti-hemorrágica, apesar da homologia estrutural. Por outro lado, DM64 inibiu potentemente a atividade das miotoxinas I e II isoladas de *Bothrops asper*, sem interferir com a atividade fosfolipásica desta primeira (Rocha *et al.*, 2000a).

#### **I.4c) Anti-hemorrágicos**

Os fatores anti-hemorrágicos possuem características comuns: são glicoproteínas ácidas, com pontos isoelétricos que variam de 4,0-5,4; nenhum possui atividade proteolítica mas são estáveis em um amplo espectro de pH e temperatura (Domont *et al.*, 1991).

Inúmeros fatores anti-hemorrágicos foram isolados de diversos animais. Estes fatores podem ser divididos em duas classes: a) proteínas de baixo peso molecular e b) proteínas de alto peso molecular, onde estão representadas as  $\beta$ -macroglobulinas ( $\cong$ 700kDa) e as proteínas tipo-macroglobulinas (Fox e Bjarnason, 1998a). A exemplo destas proteínas de alto peso molecular foi purificado um fator anti-hemorrágico do músculo esquelético de *Erinaceus europaeus* (porco-espinho), denominado erinacina. Esta proteína foi capaz de inibir efetivamente a atividade do veneno de *Bothrops jararaca*, mas não foi capaz de inibir a atividade enzimática da tripsina e quimotripsina (serino proteases). Trata-se de uma molécula de 1.000kDa constituída por subunidades de 35 e 39kDa. A dissociação delas resulta na

completa perda de atividade (Mebs *et al.*, 1996). Similar atividade inibitória já havia sido descrita contra venenos de diversas serpentes como *Bothrops atrox*, *Bothrops jararaca*, *Vipera berus*, *Bitis arietans*, *Vipera latastei gaditana* (Omori-Satoh *et al.*, 1994), *Agkistrodon halys blomhoffi*, *Bitis gabonica rhinoceros*, *Bitis nasicornis* e *Crotalus horridus horridus* (De Wit e Weström, 1987 a, b e c).

O mecanismo de inibição das proteínas de baixo peso molecular parece ser via formação de complexo não-covalente (Weissenberg *et al.*, 1992; Omori-Satoh, 1977 e Tanizaki *et al.*, 1991). Estas proteínas podem ser subdivididas em dois principais grupos: superfamília gênica das imunoglobulinas e superfamília das cistatinas.

Na superfamília gênica das imunoglobulinas estão localizadas as anti-hemorraginas, que estruturalmente podem apresentar homologia com a  $\alpha$ 1B-glicoproteína humana (Fox e Bjarnason, 1998 a).

Nosso laboratório há alguns anos vem investigando a resistência de marsupiais brasileiros aos venenos de serpentes, especialmente ao de *Bothrops jararaca*. Esta resistência pode ser explicada pela presença de uma fração antibotrópica composta por duas glicoproteínas, com massas moleculares de 40 (DM40) e 43kDa (DM43) isolada do soro dos animais resistentes. Em 1994, Perales e colaboradores, demonstraram homologia da região N-terminal, entre as anti-hemorraginas isoladas do soro do gambá *Didelphis marsupialis* e das cuícas *Philander opossum* e *Lutrolina crasicaudata*. Estudos posteriores de caracterização físico-química, estrutural e mecanística foram feitos exclusivamente com as DMs.

Estes fatores antibotrópicos são capazes de inibir as atividades letal, hemorrágica, edematogênica e hiperalgésica do veneno de *Bothrops jararaca* (Rocha *et al.*, 2000b).

Utilizando uma combinação da química de Edman com espectrometria de massas (MALDI-TOF), foi determinada a seqüência primária completa de DM43 e parcial de DM40 (Neves-Ferreira *et al.*, 2000). As duas apresentaram homologia entre si e também com a oprina isolada do gambá *Didelphis virginiana* (Catanese e Kress, 1992).

A oprina é uma glicoproteína ácida de 52kDa, de cadeia única e 26% de conteúdo de carboidratos. Trata-se de um inibidor específico de metaloprotease, que não interfere com a atividade catalítica de serino-proteases. O mecanismo de inibição envolve a

formação de complexo não-covalente. Por seqüenciamento do seu cDNA observou-se homologia com  $\alpha$ 1B-glicoproteína humana, uma proteína plasmática de função ainda desconhecida (Ishioka *et al.*, 1986).

Jurgilas e colaboradores, em 1999, detectaram a presença de uma fração antibotrópica no leite do gambá *Didelphis marsupialis*. Este fator foi isolado e caracterizado, demonstrando propriedades físico-químicas, antigênicas, biológicas e estruturais idênticas às da fração antibotrópica isolada do soro deste animal, o que poderia representar uma proteção adicional aos neonatos contra os venenos de serpentes.

Já foram reportados inúmeros outros fatores isolados do soro de mamíferos resistentes a venenos. Dentre os roedores, podemos citar o *Neotoma micropus* e o *Sigmodon hispidus*, ambos resistentes ao veneno de *Crotalus atrox* (Perez *et al.*, 1979; Pichyangkul e Perez, 1981).

Tomihara e colaboradores em 1987 isolaram 3 fatores anti-hemorrágicos do soro do mangusto (*Herpestes edwardsii*), que foram capazes de inibir a atividade hemorrágica dos venenos de *Trimeresurus flavoviridis*, *Agkistrodon halys blomhoffii*, *Bothrops jararaca* e *Bitis arietans*. Estes fatores são homólogos entre si e, além disto, também possuem homologia com a oprina, e portanto com a  $\alpha$ 1B-glicoproteína humana.

Alguns inibidores de baixo peso molecular presentes no soro de serpentes venenosas já foram isolados (*Bothrops asper*-Borkow *et al.*, 1995; *Bothrops jararaca*- Tanizaki *et al.*, 1991; De Oliveira e Tanizaki, 1992 e *Crotalus atrox* - Weissenberg *et al.*, 1991 e 1992) e não-venenosa (*Dinodon semicarinatus*- Tomihara *et al.*, 1988); os inibidores isolados do soro das serpentes *Trimeresurus flavoviridis* e *Bothrops jararaca* (Fox e Bjarnason, 1998a ; Valente *et al.*, 1999 a-b) são pertencentes à superfamília das cistatinas. Estas proteínas estão relacionadas com inibidores de cisteíno-proteases.

Outro inibidor anti-hemorrágico foi isolado do soro da serpente *Bothrops jararaca*. Esta glicoproteína (17% carboidratos) possui 46,101 u.m.a. por MALDI-TOF (BJ46a) e 80kDa por filtração em gel, indicando uma estrutura homodimérica. BJ46a possui 322 resíduos e 4 sítios putativos para glicosilação. Sua estrutura foi deduzida através de cDNA, sendo homóloga ao fator HSF (Yamakawa e Omori-Satoh, 1992) isolado do soro da serpente *Trimeresurus flavoviridis* com 85% de identidade, embora possua um resíduo de cisteína a menos. BJ46a é um potente inibidor de atrolisina C (SVMP, classe PI) e jararagina (SVMP, classe PIII)

através de formação de um complexo não-covalente entre o inibidor e as enzimas, com relação estequiométrica de 1:2 (monômero do inibidor/ moléculas de enzima) (Valente *et al.*, 1999 a -b)

HSF possui 323 resíduos que têm entre outras características, homologia de seqüência com membros da superfamília das cistatinas, que são da família de inibidores de tiol-proteases. Apesar disto, HSF foi capaz de inibir as atividades proteolítica e hemorrágica das SVMPs de *Trimeresurus*, mas não se mostrou efetiva sobre as tiol-proteases papaína e catepsina B (Yamakawa e Omori-Satoh, 1992).

## I.5- Venenos de serpentes e inibidores como ferramentas e/ou agentes terapêuticos

Inúmeras enzimas têm sido usadas como ferramentas em pesquisas biomédicas ou como agentes terapêuticos e/ou de diagnóstico. Os venenos de serpentes são ricas fontes enzimáticas, ultrapassando inclusive o suco pancreático e outras secreções similares. De 26 a 39 diferentes atividades enzimáticas foram reportadas nos venenos. Este número varia de acordo com os substratos utilizados. Além disto, algumas destas enzimas são constituintes específicos de certas famílias ou gêneros de serpentes (Markland, 1998).

As neurotoxinas pré-sinápticas dos venenos são PLA<sub>2</sub> que se ligam com alta afinidade às estruturas de terminações nervosas, e desse modo, impedem a liberação de neurotransmissores (acetilcolina). Estas toxinas são utilizadas como ferramentas em pesquisas neuro-biológicas, como por exemplo, para estudar o mecanismo do controle da liberação de neurotransmissores como, marcadores de terminações nervosas, no estudo de danos nas células musculares e de regeneração bem como na investigação da importância de moléculas das membranas pré-sinápticas (Stocker, 1998).

Além disto, componentes isolados dos venenos têm sido utilizados na clínica como anticoagulantes, como exemplo podemos citar as desintegrinas, que podem ser utilizados como antagonistas do receptor de fibrinogênio. Nestes casos, onde as integrinas parecem servir como via comum final, responsável pela formação das pontes plaquetas-plaquetas e conseqüente agregação plaquetária, quando bloqueadas levam portanto, à inibição da agregação plaquetária induzida por qualquer agente estimulante. Procedimentos clínicos sugerem que o bloqueio plaquetário é uma eficaz terapia antitrombótica (Markland, 1998). Recentemente, foi descrita a eficiência da neutralização de efeitos locais induzidos por uma metaloprotease hemorrágica do veneno de *Bothrops asper* por batimastate, um inibidor sintético de metaloprotease de matriz (Escalante *et al.*, 2000).

Como visto anteriormente, embora diversos inibidores de metaloproteases de venenos de serpentes já tenham sido isolados, dados sobre sua síntese, estrutura, mecanismo de ação e capacidade de inibir outras metaloproteases, ainda não estão completamente elucidados.

Considerando a homologia estrutural dos domínios catalíticos entre as SVMPs, ADAMs e MMPs, é possível fazer uma analogia entre o mecanismo de inibição destas metaloproteases (MMPs e ADAMs) com o das SVMPs.

Portanto, é de grande relevância a investigação da capacidade dos inibidores naturais isolados do soro de animais resistentes as SVMPs, para o uso potencial na terapêutica do envenenamento, assim como na investigação do mecanismo de ação destas toxinas e dos processos fisiológicos sobre os quais elas atuam; quanto as metaloproteases endógenas, como as ADAMs e MMPs, que estão associadas a diversas patologias (Woessner, 1991; Johnson *et al.*, 1998).

Os objetivos deste trabalho foram:

- Isolar o fator anti-hemorrágico presente no soro de *Philander opossum* e caracterizá-lo química e físico-quimicamente;
- Desenvolver nova técnica de purificação de duas metaloproteases hemorrágicas presentes no veneno de *Bothrops jararaca*;
- Estudar a interação do inibidor isolado de *Philander opossum* com as metaloproteases isoladas do veneno.

## II.1- Animais

Gambás: Foram utilizados animais de ambos os sexos, da espécie *Philander opossum*, capturados no Estado do Rio de Janeiro, R.J., de acordo com as normas recomendadas pelo IBAMA e mantidos em cativeiro no biotério do Departamento de Fisiologia e Farmacodinâmica, FIOCRUZ.

Ratos: Foram utilizados ratos Wistar machos, de 250-300g, do Biotério Central do Instituto Oswaldo Cruz, R.J.

Todos os experimentos com animais seguiram as normas éticas da Sociedade Internacional de Toxinologia.

## II.2 - Venenos e proteínas padrões

O veneno de *Bothrops jararaca* foi gentilmente cedido pela Dr. Aída Hasson Voloch, do Departamento de Biofísica da UFRJ. Utilizamos também veneno proveniente do Instituto de Biologia do Exército.

A jararagina utilizada foi cedida pelo Dr. Theakston, Laboratório de Medicina Tropical, Liverpool, Inglaterra.

Utilizamos padrões de massa molecular para cromatografias de filtração em gel provenientes da Pharmacia Biotech (Suécia); os padrões de massa molecular para eletroforese e de pontos isoelétricos foram provenientes da Sigma Chemical Co., EUA.

Foi utilizada soro albumina bovina (BSA) da Sigma Chemical Co., EUA.

## II.3- Reagentes

Ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), dodecil- sulfato de sódio (SDS), acrilamida, bis-acrilamida, fibrinogênio bovino, metanol, reagente de Folin e Ciocalteu, azul brilhante de

Coomassie, Triton x100, ácido tricloroacético (TCA), reagente de Schiff, da Sigma Chemical Co., EUA.

Acetonitrila da Lichrosolv da Merck.

Todos os outros reagentes utilizados foram de qualidade PA das marcas Merck, Vetec ou Reagen, Brasil.

## II.4- Géis de cromatografia

- Bio Gel P30 da Bio Rad,
- DEAE-Sephacel da Pharmacia Biotech,
- Colunas pré-empacotadas Superdex 75 (HR 10/30), MonoQ (HR 5/5), Phenyl Superose (HR 5/5) e Superdex 200 (HR 10/30) da Pharmacia Biotech.

## II.5- Equipamentos

- Analisador de aminoácidos LKB BIOCHROM 20 da Pharmacia,
- Balanças analíticas METTLER AE240, METTLER TOLEDO PB 3002,
- Centrífuga refrigerada BECKMAN J2-21M,
- Espectrofotômetro de massa Perkin-Elmer Voyager DE-PRO,
- Espectrofluorímetro Photon Technology,
- Potenciômetro Corning pHmeter 360i,
- Seqüenciador Shimadzu PPSQ-23 A,
- Sistema ÄKTA purifier da Pharmacia Biotech para cromatografia de baixa e média pressão,
- Sistema de eletroforese Mini-ProteanII, sistema de imunotransferência Mini-Trans-Blot, sistema de focalização isoeétrica Mini-IEF Cell da BIO RAD,
- Sistema de água Milli-Q plus da Millipore.

## II.6 - Obtenção do soro de *Philander opossum* (cuíca)

Os animais foram anestesiados com quetamina (5mg/kg massa corporal) por via intra-muscular. O sangue foi obtido através de punção cardíaca e mantido a 37°C por 2 horas, para formação do coágulo. Após, foi centrifugado a 7.800xg por 15 minutos. O soro obtido, cerca de 2mL por animal, foi submetido à

diálise sob agitação por 24 horas, a 4°C, contra tampão acetato de sódio 0,01M pH 3,7 e centrifugado a 7.800xg por 15 minutos, a 10°C.

## II.7 - Isolamento da fração antibotrópica (FAB) de *Philander opossum*

A metodologia empregada foi a mesma utilizada para obtenção da fração antibotrópica do soro de *Didelphis marsupialis* (gambá), desenvolvida por Perales e colaboradores em 1989, com algumas modificações. O soro (5mL) foi fracionado por cromatografia de troca aniônica em gel de DEAE-Sephacel (coluna de 1,0 x 10,5 cm), utilizando inicialmente tampão acetato de sódio 0,01M pH 3,7. Toda a corrida foi realizada a uma velocidade de fluxo de 10mL/hora. Utilizamos um gradiente linear com 3x o volume total da coluna, com o tampão inicial da coluna e com este mesmo tampão acrescido de 0,5M de NaCl. A seguir, fizemos eluição isocrática com tampão acetato de sódio 0,01M pH 3,7 acrescido de 0,5M de NaCl (5x o volume total da coluna). Foram coletados 2mL por tubo. O perfil cromatográfico foi obtido utilizando absorvância de 280nm.

## II.8- Isolamento de uma proteína a partir da fração antibotrópica

Por SDS-PAGE (eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS) analisamos as frações obtidas por DEAE-Sephacel por comparação com a fração antibotrópica isolada de *Didelphis marsupialis*. Nos tubos onde as frações apresentavam mobilidade semelhante à esta foram reunidos (aproximadamente 12mL) e precipitados com sulfato de amônio (80% de saturação). Ressuspendemos o precipitado com 300µL de tampão tris-HCl 20mM contendo 1mM de CaCl<sub>2</sub> e 1,2M de sulfato de amônio pH 7,4, este material foi submetido à cromatografia de interação hidrofóbica em gel de Phenyl Superose (coluna de 0,5 x 5,0 cm), com fluxo de 0,5mL/min. O gradiente linear foi realizado com 20x o volume total da coluna, utilizando o tampão de equilíbrio e o mesmo tampão sem adição de sulfato. Após o gradiente fizemos eluição isocrática com tampão tris-HCl 20mM contendo 1mM de CaCl<sub>2</sub> (5x o volume total da coluna). Foram coletados 0,5mL por

tubo. As frações (aproximadamente 5mL) obtidas foram armazenadas em freezer a  $-70^{\circ}\text{C}$ .

## II.9- Dosagem de proteínas

A determinação do conteúdo protéico de todas as amostras obtidas foi feita segundo o método de Lowry e colaboradores (1951). A curva padrão foi construída a partir de uma solução de 1mg/mL de soro albumina bovina (BSA), com pontos entre 10 e 50 $\mu\text{g}$ .

## II.10- Eletroforese em gel de poliacrilamida

As amostras foram analisadas utilizando sistema descontínuo, conforme o método descrito por Laemmli (1970). Os géis de concentração foram constituídos por 4% de acrilamida e os géis de corrida utilizados na concentração de 12,5% ou 15%. O tampão amostra foi utilizado na presença ou ausência de agente redutor ( $\beta$ -mercaptoetanol 5%). O tampão de corrida utilizado foi tris-glicina 0,05M pH8,3, com 0,1% de SDS. Todas as amostras foram aquecidas à  $100^{\circ}\text{C}$  por 5 minutos antes de serem aplicadas ao gel. As corridas duravam em média 40 minutos, utilizando voltagem constante de 200V. Os géis foram corados com azul brilhante de Coomassie R-250 ou por ácido periódico-Schiff.

## II.11- Detecção de glicoproteínas

As frações foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida 12,5% em presença de SDS e agente redutor ( $\beta$ -mercaptoetanol 5%). Foram aplicados 6 $\mu\text{g}$  de proteína de PO41 e DM43 e 10 $\mu\text{g}$  de proteína de FAB de *Didelphis marsupialis* e *Philander opossum*, em cada raia. Aplicamos 10 $\mu\text{g}$  de BSA (1mg/mL). O gel foi revelado por ácido periódico-Schiff, segundo metodologia descrita por Van-Seuningen e colaboradores, em 1992. Para isto, após eletroforese o gel foi mantido durante 5 minutos à  $20^{\circ}\text{C}$  em solução de 20% de TCA, sendo depois lavado

em água MilliQ por 5 minutos à 20°C. Após este tempo, o gel foi colocado em uma solução de ácido periódico 0,7% contendo 5% de ácido acético durante 10 minutos, sempre à temperatura de 20°C. O gel foi lavado por mais 2 vezes em água MilliQ por 2 minutos e submetido ao reagente de Schiff por 10 minutos (até que as bandas fossem coradas). Após a coloração, o gel foi mantido por 5 minutos em solução de dissulfito de potássio e ácido acético 5% e logo, em solução fixante de metanol 5% e ácido acético 7,5% a 50°C.

## II.12- Determinação do teor de glicosilação

As amostras foram desglicosiladas enzimaticamente com o kit da Bio Rad, que utiliza as enzimas PNGase F, NaNase II e O-glicosidase. As amostras a serem desglicosiladas (25µg de amostra dissolvida em 3µL de água MilliQ, com adição de 1µL de tampão de reação 5x - fosfato de sódio 250mM pH 6,0). Foram utilizados dois diferentes protocolos de desglicosilação, sem desnaturação, onde primeiramente adicionamos 2µL da enzima NANase II (10U/mL), após adicionamos 2µL da enzima O-Glicosidase (1U/mL) e incubamos à 37°C por 1 hora e logo, adicionamos 10µL de água MilliQ e 10µL de tampão de ajuste do pH (fosfato de sódio 0,5M), por fim, adicionamos 2µL da enzima PNGase F (2,5U/mL), incubamos por 24 horas à 37°C. O protocolo desnaturante, repete as primeiras etapas do anterior, adição à amostra da enzima NANaseII, adição da enzima O-Glicosidase, incubação por 1 hora, adição de água MilliQ e tampão de ajuste do pH, e após estas etapas, adicionamos 2,5µL de solução desnaturante (2% SDS e 1M β-mercaptoetanol) por 5 minutos à 100°C. Em seguida a amostra foi submetida a 4°C por 5 minutos, e adicionamos 2,5µL de NP-40 e 2 µL da enzima PNGase F, o material foi incubado à 37°C por 3 horas. A eficiência do método foi analisada por SDS-PAGE. Aplicamos aproximadamente 6µg de proteína de cada amostra por raia. Num segundo experimento utilizamos o mesmo protocolo desnaturante, dobrando o volume utilizado da enzima PNGase (2,5U/mL), além disto, aumentamos o tempo de incubação desta enzima (de 3 horas para 6 horas).

## II.13- Determinação do ponto isoelétrico

Utilizamos o sistema horizontal Mini IEF (BIO RAD) para determinarmos o ponto isoelétrico das amostras, em gel contendo poliacrilamida (3%), glicerol 25% e anfólitos para estabelecermos gradiente de pH de 3-5. Após 24 horas de polimerização do gel, as amostras e os padrões foram diluídos em 1 $\mu$ L de água MilliQ e aplicados no centro do gel. O gel foi colocado sobreposto aos eletrodos de grafite e submetido a 3 diferentes condições elétricas: 100V por 15 minutos; 200V por mais 15 minutos e 450V por 60 minutos. Foram aplicados 3 $\mu$ g de proteína de DM43 e PO41 em cada raia. Os seguintes padrões de pI foram utilizados: amiloglicosidase (3,50); glicose oxidase (4,15); inibidor trípítico de soja (4,55) e  $\alpha$ -lactoalbumina A (5,20). Após a corrida, o gel foi corado com azul de Comassie R-250.

## II.14- Imunorevelação

As amostras foram eletrotransferidas, após eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de SDS e agente redutor ( $\beta$ -mercaptoetanol), para uma membrana de PVDF (Immobilon-P, 0,45 $\mu$ M), utilizando o sistema Mini Trans-Blot (BIO RAD). Foram aplicadas 10ng das frações antibotrópicas e 5ng de PO41 e DM43. As corridas duravam em média 1hora, utilizando voltagem constante de 100V. A revelação foi feita com anticorpo policlonal anti-FAB produzido em coelhos, para isto a fração antibotrópica de *Didelphis marsupialis* foi submetida à SDS-PAGE 12,5% e as bandas referentes as proteínas foram cortadas e secas em Speed Vac por 24 horas. Após a secagem, as bandas foram maceradas, ressuspensas em água destilada e emulsionadas com adjuvante de Freund incompleto e finalmente, injetadas por via subcutânea no dorso do coelho. O animal foi sangrado por punção cardíaca por 3 vezes, antes de ser injetado por reforço de antígeno. O sangue permaneceu por 30 minutos a 37°C por 30 minutos e centrifugado a 1160xg por 15 minutos (Neves-Ferreira *et al.*, 1999). O reagente secundário utilizado foi IgG anti-IgG de coelho, conjugada com peroxidase (Sigma).

## II.15- Determinação da composição de aminoácidos

As amostras (60 $\mu$ g) foram hidrolisadas sob vácuo e sob saturação de nitrogênio, usando HCl 5,7N por 24 e 48 horas a

108°C, na estação Pico Tag (Waters). Utilizamos o analisador automático Biochrom 20 (Pharmacia). A composição em aminoácidos foi calculada utilizando o maior valor obtido para cada aminoácido, com exceção de treonina e serina, que foram estimadas extrapolando-se ao tempo zero (Spackman *et al.*, 1958). Após a separação cromatográfica dos aminoácidos por coluna de troca iônica, os aminoácidos foram derivatizados (derivatização pós-coluna) utilizando ninhidrina para reagir com os grupos amino primários. Todos os aminoácidos, com exceção da prolina, foram detectados espectrofotometricamente a 570nm. A prolina foi detectada a 440nm.

## II.16- Seqüenciamento de aminoácidos

As amostras foram desalinizadas utilizando cartucho Prosorb (Perkin Elmer), para isto, completamos seu volume total até 100µL com TFA 0,1%. A membrana de PVDF do cartucho foi umedecida com 10µL de metanol e a amostra foi aplicada e lavada com até 750µL de TFA 0,1%. Aplicamos aproximadamente 200pmoles de cada proteína no cartucho, que foram seqüenciadas diretamente no PVDF. A determinação da seqüência N-terminal foi feita em seqüenciador de proteínas Shimadzu PPSQ-23A. Neste equipamento, as seqüências são realizadas segundo metodologia desenvolvida por Edman (1950). Foram realizados de 20-30 ciclos por amostra. Os PTH-aa foram separados em HPLC em coluna de fase reversa C18 com eluição isocrática.

## II.17- Determinação da massa molecular do inibidor de *Philander opossum*

Utilizamos cromatografia de gel filtração em coluna Superdex 200 (1,0 x 30 cm) para determinarmos a massa molecular das amostras em condições nativas. Os padrões utilizados para construirmos a curva de calibração foram BSA (67kDa); ovalbumina (43kDa) e quimotripsinogênio (25kDa). A di-BSA (134kDa), forma dimérica de BSA, presente neste padrão, também foi utilizada.

A massa molecular do inibidor de *Philander opossum* também foi determinada por espectrometria de massa por ionização a laser assistida por matriz - tempo de voo (MALDI-TOF MS), em equipamento Perkin-Elmer Voyager DE-PRO. Este

experimento foi realizado no laboratório do Dr. Jay Fox, na Virgínia, EUA.

## II.18- Isolamento das proteínas do veneno de *Bothrops jararaca*

O veneno total (10mg) foi diluído em 250 $\mu$ L de tampão tris-HCl 20mM + CaCl<sub>2</sub> 20mM + NaCl 150mM pH 7,5, e fracionado em cromatografia de filtração em gel em coluna Superdex 200 (1,0 x 30cm), utilizando fluxo constante de 0,5mL/min, no sistema ÄKTA (Pharmacia). Foram coletadas frações de 0,5mL/tubo na presença de gelo no coletor de frações. As diferentes frações foram reunidas em “pools”, de acordo com análise eletroforética em gel de poliacrilamida e precipitadas separadamente com sulfato de amônio, a 80% de saturação, a 4°C.

Todos os perfis cromatográficos foram obtidos utilizando absorvância de 280nm.

## II.19- Purificação da jararagina

O “pool”I isolado por filtração em gel (15mL), que continha as proteínas de maiores massas moleculares presentes no veneno, incluindo a jararagina (52kDa, EC 3.4.24.73) foi precipitado com sulfato de amônio com 80% de saturação, e ressuspenso em 1ml de tampão de equilíbrio tris-HCl 20mM + CaCl<sub>2</sub> 1mM + sulfato de amônio 1,2M pH 7,4 e logo, submetido à cromatografia de interação hidrofóbica em coluna de Phenyl Superose (coluna de 0,5 x 5,0 cm), com fluxo de 0,5mL/min. Foram coletados 0,5mL por tubo. As amostras foram eluídas com gradiente linear contínuo decrescente de sulfato de amônio, com 20x o volume total da coluna. Após o gradiente realizamos eluição isocrática com tampão tris-HCl 20mM + CaCl<sub>2</sub> 1mM (5x o volume total da coluna). O material obtido foi analisado por eletroforese em gel de poliacrilamida 12,5%. As frações que possuíam proteína com mobilidade semelhante ao padrão de jararagina utilizado foram mais uma vez precipitadas (6mL) com sulfato de amônio a 80% de saturação e o precipitado foi ressuspenso em 1mL de tampão de

equilíbrio (tris-HCl 20mM + CaCl<sub>2</sub> 1mM pH 6,8). O material foi submetido à diálise contra o mesmo tampão por 24 horas a 4°C e aplicado numa coluna Mono Q (coluna 0,5 x 5,0 cm) com fluxo de 1mL/min. O gradiente utilizado foi linear crescente, com 25x o volume total da coluna, utilizando o tampão de equilíbrio e este mesmo contendo 350mM de NaCl. Além disto, após o gradiente fizemos eluição isocrática, com 5x o volume total da coluna, com tampão de equilíbrio acrescido de NaCl 1M. Foram coletados 1mL/tubo. As amostras foram aliqüotadas em tubos Eppendorf a -70°C.

Toda a purificação foi feita em presença de gelo, tanto nas etapas cromatográficas (coletor de frações), quanto nas etapas de precipitação.

A identidade da jararagina purificada foi confirmada por espectrometria de massa, após digestão triptica. A análise do mapa peptídico do nosso material em comparação com os peptídeos teóricos de jararagina foi realizada utilizando o programa 'MS FIT', no laboratório do Dr. Jay Fox, na Virgínia, EUA.

## II.20- Purificação da proteína de baixo peso molecular do veneno (BP)

O pool III (15mL) obtido por filtração em gel em Superdex 200, que demonstrou a presença de proteínas de baixo peso molecular identificadas por SDS-PAGE, onde a botrolisina (23kDa, EC 3.4.24.50) está incluída, foi igualmente submetido à precipitação com sulfato de amônio a 80% de saturação a 4°C e o precipitado foi ressuspenso em 1mL de tampão tris-HCl 20mM + CaCl<sub>2</sub> 1mM + sulfato de amônio 1,2M pH 7,4 e submetido à cromatografia de interação hidrofóbica em coluna de Phenyl Superose (coluna de 0,5 x 5,0 cm), com fluxo de 0,5mL/min. O gradiente linear decrescente, com 20x o volume total da coluna, foi

efetuado utilizando-se mesmo tampão na ausência de sulfato de amônio. Após o gradiente fizemos eluição isocrática com tampão tris-HCl 20mM + CaCl<sub>2</sub> 1mM com 13x o volume total da coluna. Foram coletados 0,5mL/tubo. O material eluído foi analisado por eletroforese em gel de poliacrilamida 12,5%. As alíquotas foram armazenadas a -70°C. Igualmente, toda a purificação foi realizada em presença de gelo, tanto nas etapas cromatográficas (coletor de frações), quanto nas etapas de precipitação e alíquotagem das amostras.

## II.21- Fracionamento da proteína de baixo peso molecular

O material obtido por Phenyl Superose (picos 3 e 4) foi cromatografado em Superdex 75 (coluna de 1,0 x 30cm) utilizando tampão tris-HCl 20mM+ CaCl<sub>2</sub> 20mM + NaCl 1M pH 8,5, com fluxo de 0,5mL/min. Foram coletados 0,5mL/tubo. As amostras foram analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida 15% na presença de SDS e agente redutor ( $\beta$ -mercaptoetanol).

## II.22- Determinação da massa molecular da proteína de baixo peso molecular

Utilizamos cromatografia de gel filtração em coluna Bio Gel (coluna de 0,8x 22cm) para determinarmos a massa molecular da amostra em condições nativas. Os padrões utilizados para construirmos a curva de calibração foram quimotripsina (25 kDa), ribonuclease (13,7 kDa) e aprotinina (6,5 kDa).

## II.23- Atividade fibrinogenolítica das enzimas isoladas e inibição

A análise da atividade fibrinogenolítica foi realizada segundo metodologia descrita por Ouyang e Huang (1976), com algumas modificações. Para determinarmos a dose de enzimas a serem utilizadas no experimento de atividade fibrinogenolítica, avaliamos a extensão da hidrólise por 0,1-2µg de botrolisina e 0,01-0,5µg de jararagina, em dois diferentes tempos de incubação (5 e 10 minutos).

Utilizamos 0,5µg de ambas as enzimas para testarmos a inibição da atividade fibrinogenolítica. Primeiramente, incubamos misturas enzima/inibidor, a 37°C em tampão tris-HCl 20mM + CaCl<sub>2</sub> 20mM + NaCl 150mM pH7,5 e, após 10 minutos de incubação, acrescentamos 10µg de fibrinogênio (5mg/mL). Incubamos por mais 5 minutos a 37°C e paramos a reação com adição de tampão amostra 5x concentrado. As análises foram feitas por SDS-PAGE. Os inibidores foram utilizados em relação molar de 1mol de monômero, utilizando como massa molecular 41kDa para PO41, para um mol de monômero utilizando 52kDa para a jararagina e 23kDa para botrolisina. Os controles foram feitos utilizando EDTA no lugar dos inibidores, somente o fibrinogênio ou somente os inibidores.

## II.24- Atividade da jararagina em substrato sintético e inibição por PO41

Utilizamos o substrato fluorogênico sintético 2Abz- Ala- Gly- Leu- Ala- 4Nba (Fox *et al*, 1986). O primeiro grupamento é o fluoróforo 2 aminobenzoil e o último era o supressor 4 nitrobenzilamida, que era liberado quando havia hidrólise, permitindo o aumento na emissão de fluorescência. Os ensaios foram feitos com tampão tris-HCl 20mM + CaCl<sub>2</sub> 20mM + NaCl 150mM pH 7,5, utilizando 100µM de substrato e 0,05 µM de jararagina. Os experimentos foram realizados a 37°C, sob agitação magnética, em espectrofluorímetro (Photon Technology). Os comprimentos de onda de excitação e emissão utilizados foram 340nm e 415nm, respectivamente. Nos ensaios de inibição, utilizamos relações molares diferentes entre a enzima e o inibidor (1:1; 1:0,5 e 1:0,25). Estes foram incubados por 5 minutos a 37°C, antes do início dos ensaios.

## II.25- Atividade hemorrágica e anti-hemorrágica

A atividade hemorrágica da jararagina foi avaliada segundo Kondo *et al.*, 1960. Os ratos foram anestesiados com éter e 15µg de jararagina (288,5pmoles), dose hemorrágica mínima previamente determinada, foram injetados por via intradérmica no dorso depilado dos animais (grupos de 6). A atividade anti-hemorrágica de PO41 foi avaliada incubando-se, por 30 minutos 1 dose hemorrágica mínima de jararagina a 37°C, com 577pmoles, ou 24µg do inibidor, relação estequiométrica de 1:2. Após 24 horas, os ratos foram sacrificados com éter, e a pele do dorso foi retirada para avaliarmos a inibição da atividade hemorrágica.

## II.26- Formação de complexo entre PO41 e as enzimas isoladas do veneno

Utilizamos 192 pmoles de jararagina (0,33mg/mL) e de PO41 (0,32mg/mL) no ensaio de titulação da formação de complexo. As misturas de enzimas/inibidores foram incubadas por 5 minutos a 37 °C e submetidas à cromatografia de filtração em gel Superdex 200 (coluna de 1,0 x 30cm). As amostras eluídas (0,5mL/tubo) foram recolhidas e precipitadas com TCA 50% para posterior análise da formação do complexo por SDS-PAGE 12,5% na presença e ausência de agente redutor ( $\beta$ -mercaptoetanol).

As áreas referentes ao inibidor (PO41) e a enzima (jararagina) livres e ao complexo formado foram plotadas para construção de um gráfico, para visualização da estequiometria do complexo formado.

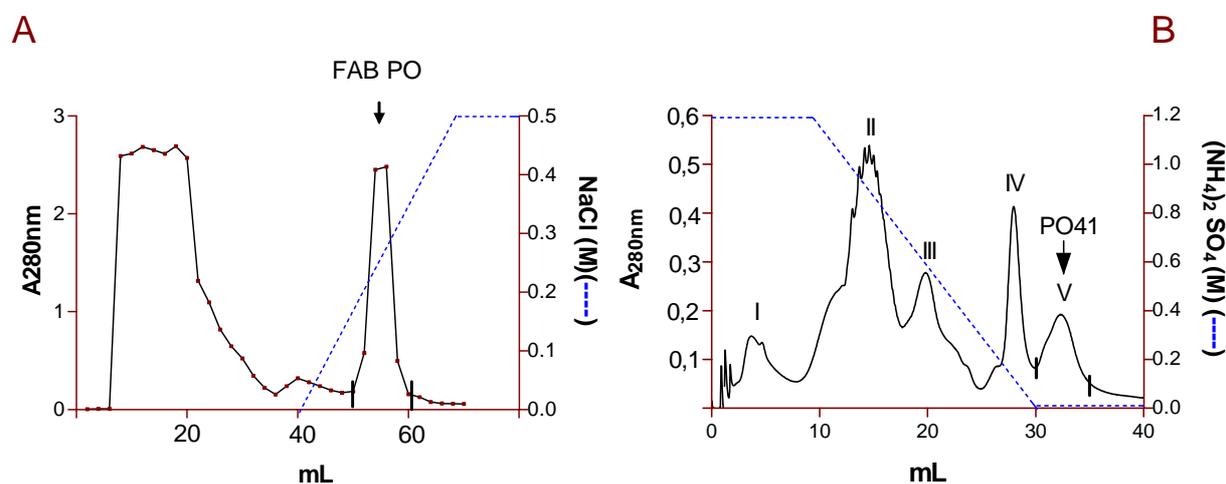
O ensaio de formação de complexo com as proteínas de baixo peso molecular (BP1 e BP2) foi essencialmente qualitativo.

### III.1- Isolamento do inibidor de *Philander opossum*

O fracionamento de 5 mL de soro de *Philander opossum* por DEAE-Sephacel resultou em 2 picos principais; o primeiro eluído com o tampão de equilíbrio e o último, com aproximadamente 0,25M de NaCl, como indicado na figura 1A. Foram coletados 2mL/tubo. As frações eluídas foram analisadas por SDS-PAGE e comparadas com a fração antibotrópica previamente isolada de *Didelphis marsupialis*. O pico eluído com gradiente salino apresentou uma fração com mobilidade semelhante à antibotrópica. Todos os tubos pertencentes a este pico (12mL) foram reunidos e precipitados para serem submetidos à cromatografia em Phenyl Superose (Fig. 1B). Por esta cromatografia obtivemos 5 picos (I-V). O quinto pico (V) apresentou apenas 1 banda por eletroforese de aproximadamente 45kDa (raia 4, Fig.2), migração pouco maior que a encontrada para DM43 (raia 5, Fig.2).

### III.2- Determinação da massa molecular do inibidor de *Philander opossum*

Por MALDI-TOF obtivemos massa de 41.330 u.m.a. (Fig.3), razão pela qual denominamos esta fração de PO41. Entretanto, por filtração em gel, obtivemos 61,5kDa de massa molecular nativa para a fração isolada de *Philander opossum* (Fig.4).

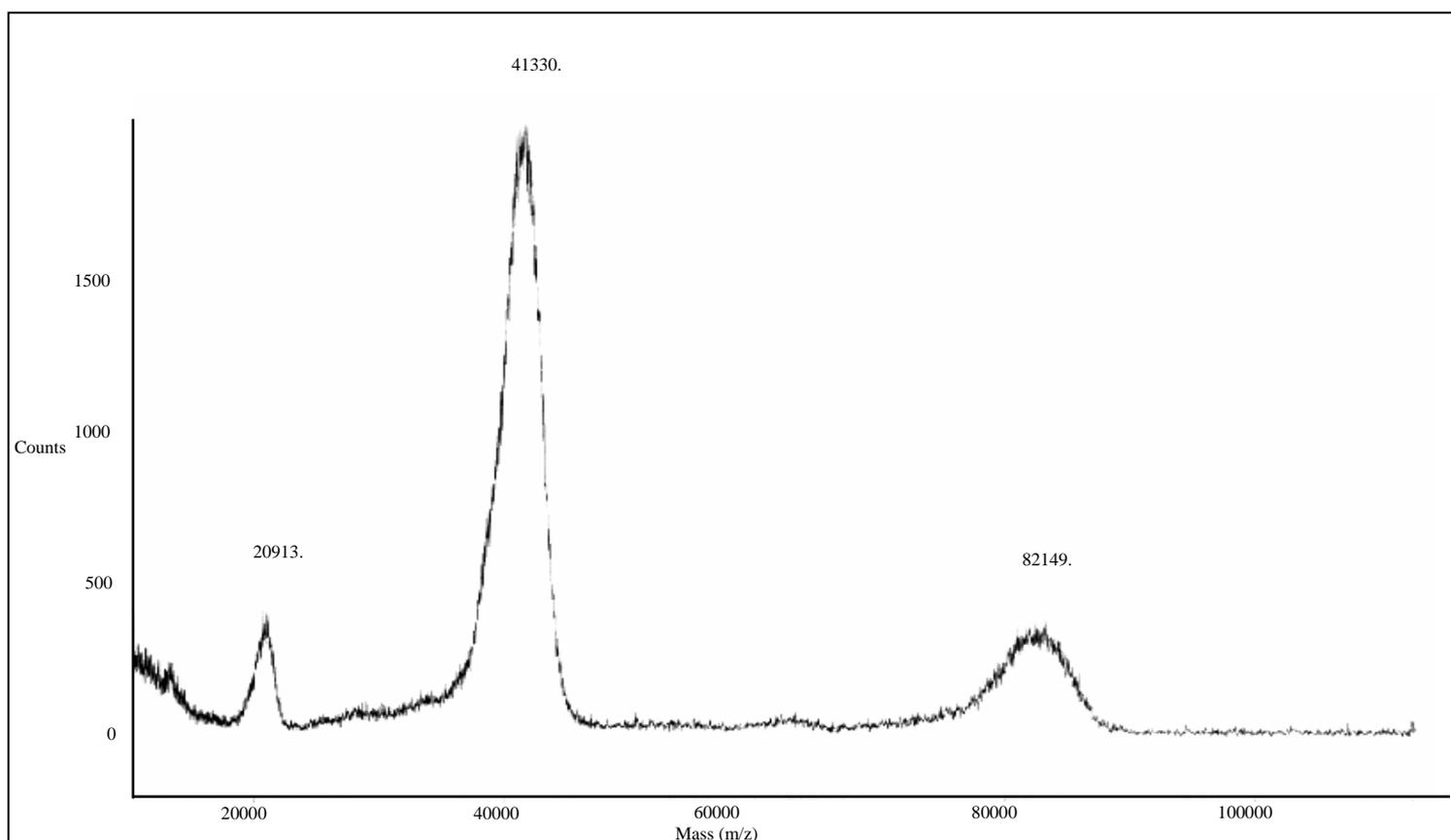


**Fig.1A- Cromatografia de troca iônica em DEAE-Sepharcel (coluna de 1,0 x 10,5 cm)** - Foram aplicados 5mL de soro de *Philander opossum*. Eluição inicial com tampão acetato de sódio 0,01M pH 3,7, seguido de gradiente linear até 0,5M de NaCl no mesmo tampão. Toda corrida foi realizada a 10mL/hora. Foram coletados 2mL por tubo.

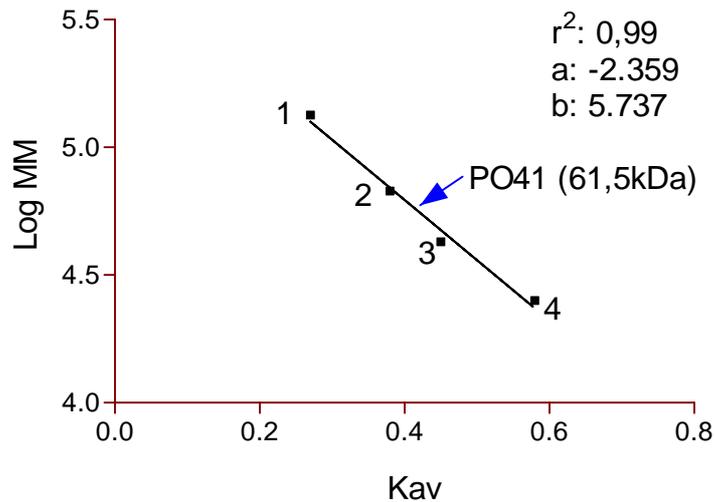
**B- Cromatografia de interação hidrofóbica em Phenyl-Superose (coluna de 0,5 x 5,0 cm)** - A fração antibotrópica (FAB) obtida por DEAE-Sepharcel foi aplicada em 300µL de tampão de equilíbrio tris-HCl 20mM contendo 1mM de CaCl<sub>2</sub> e 1,2M de sulfato de amônio pH 7,4, com fluxo de 30mL/hora. Foi realizado gradiente linear decrescente de sulfato de amônio. Foram coletados 0,5mL por tubo.



**Fig.2- SDS-PAGE (Laemmli-12,5%) das etapas de purificação de PO41 de *Philander opossum*.** 1- Padrão de massa molecular; 2- Soro total de *P. opossum*; 3- FAB de *P. opossum* (10 $\mu$ g); 4- PO41 isolada de Phenyl Superose (6 $\mu$ g); 5- DM43 de *D.marsupialis* (6 $\mu$ g) e 6- FAB de *D.marsupialis* (10 $\mu$ g). Gel corado com azul brilhante de Coomassie.



**Fig.3- Massa molecular por MALDI-TOF da proteína isolada de *Philander opossum*.**



**Fig.4 - Curva de Calibração para o cálculo de massa molecular de PO41-** Condições nativas por filtração em gel em Superdex 200 (coluna 1,0 x 30cm). 1- Di-BSA (134kDa); 2- BSA (67kDa); 3- ovoalbumina (43kDa) e 4- quimotripsina (25kDa).

### III. 3- Seqüenciamento N-terminal de PO41

Os 27 resíduos N-terminais identificados de PO41 demonstraram grande identidade com DM40 e DM43. Com o alinhamento verificamos algumas heterogeneidades, o sexto resíduo prolina em DM40 e 43 é substituído por uma treonina em PO41; o nono resíduo de DM40 arginina substitui a prolina presente tanto em PO41, quanto em DM43; o décimo quarto resíduo treonina em ambas DMs é substituído por serina em PO41, todas as modificações apresentadas são não-conservativas, com exceção da substituição serina por treonina no décimo quarto resíduo, como mostra os resíduos realçados (azul) no alinhamento abaixo. Os resíduos 23 em DM43 e 25 em PO41 não foram identificados.

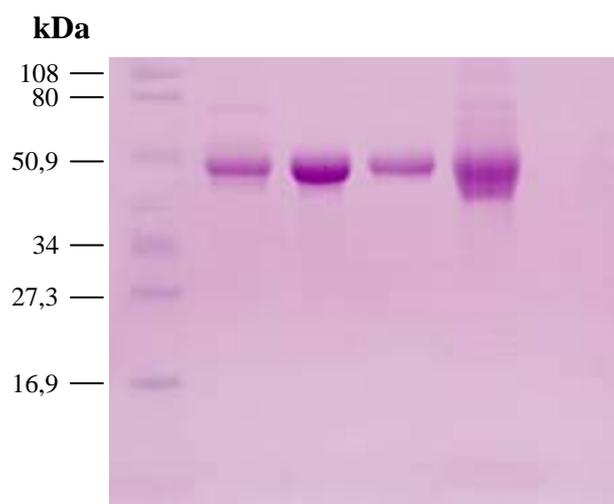
• 5
• 10
• 15
• 20
• 25

PO41-L K A M D **T** T P P L W I K **S** E S P S T P W T R V X L L  
 DM43-L K A M D P T P P L W I K T E S P S T P W T X V T L L  
 DM40-L K A M D P T P **R** L W I K T E S P S

**Fig.5-Comparação das seqüências N-terminais dos fatores anti-hemorrágicos isolados de *Didelphis marsupialis* (DM40 e DM43) e de *Philander opossum* (PO41)-** O seqüenciamento foi realizado utilizando-se a química de Edman, no seqüenciador automático Shimadzu.

### III.4- Natureza glicoprotéica de PO41

Como podemos observar na figura 6, todas as amostras aplicadas no gel (FAB de *Philander opossum* ; PO41; DM43 e FAB de *Didelphis marsupialis*) foram reveladas pelo ácido periódico - Schiff, o que indica a natureza glicoprotéica das amostras. Somente o controle negativo (BSA, raia 6) não foi revelado.



**Fig.6- SDS-PAGE (Laemmli-12,5%) das amostras de *Philander opossum* e *Didelphis marsupialis*-** Revelação com ácido periódico - Schiff. 1- Padrão de massa molecular pré-corado com azul brilhante de Coomassie; 2- FAB de *Philander opossum* (10µg); 3-PO41(6µg); 4-DM43 (6µg); 5-FAB de *Didelphis marsupialis* (10µg) e 6- BSA (10µg).

### III.5- Imunotransferência de PO41

PO41 foi revelada por anticorpo policlonal anti-FAB de *Didelphis marsupialis* assim como DM43. Além disto, as frações antibotrópicas de ambas também foram reveladas, demonstrando inclusive, a presença de uma segunda proteína de maior mobilidade na fração antibotrópica isolada de *Philander opossum* (raia 5), antes não identificada por eletroforese.



**Fig.7- Imunotransferência de PO41.** Amostras reveladas por anticorpo policlonal de coelho preparado contra a fração antibotrópica de *Didelphis marsupialis*. 1- Padrão de massa molecular pré-corado; 2- FAB de *D.marsupialis* (10ng); 3- DM43 (5ng); 4- PO41(5ng) e 5- FAB de *Philander opossum* (10ng).

### III.6- Focalização Isoelétrica de PO41

Aplicamos, além dos padrões de pontos isoelétricos, uma amostra referência de amiloglicosidase isolada (pI 3,5). As duas proteínas (DM43 e PO41) localizaram-se na mesma região. Ambas mostraram-se difusas no gel, assim como os padrões com pI muito ácidos (Fig.8). De acordo com os padrões utilizados e comparação com a amiloglicosidase, estimamos um pI inferior a 3,5 para PO41.





**Fig.8- Focalização isoeétrica de PO41- Gel de poliacrilamida com anfólitos de 3-5. O gel foi corado com azul brilhante de Coomassie R-250. 1- Padrões de pI; 2- amiloglicosidase; 3- DM43 (3µg) e PO41(3µg).**

### III.7- Composição de aminoácidos de PO41

Tabela I: Composição de aminoácidos de PO41.

O conteúdo de aminoácidos de PO41, DM43 e DM40 obtido revela grande similaridade entre as amostras. PO41 possui grande conteúdo (42,64%) de resíduos hidrofóbicos (alanina, valina, isoleucina, leucina, triptofano, prolina e fenilalanina) (Lehninger, 1986). Além disto, foram determinadas 3 metioninas e 6 meias cistinas.

Aminoácido	PO41	DM40*	DM43*
------------	------	-------	-------

Ácido aspártico	22	26	24
Treonina	20	21	20
Serina	22	22	22
Ácido glutâmico	30	28	28
Glicina	18	22	20
Alanina	22	14	17
Valina	18	22	18
Cisteína	6	6	6
Metionina	3	3	4
Isoleucina	11	11	11
Leucina	26	27	25
Tirosina	7	7	7
Fenilalanina	14	14	13
Lisina	13	12	13
Histidina	2	2	3
Arginina	13	15	12
Prolina	25	28	25
Triptofano	nd	10	9
Total	272	290	277

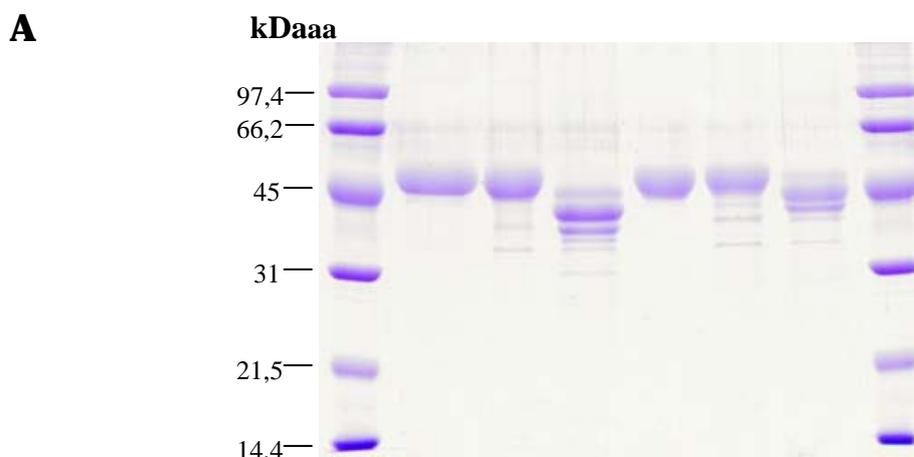
\* Neves-Ferreira *et al.*, 2000.

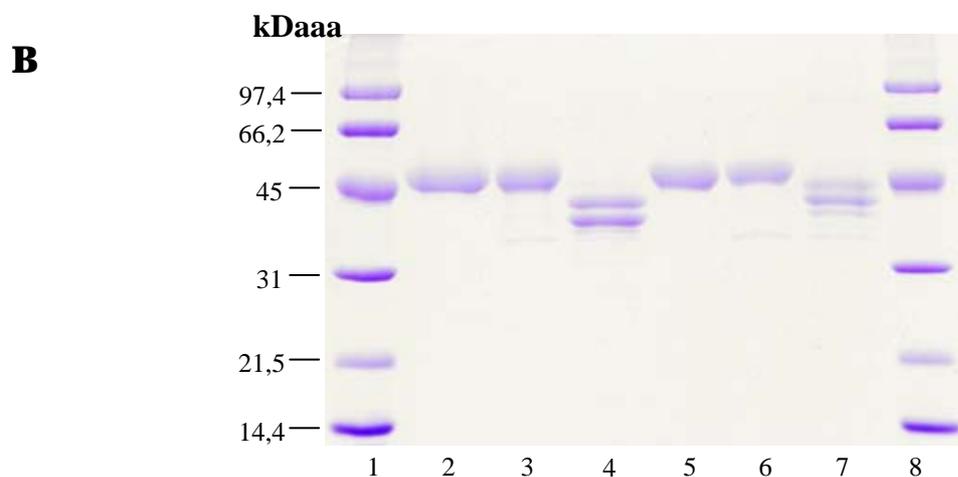
nd- não demonstrado

Os valores assumidos são o maior valor obtido para cada aminoácido, com exceção de treonina e serina, que foram estimadas extrapolando-se ao tempo zero.

### III.8- Desglicosilação enzimática de PO41

Como podemos observar na figura 9, não obtivemos desglicosilação total das amostras, independentemente das condições utilizadas. Porém o protocolo desnaturante parece ter sido mais eficaz. Na figura B observamos menos heterogeneidades nas amostras tratadas com protocolo desnaturante (raias 4 e 7). Além disto, verificamos mais eficácia na desglicosilação de DM43 (raia 4, A e B), quando comparada com PO41 (raia 7, A e B).





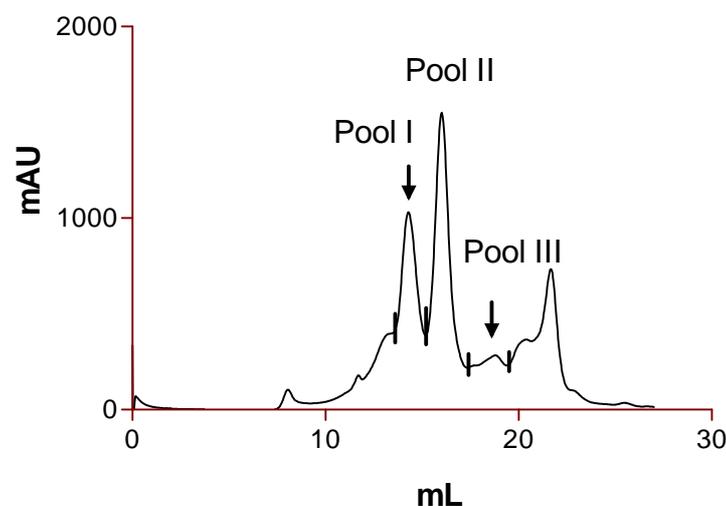
**Fig.9 A e B- SDS-PAGE (Laemmli-12,5%) da deglicosilação enzimática de PO41.** 1- Padrão de massa molecular; 2-DM43; 3-DM43 deglicosilada em condições nativas; 4- DM43 deglicosilada em condições desnaturantes; 5- PO41; 6- PO41 deglicosilada em condições nativas; 7- PO41 deglicosilada em condições desnaturantes e 8- Padrão de massa molecular. No gel B foram utilizadas o dobro da concentração de enzima (PNGase) e aumento no tempo de incubação. Gel corado com azul brilhante de Coomassie.

### III.9- Isolamento da jararagina do veneno de *Bothrops jararaca*

De acordo com análise eletroforética do fracionamento do veneno total (10mg) por cromatografia de filtração em gel em Superdex 200, reunimos as frações em 3 diferentes “pools” (I-III), figuras 10 e 11. O pool I foi precipitado com sulfato de amônio (80% de saturação) e submetido à cromatografia de interação hidrofóbica em coluna de Phenyl Superose (Fig.12). Nesta etapa obtivemos 3 principais picos (1-3). O último deles, eluído no final do gradiente de sulfato de amônio, é onde se encontra a proteína com mobilidade semelhante à jararagina. Por análise em eletroforese observamos que na parte ascendente pico 3 (a-b) é

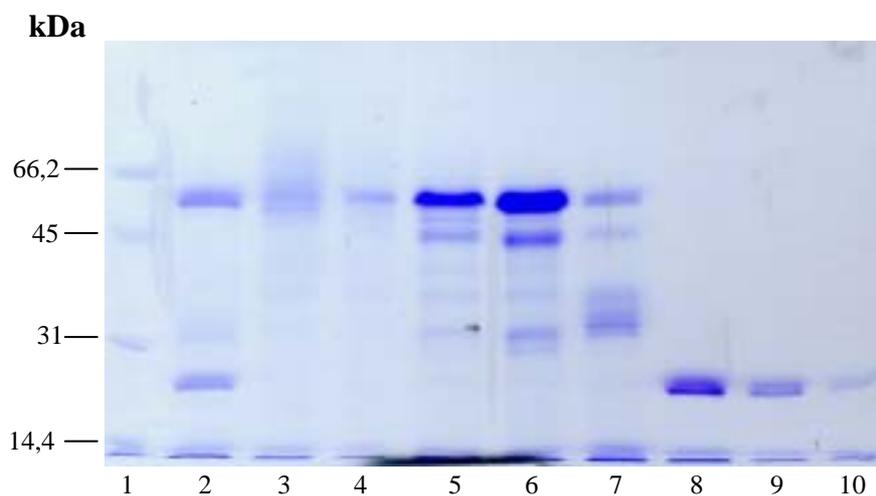
onde se encontra a proteína mais pura; no ápice e na parte descendente do pico (c-e) as frações apresentam uma contaminação de aproximadamente 45kDa (Fig.13). Portanto, reunimos as frações a-b do pico 3 para serem precipitadas e aplicadas em cromatografia de troca iônica Mono Q (Fig.14). O pico principal eluído com aproximadamente 0,35M de NaCl, o ápice do pico (b) apresentou fração homogênea com mobilidade semelhante à jararagina padrão utilizada, como mostra a eletroforese da figura 15. A parte descendente do pico (c-e) foi recromatografada nas mesmas condições.

Foram necessárias 10 corridas cromatográficas, onde aplicávamos 10mg de veneno total em cada, para obtenção de 1mg da proteína com a mesma mobilidade da jararagina. Confirmamos a identidade deste proteína isolada por espectrometria de massa após digestão trípica. Dos 55% dos peptídeos gerados pela hidrólise, todos apresentaram identidade com os peptídeos teóricos da jararagina.

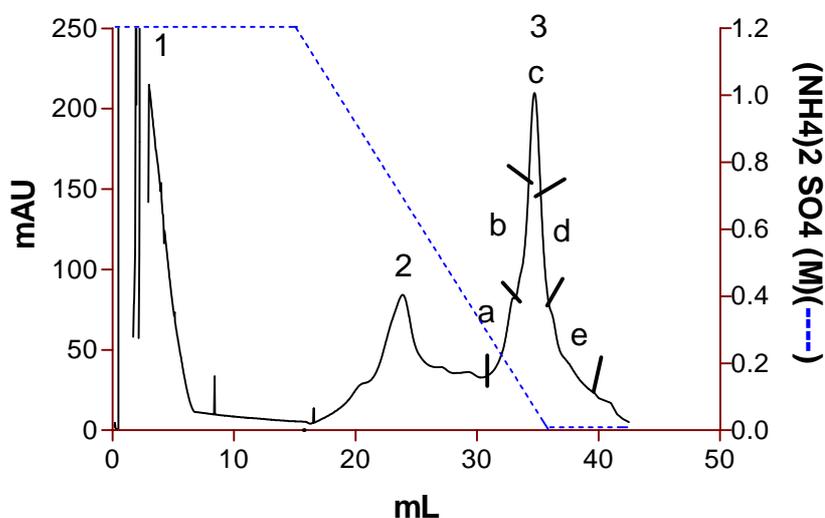


**Fig.10-Cromatografia de filtração em gel do veneno de *Bothrops jararaca*-** Foram aplicados 10mg de vBj em Superdex

200 (coluna de 1,0 x 30 cm) utilizando como tampão de equilíbrio tris-HCl 20mM, contendo CaCl<sub>2</sub> 20mM e NaCl 150mM pH 7,5, com fluxo constante de 30mL/hora. Foram coletados 0,5mL/tubo.

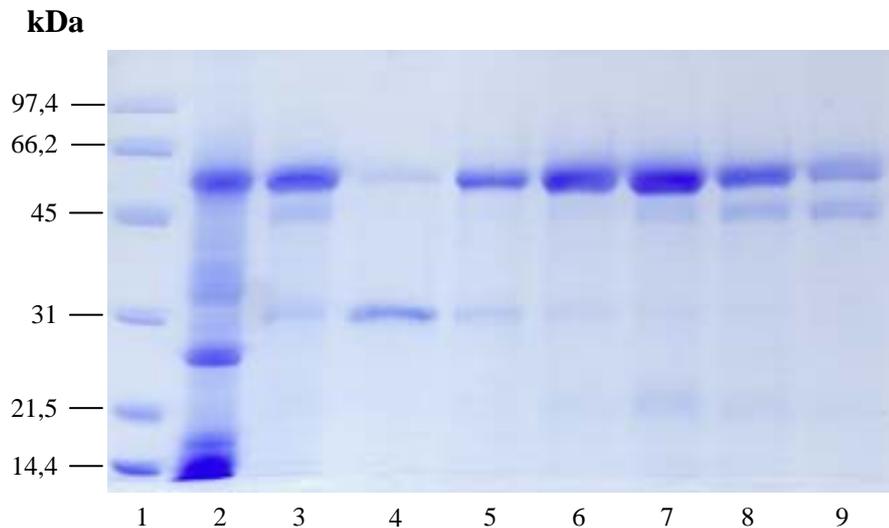


**Fig.11-SDS-PAGE (Laemmli-12,5%) das frações de veneno obtidas por Superdex 200.** 1- Padrão de massa molecular; 2- veneno total; 3-6- Pool I; 7- Pool II; 8-10- Pool III. Gel corado com azul brilhante de Coomassie.

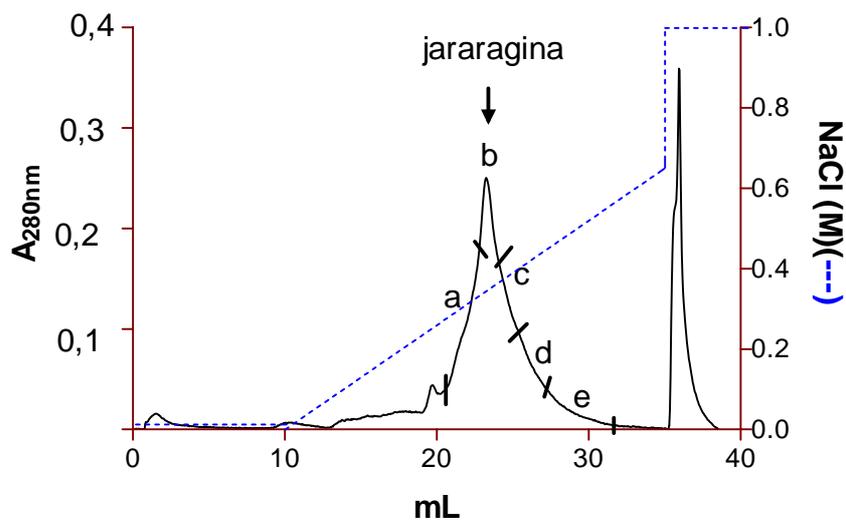


**Fig. 12-Cromatografia de interação hidrofóbica em Phenyl Superose (coluna de 0,5 x 5,0 cm) do Pool I obtido por Superdex 200.** Utilizamos tampão tris-HCl 20mM contendo CaCl<sub>2</sub>

1mM e sulfato de amônio 1,2M pH 7,4. A eluição foi feita com gradiente linear decrescente de sulfato de amônio. Fluxo de 30mL/hora. Foram coletados 0,5mL/hora.



**Fig.13-SDS-PAGE (Laemmli-12,5%) das frações obtidas por Phenyl Superose.** 1-Padrão de massa molecular; 2- veneno total; 3- Pool I de Superdex; 4- Pico 2; 5-9- Pico 3 (a-e). Gel corado com azul brilhante de Coomassie.



**Fig.14-Cromatografia de troca iônica em Mono Q (coluna de 0,5 x 5,0 cm) do pico 3 (a-b) obtido por Phenyl Superose-**

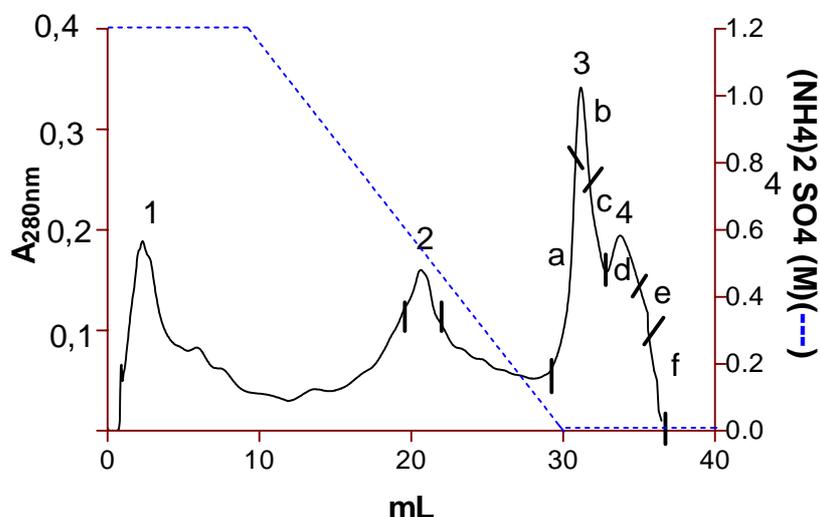
Utilizamos tampão de equilíbrio tris-HCl 20mM, contendo CaCl<sub>2</sub> 1mM pH 6,8. Inicialmente, a eluição foi realizada com gradiente linear crescente de NaCl até 350mM e logo, isocraticamente com o tampão de equilíbrio contendo NaCl 1M, com fluxo de 60mL/hora. Coletamos 1mL/tubo.

**Fig.15-SDS-PAGE (Laemmli-12,5%) das frações obtidas por Mono Q.** 1- Padrão de massa molecular; 2- veneno total; 3- Pico 3 de Phenyl Superose; 4-fração a; 5 fração b; 6- padrão de jararagina e 7-9- frações (c-e). Gel corado com azul brilhante de Coomassie.

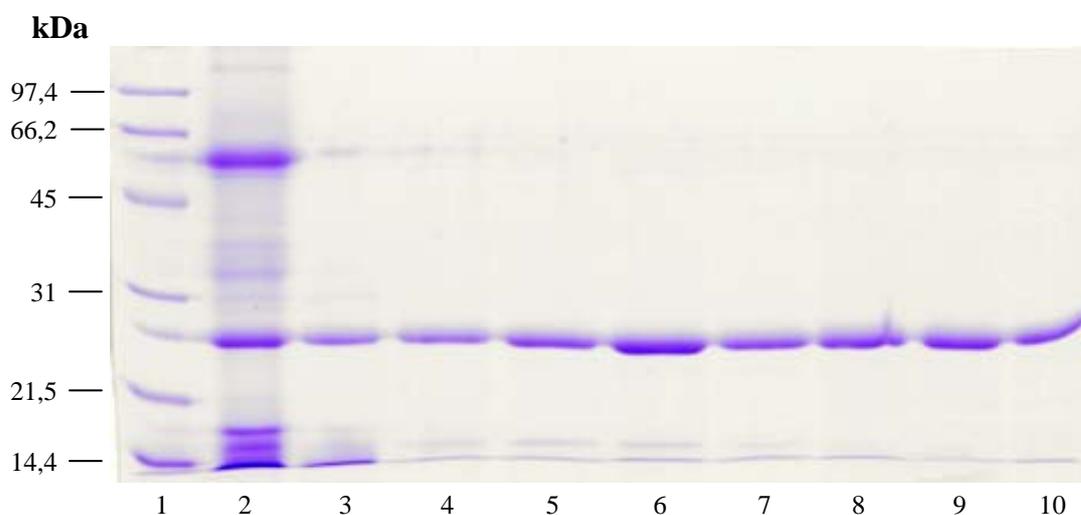
### III.10- Purificação da proteína de baixo peso molecular do veneno de *Bothrops jararaca* (BP)

Em razão da presença de uma proteína de baixo peso molecular muito homogênea fracionada por cromatografia de filtração em gel em Superdex 200 (Pool III da figura 10), e analisada por SDS-PAGE (Fig.11), resolvemos purificá-la, utilizando apenas mais uma etapa cromatográfica (em gel de Phenyl Superose). Por esta coluna obtivemos 4 picos principais (1-4). Por análise em eletroforese, verificamos que no pico 2 obtínhamos uma fração de aproximadamente 50kDa, contaminando a fração de 23kDa (raia4). Nos picos 3 e 4 eluídos após o gradiente, obtivemos fração parcialmente homogênea de

aproximadamente 23kDa, com pequena contaminação de uma proteína de menor massa molecular ( $\cong$  15kDa), como demonstrado na figura 17 (raias 5-10).



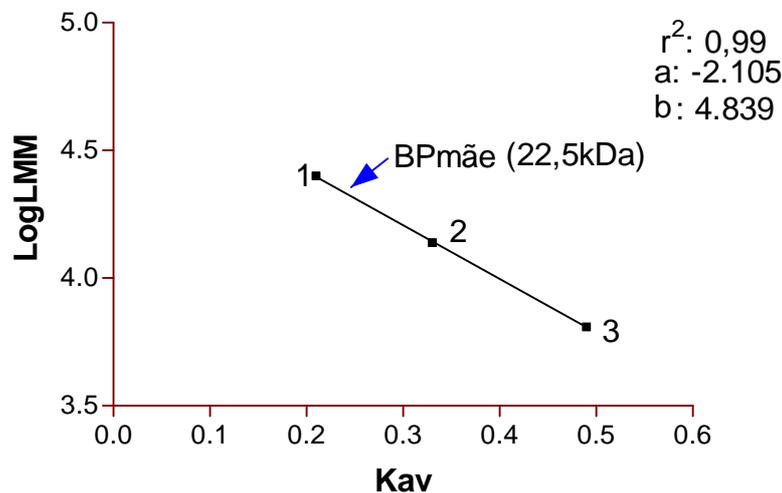
**Fig. 16-Cromatografia de interação hidrofóbica em Phenyl Superose (coluna de 0,5 x 5,0 cm) do pool III de Superdex 200-** Utilizamos inicialmente tampão tris-HCl 20mM contendo  $\text{CaCl}_2$  1mM e sulfato de amônio 1,2M pH 7,4. Eluição feita com gradiente linear decrescente de sulfato de amônio. E logo, com eluição isocrática com tampão tris-HCl 20mM contendo  $\text{CaCl}_2$  1mM. Fluxo de 30mL/hora. Foram coletados 0,5mL/tubo.



**Fig.17-SDS-PAGE (Laemmli-12,5%) das frações obtidas por Phenyl Superose da proteína de baixo peso molecular.** 1- Padrão de massa molecular; 2- veneno total; 3- Pool III de Superdex; 4- Pico 2; 5-10- Picos 3 e 4 (a-f). Gel corado com azul brilhante de Coomassie.

### III.11- Determinação da massa molecular da proteína de baixo peso molecular (BP)

Obtivemos 22,5kDa de massa molecular nativa da proteína de baixo peso molecular, utilizando filtração em gel Bio Gel P30.



**Fig.18 - Curva de calibração construída para determinação da massa molecular de BP- BioGel P30 (coluna de 0,8 x 22 cm).** 1- quimotripsina (25kDa); 2- ribonuclease (13,7kDa) e 3- aprotinina (6,5kDa).

### III.12- Fracionamento da proteína de baixo peso molecular

Os picos 3 e 4 obtidos por cromatografia em Phenyl Superose da proteína de baixo peso, foram reunidos em um único pool (BP mãe). Esta fração foi então, submetida à cromatografia de filtração em gel em Superdex 75 (Fig.19), onde obtivemos 2 picos não completamente resolvidos. Por eletroforese em gel de poliacrilamida 15% verificamos uma pequena diferença na migração das duas amostras, denominadas como BP1 e BP2 (Fig.20).

### III.13- Seqüenciamento das proteínas de baixo peso molecular (BPmãe/BP1 e BP2)

BP1 e BP2 apresentaram seqüência idêntica a BP mãe nos 20 primeiros resíduos N-terminais. Por procura no banco de dados (Swiss-prot) utilizando o programa FASTA, obtivemos 96,43% de identidade de BP mãe, BP1 e BP2 com jararafibrase II e 96,55% com botrolisina nos 29 resíduos identificados.

•5      •10      •15      •20      •25      •30

BP mãe: TPEHQRYIELFLVVDHGMFMKYNGNSDKIRRRRIHQ

BP1:      TPEHQRYIELFLVVDHGMFM

BP2:      TPEHQRYIELFLVVDHGMFM

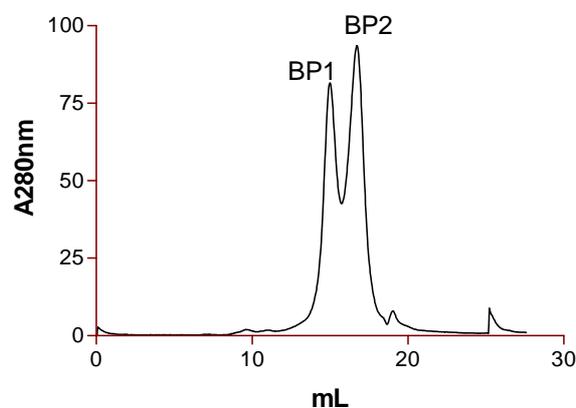
•5      •10      •15      •20      •25      •30

1-TPEHQRYIELFLVVDHGMFMKYNGNSDKIRRRRIHQ

2-LPEHQRYIELFIVVDHGMFMKYNGNSDKIRRRRIHQMVNIMKXAY

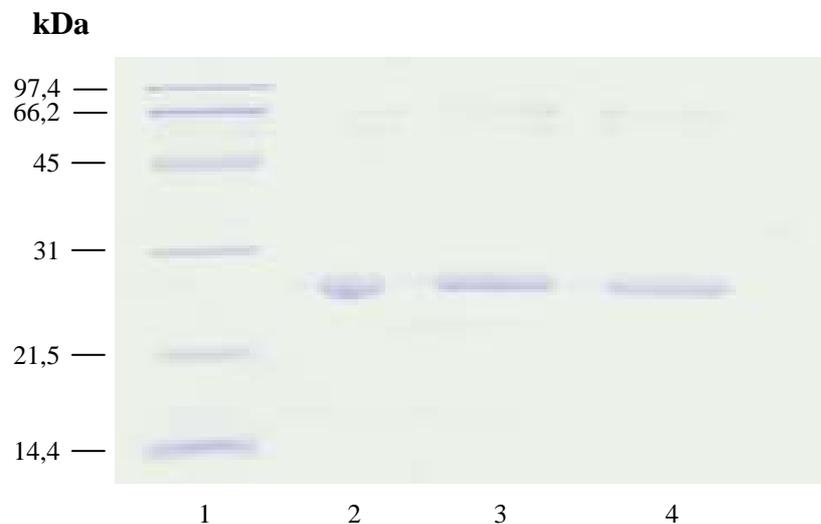
3-TPEHQRYIELFLVVDSGMFMKYNGNSDKI

1-BP mãe/BP1 e BP2; 2- Jararafibrase II e 3- Botrolisina.



**Fig.19- Cromatografia de filtração em gel em Superdex 75 (coluna de 1,0 x 30 cm) do pico 3 e 4 (BPmãe) obtidos de Phenyl Superose da proteína de baixo peso molecular. O**

tampão de equilíbrio utilizado foi tris-HCl 20mM, contendo CaCl<sub>2</sub> 20mM e NaCl 1M pH 8,5, com fluxo constante de 30mL/hora. Foram coletados 0,5mL/tubo.



**Fig.20- SDS-PAGE (Laemmli-15%) do fracionamento da proteína de baixo peso**

**molecular.** 1- Padrão de massa molecular; 2- BPmãe; 3- BP1 e 4- BP2. Gel corado com azul brilhante de Coomassie.

### III.14- Atividade fibrinogenolítica

A atividade fibrinogenolítica das enzimas foi visualizada em SDS-PAGE, onde verificamos intensa degradação após 5 e 10 minutos de incubação de 0,5µg de ambas as enzimas com o fibrinogênio (raias 2 e 7, da Fig.21 e 22). Entretanto, obtivemos degradação diferencial para as enzimas utilizadas; a jararagina foi capaz de lisar completamente a cadeia A $\alpha$  do fibrinogênio e parcialmente a B $\beta$  (Fig.21), BPmãe clivou completamente as cadeias A $\alpha$  e B $\beta$ . Somente na concentração de 0,1µg desta

enzima (em 5 ou 10 minutos) verificamos apenas a degradação da cadeia  $A\alpha$  do fibrinogênio (Fig.22). A cadeia  $\gamma$  não foi degradada por ambas as enzimas, em nenhuma das concentrações utilizadas.

### III.15- Inibição da atividade fibrinogenolítica

PO41(raia6, Fig.23 e 24), assim como os outros inibidores utilizados, foram capazes de impedir a fibrinogenólise do veneno, com exceção de DM64 (raia 9, Fig.23 e 24), proteína isolada do soro de *Didelphis marsupialis* com atividade antimiotóxica.

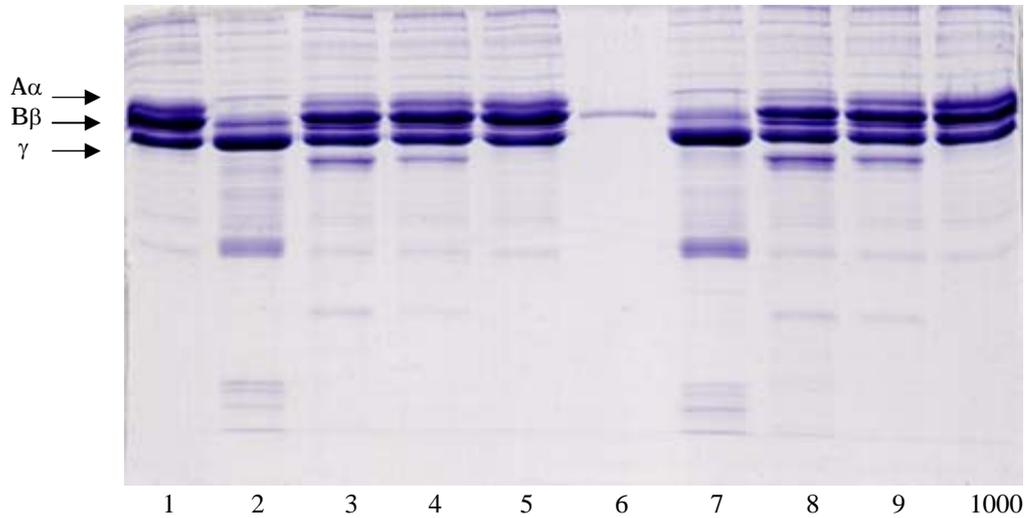
### III.16- Atividade hemorrágica e anti-hemorrágica

A atividade hemorrágica da jararagina isolada foi verificada quando utilizamos 15 $\mu$ g desta enzima (288,5pmoles), que foi capaz de produzir lesão de 10mm. Para avaliarmos a inibição da jararagina por PO41(570pmoles em 24 $\mu$ g), utilizamos relação molar de 1:2 (mol de enzima: mol do inibidor). PO41 foi capaz de inibir em 100% a hemorragia produzida pela jararagina.

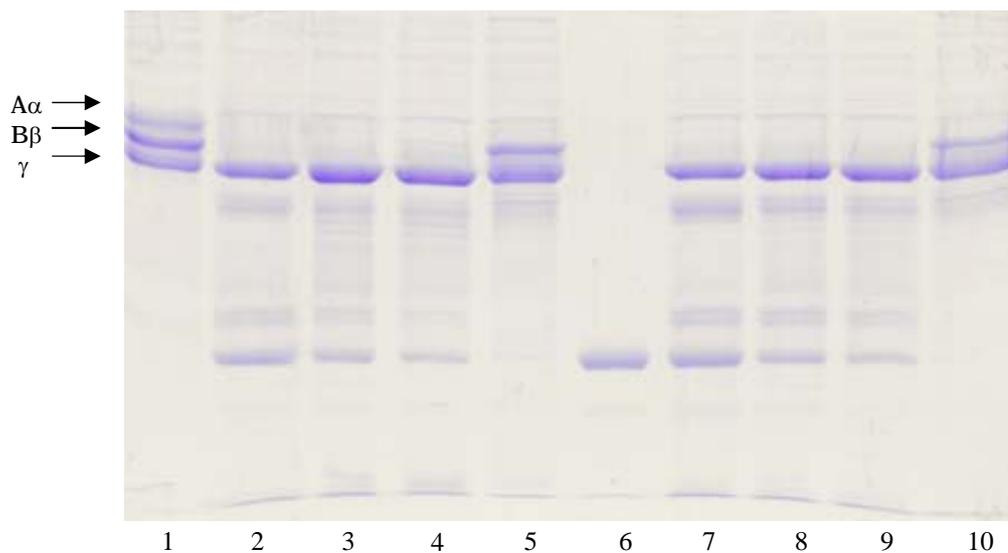
Tabela II - Inibição da atividade hemorrágica

Amostras	Lesão hemorrágica
Salina (controle)	-
PO41 (570pmoles)	-
jararagina (288pmoles)	+

PO41(570pmoles)+ jararagina (288pmoles)	-
--	---



**Fig. 21- SDS-PAGE (Laemmli-12,5%) da jararagina incubada em diferentes concentrações e tempos de hidrólises com o fibrinogênio.** 1- fibrinogênio; 2- 0,5µg por 5' ; 3- 0,1µg por 5'; 4- 0,05µg por 5'; 5- 0,01µg por 5'; 6- jararagina; 7-0,5µg por 10'; 8- 0,1µg por 10'; 9- 0,05µg por 10' e 10- 0,01µg por 10'. Gel corado com azul brilhante de Coomassie.



**Fig.22- SDS-PAGE (Laemmli-12,5%) da proteína de baixo peso molecular (BPMãe) incubada em diferentes concentrações e tempos de hidrólises com o fibrinogênio.** 1- fibrinogênio; 2- 2µg

por 5' ; 3- 1 $\mu$ g por 5'; 4- 0,5 $\mu$ g por 5'; 5- 0,1 $\mu$ g por 5'; 6- BpMãe; 7- 2 $\mu$ g por 10'; 8- 1 $\mu$ g por 10'; 9- 0,5 $\mu$ g por 10' e 10- 0,1 $\mu$ g por 10'. Gel corado com azul brilhante de Coomassie.

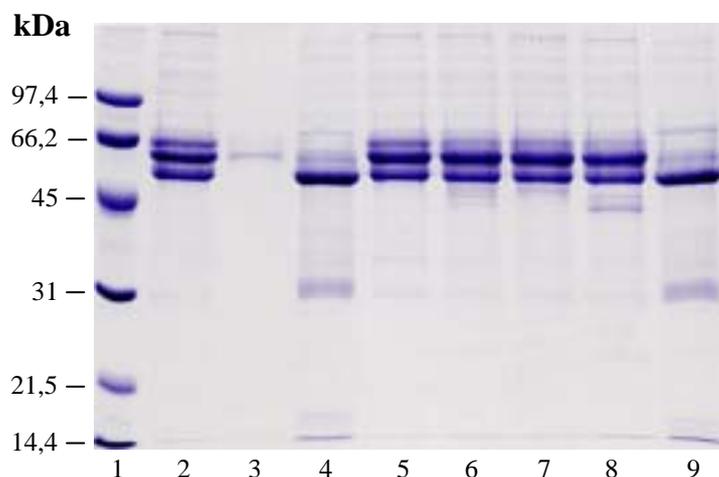


Fig. 23- SDS-PAGE (Laemmli-12,5%) da inibição da hidrólise do fibrinogênio da jararagina pelos inibidores. 1- Padrão de massa molecular; 2- fibrinogênio bovino; 3- jararagina; 4- fibrinogênio + jararagina; 5- fibrinogênio + jararagina + EDTA; 6 - fibrinogênio + jararagina + PO41; 7 - fibrinogênio + jararagina + DM43; 8- fibrinogênio + jararagina + DM40 e 9- fibrinogênio + jararagina + DM64 . Gel corado com azul brilhante de Coomassie.

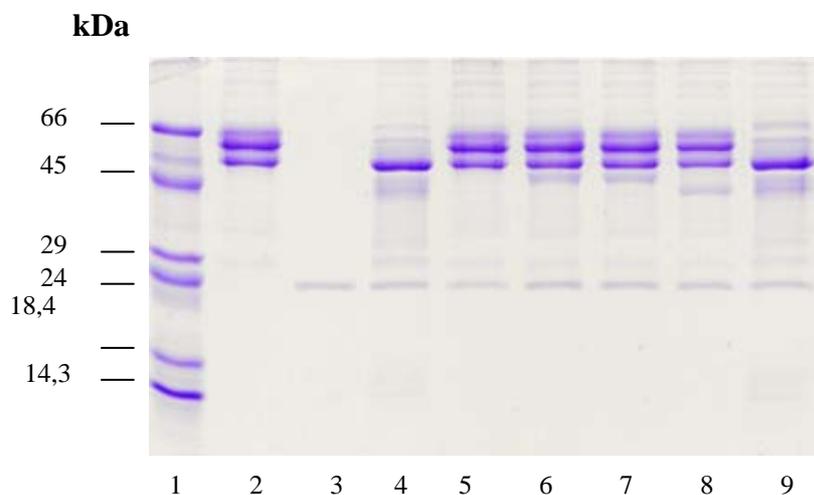


Fig.24- SDS-PAGE (Laemmli-12,5%) da inibição da hidrólise do fibrinogênio de BpMãe pelos inibidores. 1- Padrão de massa

molecular; 2- fibrinogênio bovino; 3- BPmãe; 4- fibrinogênio + BPmãe; 5- fibrinogênio + BPmãe + EDTA; 6 - fibrinogênio + BPmãe + PO41; 7 - fibrinogênio + BPmãe + DM43; 8- fibrinogênio + BPmãe + DM40 e 9- fibrinogênio + BPmãe + DM64. Gel corado com azul brilhante de Coomassie.

### *III.17- Inibição da atividade enzimática da jararagina por PO41 e DM43*

#### **Tabela III- Inibição da atividade enzimática da jararagina sobre o substrato sintético 2-Abz-Ala-Gly-Leu-Ala-4-Nba (Fox *et al*, 1986).**

Como podemos observar na tabela, PO41 foi capaz de inibir completamente a atividade proteolítica da jararagina em substrato fluorogênico sintético, tanto nas relações molares de 1:1, quanto de 1:0,5. Alguma inibição (60%) também foi obtida utilizando a relação de 1:0,25.

#### Porcentagem de Inibição

Inibidores	(1:1)*	(1:0,5)*	(1:0,25)*
PO41	100	100	60
DM43	100	84	ND

ND- não determinado

\*Relação molar jararagina/inibidor

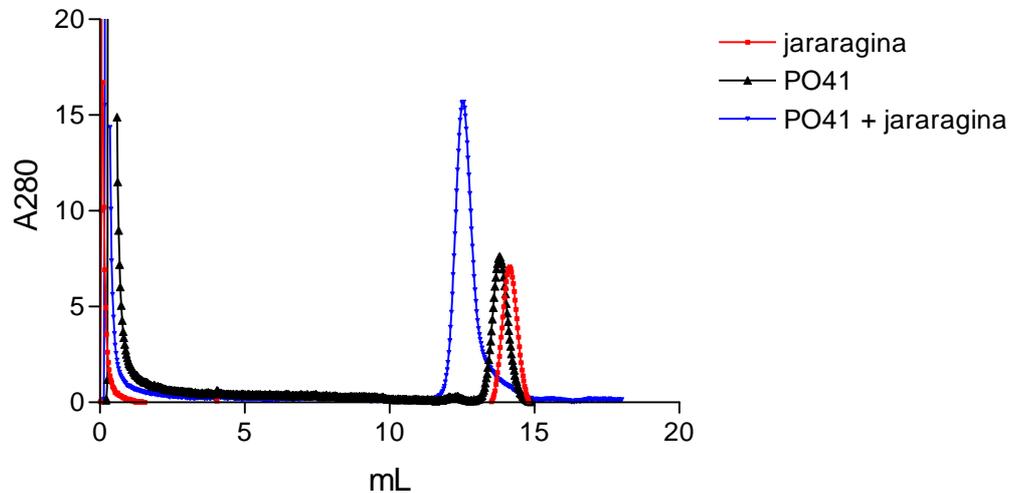
Ensaio realizado em tampão tris-HCl 20mM contendo CaCl<sub>2</sub> 20mM e NaCl 150mM pH 7,5, a 37°C, sob agitação magnética. Utilizamos o comprimento de onda 340nm de excitação e 415nm de emissão. As concentrações de substrato (100µM) e de

jararagina (0,05 $\mu$ M) foram constantes. Os inibidores foram pré-incubados com a enzima por 5 minutos a 37°C nas concentrações indicadas acima.

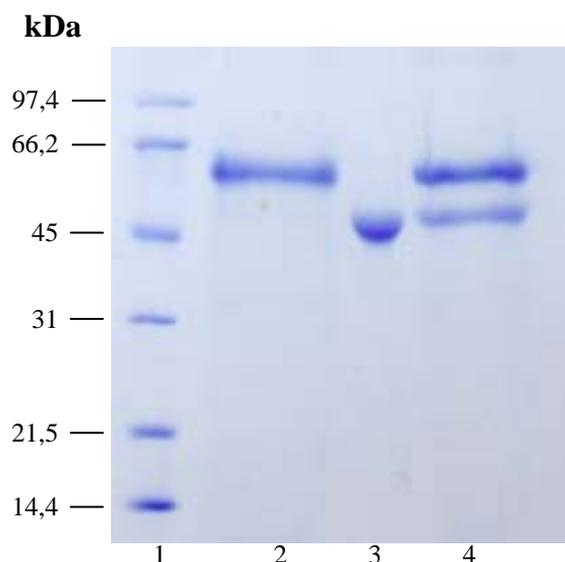
### III.18- Formação de complexo entre PO41 e as enzimas isoladas do veneno (jararagina e BPs)

Quando incubamos jararagina e PO41 com concentrações eqüimolares, observamos por cromatografia de filtração em gel em Superdex 200, o aparecimento de um novo pico protéico, e total desaparecimento tanto de enzima, quanto de inibidor livres, sugerindo a formação de complexo (Fig.25). Por SDS-PAGE visualizamos a presença de bandas referentes a enzima e ao inibidor na fração eluída referente ao novo pico formado (raia 4, da Fig.26). A massa molecular estimada para este novo pico foi de 96,6kDa, compatível com a estequiometria de 1:1, confirmada posteriormente pelo experimento de titulação evidenciado no gráfico de áreas (Fig.27). Eletroforeses realizadas na ausência de agente redutor ( $\beta$ -mercaptoetanol) demonstraram perfis idênticos, indicando que os complexos formados são não-covalentes, e que o inibidor não foi aparentemente degradado pela a enzima (dados não mostrados). PO41 também foi capaz de formar complexo com as BPs (BP1 e BP2), como podemos visualizar na figura 28 A e B. Em ambos os casos, ainda que não haja o aparecimento de um novo pico referente ao complexo formado entre as enzimas e o inibidor, por SDS-PAGE visualizamos a presença de 2 bandas, nas raias referentes ao pico formado pelas enzimas e PO41 (raias 4 e 7, da Fig.29). Além disto, no cromatograma visualizamos o total desaparecimento do pico referente as enzimas, sugerindo mais

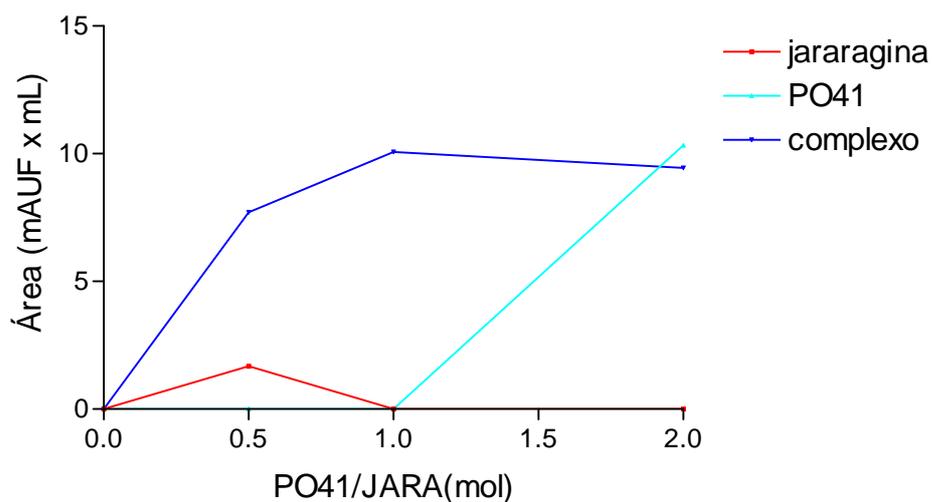
uma vez que estão complexando-se ao inibidor. Os perfis de formação de complexo mostram cromatografias independentes de todas as amostras, sobrepostas nas figuras 25 e 28 A e B.



**Fig.25- Formação de complexo entre PO41 e a jararagina.** As amostras em relações equimolares foram incubadas por 30 minutos a 37°C e submetidas à cromatografia de gel filtração em Superdex 200 (coluna de 1,0 x 30 cm).



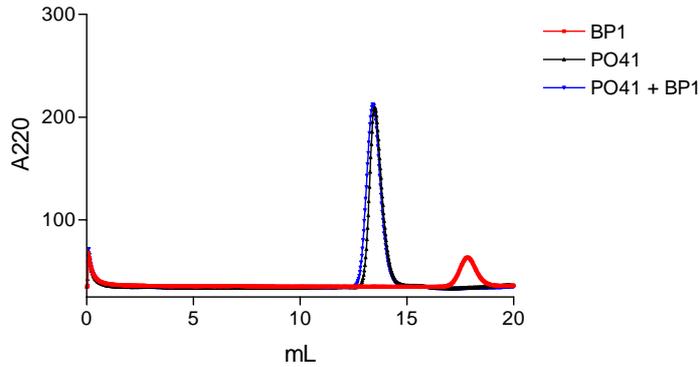
**Fig.26- SDS-PAGE (Laemmli-12,5%) da formação de complexo entre jararagina e PO41.** 1- Padrão de massa molecular; 2- jararagina; 3- PO41 e 4- jararagina + PO41. Gel corado com azul brilhante de Coomassie.



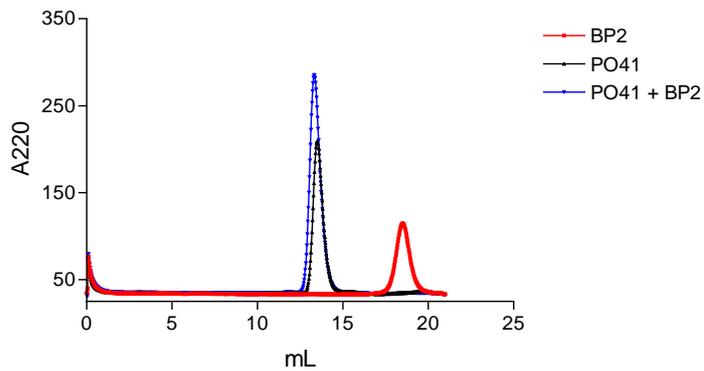
**Fig.27- Formação de complexo entre o inibidor isolado de *Philander opossum* (PO41) e jararagina-** Utilizamos concentrações fixas de jararagina, variando o inibidor, nas seguintes relações molares (1:0,5; 1:1 e 1:2).

Na primeira relação utilizada (1:0,5) observamos sobra de enzima e aumento da área referente ao complexo formado; na relação de 1:1 não há sobra nem de enzima, nem de PO41, sugerindo a que esta seja a estequiometria do complexo formado; na relação de 1:2 verificamos estabilização da área do complexo, sugerindo saturação e além disto, verificamos sobra de PO41.

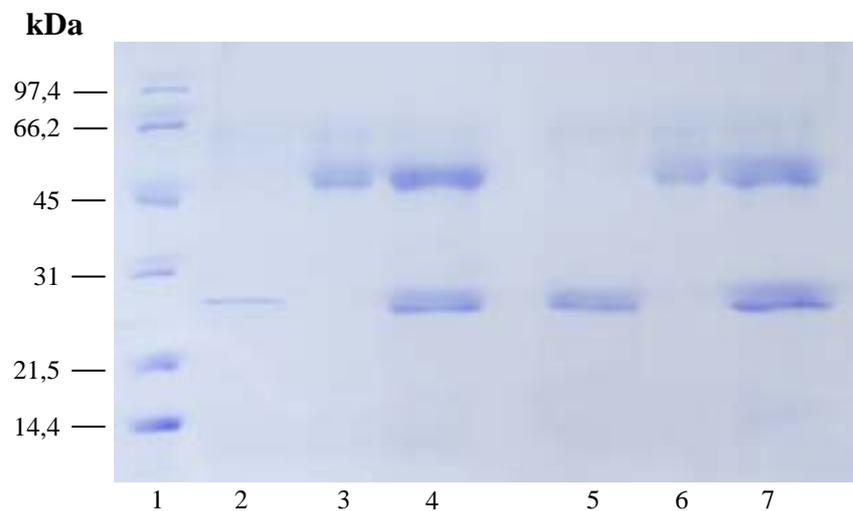
**A**



**B**

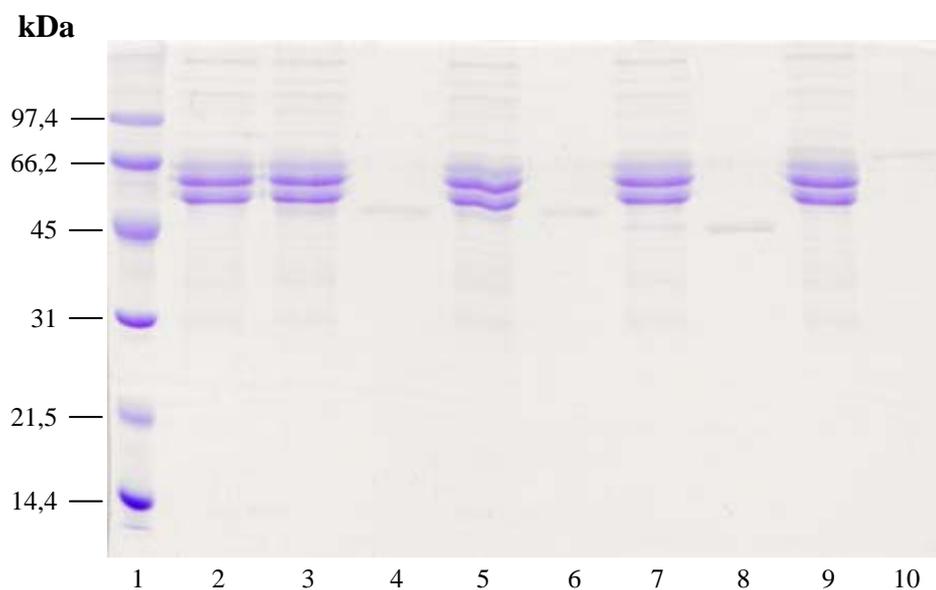


**Fig. 28 A e B - Formação de complexo entre PO41, BP1 e BP2.** As amostras foram incubadas por 30 minutos a 37°C e submetidas à cromatografia de filtração em gel em Superdex 200 (coluna de 1,0 x 30 cm).



**Fig.29- SDS-PAGE (Laemmli-12,5%) da formação de complexo entre as BPs e PO41.** 1-Padrão de massa molecular; 2- BP1; 3- PO41; 4- BP1+PO41; 5- BP2; 6- PO41 e 7- BP2+PO41. Gel corado com azul brilhante de Coomassie.

## Controle da inibição da atividade fibrinogenolítica



**Fig.28-** Eletroforese em gel de poliacrilamida 12,5% com SDS na presença de agente redutor. 1- Padrão de massa molecular; 2- fibrinogênio; 3- fibrinogênio + PO41; 4- PO41; 5- fibrinogênio + DM43; 6- DM43; 7- fibrinogênio + DM40; 8-DM40; 9- fibrinogênio+ DM64 e 10- DM64. Gel corado com azul brilhante de Coomassie.

Após o isolamento da proteína presente no soro de *Philander opossum* verificamos que:

#### **PO41:**

- É uma glicoproteína ácida (pI < 3,5);
- Em condições nativas possui 61,5 kDa por filtração em gel e 41,330 u.m.a por MALDI-TOF;
- Possui alto conteúdo de resíduos hidrofóbicos; 6 meias cistinas e 3 metioninas;
- Possui identidade estrutural com DM40 e 43 nos 27 primeiros resíduos N-terminais;
- Mostrou-se imunoreativo ao fator isolado do soro de *Didelphis marsupialis*;

#### **ISOLAMENTO DE HEMORRAGINAS DO VENENO:**

- A nova metodologia desenvolvida mostrou-se mais eficaz e rápida para isolarmos duas hemorraginas (jararagina e botrolisina) do veneno de *Bothrops jararaca*.

#### **ESTUDOS DE INTERAÇÃO DAS HEMORRAGINAS COM PO41:**

- PO41 foi capaz de neutralizar as atividades hemorrágica e proteolítica (substrato sintético fluorogênico e atividade fibrinogenolítica) das hemorraginas;
- PO41 formou complexos não-covalentes com jararagina (PIII) e botrolisina (PI)

Mediante a estas conclusões podemos inferir a grande possibilidade do uso deste inibidor de metaloproteases hemorrágicas, de diferentes classes, como agente terapêutico aos envenenamentos ofídicos, assim como, no estudo da

inibição de outras metaloproteases capazes de produzir diferentes quadros fisiopatológicos.

A resistência de diferentes espécies animais a venenos de serpentes já foi amplamente reportada por diversos autores (para revisão Domont *et al.*, 1991; Thwin e Gopalakrishnakone, 1998; Fox e Bjarnason, 1998 a). A resistência do gambá *Didelphis marsupialis* aos venenos da família *Viperidae* foi descrita por Moussatché e colaboradores (1979; 1981), e parece ser uma propriedade natural destes animais, já que fatores inibitórios estão presentes tanto no soro de animais selvagens, quanto no soro de animais nascidos em cativeiro. Portanto, não há necessidade de contato prévio dos gambás com as serpentes para que adquiram resistência (Perales *et al.*, 1986). Em 1994, Perales e colaboradores demonstraram homologia estrutural entre o fator antibotrópico isolado do soro do gambá *Didelphis marsupialis* e os isolados das cuícas *Philander opossum* e *Lutreolina crasicaudata*. Estudos posteriores de caracterização físico-química, estrutural e mecanística foram feitos exclusivamente com o fator antibotrópico do gambá.

Esta fração antibotrópica isolada do soro de *Didelphis marsupialis* é capaz de inibir os efeitos hemorrágico, letal, edematogênico e hiperalgésico do veneno de *Bothrops jararaca*. È composta por 2 glicoproteínas ácidas denominadas DM40 e DM43, que (Neves-Ferreira *et al.*, 2000).

Neste trabalho, isolamos o fator antibotrópico do soro de *Philander opossum* e caracterizamos uma proteína, denominada de

PO41, que demonstrou grande similaridade com inibidores de metaloproteases, incluindo DM43. Os estudos de interação com metaloproteases hemorrágicas foram realizados utilizando duas enzimas isoladas do veneno de *Bothrops jararaca*, por uma nova metodologia também desenvolvida neste trabalho.

Para isolarmos o fator anti-hemorrágico do soro de *Philander opossum* (PO), utilizamos a metodologia descrita por Perales e colaboradores, em 1989, para o isolamento das proteínas do soro de *Didelphis marsupialis*, com algumas modificações. O primeiro passo cromatográfico de purificação (DEAE-Sephacel) foi mantido. A fração antibotrópica isolada foi submetida à cromatografia de interação hidrofóbica em coluna Phenyl Superose. Este gel pré-empacotado permitiu uma melhor resolução e rapidez na obtenção da fração homogênea de PO. A proteína anti-hemorrágica, PO, demonstrou possuir massa molecular de 41.330 u.m.a. por MALDI-TOF, ligeiramente menor que DM43, dando origem ao nome PO41. Entretanto, por filtração em gel em coluna Superdex 200, obtivemos massa molecular de 61,5 kDa para PO41. Este fato poderia ser explicado de acordo com as seguintes hipóteses: a) PO41 poderia apresenta-se em forma dimérica e estar muito compactada, demonstrando massa molecular menor do que a esperada para um dímero considerando a massa determinada por MALDI-TOF; b) poderia ser uma molécula dimérica e estar sendo adsorvida à matriz, subestimando sua massa molecular; ou ainda, c) PO41 apresentar-se-ia na forma monomérica, em uma conformação não-globular. De acordo com Preneta, 1995, proteínas que possuem formas não-globulares podem apresentar comportamento anômalo por cromatografia de filtração em gel.

Este fato portanto, poderia conferir uma menor retenção ao gel, superestimando a massa obtida por filtração em gel (61,5kDa).

Segundo Domont e colaboradores (1991), as proteínas anti-hemorrágicas possuem algumas características comuns, dentre elas a natureza glicoprotéica. De fato, verificamos que PO41 foi revelada por ácido periódico/reagente de Schiff. Para determinarmos o seu teor de glicosilação, utilizamos o método de desglicosilação enzimática. Neste método, são utilizadas 3 diferentes enzimas que potencialmente clivam todos os oligossacarídeos N ligados e a maioria das O-glicosilações das glicoproteínas e glicopeptídeos. A enzima PNGase remove todas as ligações glicosídicas em Asn, enquanto que a combinação de NaNaseII e O-glicosidase PS remove a maioria das ligações glicosídicas em Ser/Thr.

Infelizmente, a desglicosilação total de PO41 não foi atingida. De acordo com Tarentino e Plummer, 1982, a conformação protéica parece ser o principal fator que pode afetar a retirada dos carboidratos, já que proteínas no estado nativo podem manter seus oligossacarídeos completamente resistentes à ação de enzimas, restringindo o acesso ao sítio de hidrólise. A desnaturação, nestes casos, poderia tornar estas glicoproteínas susceptíveis à remoção dos carboidratos. Baseando-nos nisso, optamos pelo uso de um protocolo de desglicosilação em condições desnaturantes. Entretanto, este também não foi capaz de desglicosilar totalmente as proteínas, nem mesmo quando aumentamos o tempo de incubação e a concentração de enzima utilizada. Porém, observamos que com o uso deste protocolo desnaturante os produtos de hidrólise mostraram-se menos heterogêneos. Independentemente do protocolo desnaturante

utilizado observamos que a desglicosilação foi menos eficaz em PO41, quando comparado com DM43. Podemos tentar explicar a desglicosilação incompleta de PO41, considerando que haja populações de moléculas com diferentes graus de desnaturação, já que o grau de hidrólise enzimática é dependente do tamanho e da conformação das glicoproteínas (Kobata e Endo, 1993). Provavelmente isto ocorreu pois os agentes desnaturantes utilizados não foram suficientemente drásticos para permitir acesso das enzimas a todos os sítios de hidrólise.

A análise de aminoácidos de PO41 revelou uma composição muito semelhante à obtida para DM40 e DM43 (Neves-Ferreira *et al.*, 2000), mantendo um padrão quanto ao conteúdo de aminoácidos hidrofóbicos (42,5%), número de pontes de enxofre (6 meias cistinas), número de metioninas (3) e número total de resíduos (272). O conteúdo de ácidos aspártico e glutâmico, ainda que não possam ser determinados com exatidão pela provável presença de glutamina e asparagina, parece ser muito elevado, o que está de acordo com o baixo ponto isoelétrico encontrado para PO41.

A determinação do ponto isoelétrico de PO41 pelo ensaio de focalização isoelétrica foi prejudicada, pois nem as amostras e nem os padrões ácidos utilizados não focalizaram, o que pode indicar uma limitação do próprio método. Porém, podemos estimar seu pI abaixo de 3,5, de acordo com o padrão de amiloglicosidase utilizado (pI 3,5). Esta natureza extremamente ácida da proteína pode ser função tanto do alto conteúdo de ácidos aminados ácidos identificados na sua composição, como de um provável conteúdo de ácido siálico, oligossacarídeo ácido presente na maioria das glicoproteínas (Manzi e Varki, 1993).

O seqüenciamento N-terminal dos 27 primeiros resíduos de PO41 revelou uma grande identidade com DM40 e DM43. Heterogeneidades foram observadas punctualmente nos resíduos 6, 9 e 14. Estas modificações são não-conservativas, com exceção da alteração serina/treonina do décimo quarto resíduo (ambos são aminoácidos polares não-carregados).

Além das similaridades químicas e físico-químicas, PO41 assemelha-se com DM40 e DM43 também antigenicamente, já que foi revelada por anticorpo policlonal preparado contra a fração antibotrópica isolada do soro de *Didelphis marsupialis*. Por este método também identificamos a presença de uma segunda proteína na fração antibotrópica de *Philander opossum*, que possuía uma maior mobilidade eletroforética que PO41, mas não havia sido identificada por SDS-PAGE nem por coloração com azul brilhante de Coomassie, nem por reagente de Schiff.

Para o estudo da interação dos inibidores com metaloproteases de veneno de serpentes, foi desenvolvida uma nova metodologia de purificação de duas hemorraginas do veneno de *Bothrops jararaca*. Utilizamos, primeiramente, cromatografia de filtração em gel Superdex 200, por onde fracionamos o veneno total. De acordo com a natureza do método utilizado, conseguimos agrupar os componentes do veneno em dois grupos em função das suas massas moleculares. O primeiro deles continha a jararagina, metaloprotease hemorrágica da classe PIII, onde estão incluídas as toxinas mais potentes dos venenos de serpentes. Este material foi submetido ao fracionamento segundo técnica descrita por Paine e colaboradores, em 1992. Por esta metodologia utiliza-se cromatografia de interação hidrofóbica em Phenyl-Superose e o material obtido é cromatografado em troca iônica em Mono Q.

Nenhum dos tampões utilizados nas etapas de purificação continham cloreto de cálcio.

É importante ressaltar que tanto o uso de cloreto de cálcio nos tampões, quanto a purificação a 4°C e a rapidez dos métodos, são princípios fundamentais para que as enzimas não se autolisem. O papel biológico destes íons metálicos ainda não está totalmente elucidado, contudo sabe-se que alguns deles como o  $\text{Ca}^{+2}$ ,  $\text{Mg}^{+2}$  e  $\text{Mn}^{+2}$  são importantes para estabilidade de certas proteínas do veneno, enquanto outros, em particular,  $\text{Zn}^{+2}$ ,  $\text{Cu}^{+2}$ ,  $\text{Fe}^{+2}$  e  $\text{Co}^{+2}$  poderiam atuar no mecanismo catalítico de certos componentes enzimáticos do veneno (Bjarnason e Fox, 1994). A remoção do  $\text{Ca}^{2+}$  pode levar a mudanças conformacionais com concomitante perda das atividades proteolíticas e hemorrágicas. Estas mudanças podem muitas vezes ser irreversíveis (Iwanaga e Suzuki, 1979).

A identidade da jararagina purificada foi confirmada por digestão triptica seguida de análise do mapa peptídico por espectrometria de massas (MALDI-TOF). Dos 55% dos peptídeos obtidos pela hidrólise, todos demonstraram identidade com os peptídeos teóricos de jararagina (Paine *et al.*, 1992).

Um segundo grupo protéico obtido por Superdex 200, que continha proteínas cromatográficas, obtivemos uma amostra homogênea de aproximadamente 23kDa, por SDS-PAGE. Denominamos esta amostra de BP (baixo peso). Para determinarmos sua massa molecular nativa, submetemos à amostra a cromatografia de filtração em gel. O volume de eluição obtido mostrou-se anômalo, indicando que a proteína possuía massa molecular inferior a 13,7kDa, dado incompatível com a análise eletroforética. Modificando a matriz do gel de dextran e agarose (Superdex 200)

para poliacrilamida (Bio Gel P30), conseguimos estimar uma massa molecular de 22,5kDa para a proteína, sugerindo que havia adsorção à matriz do gel.

Maruyama e colaboradores em 1992, também descreveram uma metodologia para isolamento de duas metaloproteases hemorrágicas do veneno de *Bothrops jararaca* (jararafibrase I, proteína de alto peso molecular e jararafibrase II, proteína de baixo peso molecular), porém o método descrito utilizava cromatografias de outras naturezas para obtenção do material homogêneo e um passo cromatográfico a mais para obtenção da jararafibrase II.

Quando submetemos BP à cromatografia de filtração em gel em coluna S verificamos uma pequena diferença nas suas mobilidades eletroforéticas. As amostras, denominadas BP1 e BP2, foram seqüenciadas e os 20 resíduos N-terminais de ambas revelaram seqüências idênticas entre si e com a BP “mãe”.

Estes resultados sugerem que pode haver alguma modificação na seqüência de aminoácidos das enzimas BP1 e BP2, que possa explicar as diferenças nos tempos de eluição em gel, assim como na migração eletroforética. A exemplo disto, podemos citar as toxinas hemorrágicas (HT-c e HT-d) isoladas de *Crotalus atrox* que diferenciam-se por apenas uma substituição no resíduo da posição 181 (Asp por Ala), e por isto, foram simplesmente denominadas como Atrolisina C (Bjarnason e Fox, 1987). Outra hipótese seria haver diferenças de teores de glicosilação entre elas, o que poderia causar modificação na eluição das enzimas por filtração em gel e também na migração eletroforética.

Utilizando o programa FASTA para procura de seqüências homólogas, no banco de dados Swiss-Prot, obtivemos 96,43% de

identidade entre as seqüências N-terminais da BPmãe, BP1 e BP2 com a jararafibrase II (Maruyama *et al.*, 1992) e 96,55% com a botrolisina (Tanizaki *et al.*, 1989), nos 29 resíduos investigados.

As enzimas isoladas neste trabalho possuem propriedades semelhantes às já reportadas para algumas enzimas do veneno de *Bothrops jararaca*, mas por falta de informações estruturais ficou difícil identificá-las. Além disto, algumas delas possuíam 3 ou mais denominações; a saber: metaloproteases de alto peso molecular: HF2 (Mandelbaum *et al.*, 1976); botropasina (Mandelbaum *et al.*, 1982); jararagina (Paine *et al.*, 1992); jararafibrase I (Maruyama *et al.*, 1992); metaloproteases de baixo peso molecular: jararafibrases II-IV (Maruyama *et al.*, 1992 e 1993); J protease (Tanizaki *et al.*, 1989), atualmente denominada de botrolisina (Tanizaki, 1998), de acordo com a IUBMB (“International Union of Biochemistry and Molecular Biology”).

Decidimos portanto, utilizar para enzima de alto peso molecular a denominação seqüência N-terminal e com suas propriedades físico-químicas compatíveis com as demonstradas para esta enzima.

É importante relatar que, ao longo deste trabalho, utilizamos um único “pool” de veneno de *Bothrops jararaca* para isolar as enzimas. Porém, para testarmos as atividades das BPs (BP1 e BP2), precisou-se fazer uma nova partida de material. Este novo “pool” de veneno (doado pelo Instituto de Biologia do Exército), submetido às mesmas técnicas para o fracionamento de BP, não demonstrou a presença das 2 proteínas obtidas por filtração em gel em Superdex 75. Esta variabilidade nos venenos de serpentes já foi reportada por Chippaux e colaboradores, em 1991, que demonstraram que estes podem sofrer variações qualitativas a nível de famílias, gêneros, inter ou intra-espécies, até mesmo

conforme distribuição geográfica, sazonalidade, dieta, hábitos, idade e sexo do ofídio.

Para determinar a atividade proteolítica das enzimas isoladas utilizamos o fibrinogênio como substrato. As características do fibrinogênio clivado pela jararagina já haviam sido demonstradas por Kamiguti e colaboradores (1994b); A molécula do fibrinogênio (330kDa) é um dímero composto por 3 pares de cadeias  $A\alpha$ ,  $B\beta$  e  $\gamma$ . Sua degradação por metaloproteases de venenos gera produtos de clivagem muito similares. A clivagem da cadeia  $A\alpha$  gera fragmentos de 43 e 24 kDa. Neste trabalho foi demonstrada uma intensa degradação da cadeia  $A\alpha$  pela jararagina, contudo sem afetar as cadeias  $B\beta$  e  $\gamma$ , indicando tratar-se de uma  $\alpha$ -fibrinogenase. Maruyama e colaboradores (1992), reportam a degradação total da cadeia  $A\alpha$  do fibrinogênio mais rapidamente, seguida da degradação total da cadeia  $B\beta$  pelas jararafibrases I e II. Nossos resultados corroboram parcialmente, os reportados por Maruyama, já que observamos a degradação total de  $A\alpha$  e parcial de  $B\beta$  quando utilizamos a jararagina e a degradação completa de ambas as cadeias, quando utilizamos a botrolisina.

Todos os inibidores utilizados (PO41, DM 40 e 43) na relação estequiométrica de 1:1 (mol enzima/mol inibidor), foram capazes de inibir a atividade fibrinogenolítica de ambas as enzimas, que foram utilizadas em concentrações e tempos iguais (0,5 $\mu$ g de cada enzima por 5 minutos de incubação). Com exceção de DM64 que não inibiu, nem mesmo quando utilizamos relação molar enzima/inibidor de 1:2, confirmando não tratar-se de um inibidor de metaloprotease do veneno de serpente.

A atividade enzimática da jararagina sobre substrato sintético foi totalmente inibida por PO41, quando utilizamos relações

molares de 1:1 e 1:0,5 (mol enzima/mol de inibidor). Alguma inibição (60%) também foi verificada quando utilizamos 1:0,25.

A atividade hemorrágica da jararagina foi determinada utilizando 15 $\mu$ g de proteína, que foi capaz de induzir lesão hemorrágica de aproximadamente 10mm de diâmetro médio, que é definida como a lesão mínima para indicar a dose hemorrágica a ser utilizada (Theakston e Reid, 1983). PO41 inibiu completamente esta atividade da jararagina isolada.

Após demonstrarmos as atividades das enzimas isoladas, e testarmos suas realizações juntamente com SDS-PAGE, onde verificamos a formação de complexos não-covalente entre PO41 e ambas enzimas. A formação do complexo foi evidenciada pela formação de um novo pico, deslocado a frente dos controles e com maior área. Além disto, os picos dos controles desapareceram completamente na relação molar de 1:1. O gráfico de áreas construído revela ainda, que na relação de 1:0,5 (mol de enzima: mol de inibidor) há sobra de enzima, e que na relação 1:2 (mol de enzima: mol de inibidor) há sobra de inibidor. A relação de 1mol de monômero de inibidor por 1mol de enzima parece ser a estequiometria entre PO41 e a jararagina, confirmada pela massa molecular obtida para o complexo formado (96,6 kDa).

A formação de complexo entre BP1 e BP2 com PO41 foi evidenciada por SD novo pico, e sim, o discreto aumento da área do pico referente ao inibidor, sugerimos a formação de complexo que é corroborada pelo total desaparecimento do pico referente a enzima, que estaria então, complexando-se com PO41. Infelizmente não pudemos estimar as massas moleculares das amostras deste experimento pelo comportamento anômalo destas proteínas em cromatografia de filtração, Superdex 200, como relatado.

É importante ressaltar que esta é a primeira vez que é descrita a formação de complexo entre DM43 e jararagina. Isso sugere a importância do domínio metaloprotease, presente em ambas as enzimas para esta interação. Dados experimentais obtidos por Neves-Ferreira (2000) mostram a não formação de complexo por filtração em gel, entre DM43 e jararagina C (Usami *et al.*, 1994). Esta proteína é derivada do processamento da região C-terminal da jararagina, que possui apenas os domínios tipo-desintegrina e rico em cisteína.

- Amaral, C.F.S., Da Silva, O.A., Godoy, P. e Miranda, D. (1985) Renal cortical necrosis following *Bothrops jararaca* and *Bothrops jararacussu* snake bite. *Toxicon*. 23, 877-885.
- Atassi, M.Z. (1991) Possynaptic-neurotoxin-acetylcholine receptor interaction and the binding sites on the two molecules. In: *Reptile Venoms and Toxins*, vol.5, pp. 53-83 (Tu, A. T., Ed.) New York: Marcel Dekker.
- Balsinde, J., Balboa, M.A., Insel, P.A . e Dennis, E.A . (1999) Regulation and inhibition of phospholipase A<sub>2</sub>. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 39, 175-189.
- Baramova, E. N., Shannon, J.D., Bjarnason, J.B. e Fox, J.W. (1989) Degradation of extracellular matrix proteins by hemorrhagic metalloproteinases. *Arch. Biochem. Biophys.* 275, 63-71.
- Baramova, E. N., Shannon, J.D., Bjarnason, J.B., Gonias, S.L. e Fox, J.W. (1990) Interaction of hemorrhagic metalloproteinases with human  $\alpha_2$ -macroglobulin. *Biochemistry*. 29, 1158-1164.
- Bjarnason, J.B. e Fox, J.W. (1987) Characterization of two hemorrhagic proteases, HT-c and HT-d from Western diamondback rattlesnake (*Crotalus atrox*). *Biophys. Biochim. Acta*. 911, 356-363.
- Bjarnason, J.B., Hamilton, D. e Fox, J.W. (1988) Studies on the mechanism of hemorrhage production by five proteolytic hemorrhagic toxins from *Crotalus atrox* venom. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler*. 369, 121-129.
- Bjarnason, J.B. e Fox, J.W. (1994) Hemorrhagic metalloproteinases from snake venoms. *Pharmac. Ther.* 62, 325-372.

Bode, W., Gomis-Rüth, F.X. e Stöcker, W. (1993) Astacins, serralytins, snake venom and matrix metalloproteinases exhibit identical zinc-binding environments (HEXXHXXGXXH and Met-turn) and topologies and should be grouped into a common family, the metzincins. *FEBS Lett.* 331, 134-140.

Borkow, G., Gutiérrez, J.M. e Ovadia, M. (1995) Isolation, characterization and mode of neutralization of a potent antihemorrhagic factor from the serum of the snake *Bothrops asper*. *Biochim. Biophys. Acta.* 1245, 232-238.

Brew, K., Dinakarandian, Denagase, H. (2000) Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function. *Biochim. Biophys. Acta.* 1477, 267-283.

Campbell, J.A. e Lamar, W.W. (1989) In: *The Venomous Reptiles of Latin America*. New York: Cornell University.

Cardoso, J.L.C., Fan, H.K., França, F.O. S., Jorge, M.T., Leite, R.P., Nishioka, S.A., Avila, A., Sano-Martins, I.S., Tomy, S.C., Santoro, M.L., Chudzinski, A. M., Castro, S.C.B., Kamiguti, A. S., Kelen, E.M.A., Hirata, M.H., Mirandola, R.M.S., Theakston, R.D.G. e Warrell, D.A. (1993) Randomized comparative trial of three antivenoms in the treatment of envenoming by lance-headed vipers (*Bothrops jararaca*) in São Paulo, Brazil. *Q. J. Med.* 86, 315-325.

Catanese, J.J. e Kress, L. F. (1992) Isolation from opossum serum of a metalloproteinase inhibitor homologous to human  $\alpha$ 1B-glycoprotein. *Biochemistry.* 31, 410-418.

Chambers, A. F. e Matrisian, L. M. (1997) Changing views of the role of matrix metalloproteinases in metastasis. *Journal of the National Cancer Institute.* 89, 1260-1270.

- Chippaux, J.P., Williams, V. e White, J. (1991) Snake venom variability: methods of study, results and interpretation. *Toxicon*. 29, 1279-1303.
- Chippaux, J.P. (1998) Snake bites:appraisal of the global situation. *Bulletin of the World Organization*. 76, 515-524.
- Chippaux, J.P. e Goyffon, M. (1998) Venoms, antivenoms and Immunotherapy. *Toxicon*. 36, 823-846.
- David, P., Naulleau, G. e Vasse, Y. (1994) Écologie des serpents: habitats et modes de vie. In: *Les serpents*, pp.124-143 (Bauchot, R., Ed.) Paris:Bordas
- De Oliveira, E. P. e Tanizaki, M.M. (1992) Effect of a proteinase inhibitor from the plasma of *Bothrops jararaca* on coagulant and myotoxic activities of *Bothrops* venoms. *Toxicon*. 30, 123-128.
- De Wit, C. A. e Weström, B. R. (1987a) Further studies of plasma protease inhibitors in the hedgehog, *Erinaceus europaeus*: Collagenase, papain and plasmin inhibitors. *Comp. Biochem. Physiol.* 86 a, 1-5.
- De Wit, C.A. e Weström, B.R. (1987b) Purification and characterization of  $\alpha_2$ -,  $\alpha_2$ - $\beta$ - and  $\beta$ -macroglobulin inhibitors in the hedgehog, *Erinaceus europaeus*:  $\beta$ -macroglobulin identified as the plasma antihemorrhagic factor. *Toxicon*. 25, 1209-1219.
- De Wit, C.A. e Weström, B.R. (1987c) Venom resistance in the hedgehog, *Erinaceus europaeus*: purification and identification of macroglobulin inhibitors as plasma antihemorrhagic factors. *Toxicon*. 25, 315-323.

- Docherty, A.J.P., O'Connell, J., Crabbe, T., Angal, S. e Murphy, G. (1992) The matrix metalloproteinases and their natural inhibitors: prospects for treating degenerative tissue diseases. *Tibtech*. 10, 200-207.
- Domont, G.B., Perales, J. e Moussatché, H. (1991) Natural anti-snake venom proteins. *Toxicon*. 29, 1183-1194.
- Dos- Santos, M.C., Gonçalves, L.R.C., Fortes-Dias, C.L., Cury, Y., Gutiérrez, J.M., e Furtado, M.F.D. (1992) A eficácia do antiveneno botrópico-crotálico na neutralização das principais atividades do veneno de *Bothrops jararacussu*. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*. 34, 77-83.
- Edman, P. (1950) Method for determination of the amino acid sequence in peptides. *Acta Chemica Scandinavica*. 4, 283-293.
- Escalante, T., Franceschi, A., Rucavado, A. e Gutiérrez, J.M. (2000) Effectiveness of Batimastat, a syntetic inhibitor of matrix metalloproteinases, in neutralizing local tissue damage induced by BaP1, a hemorrhagic metalloproteinase from the venom of the snake *Bothrops asper*. *Biochem. Pharmacol.* 60, 269-274.
- Fortes-Dias, C.L., Fonseca, B.C.B., Kochva, E. e Diniz, C.R. (1991) Purification and properties of an antivenom factor from the plasma of the South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*). *Toxicon*. 29, 997-1008.
- Fortes-Dias, C.L., Lin, Y., Ewell, J., Diniz, C.R. e Liu, T.Y. (1994) A phospholipase A<sub>2</sub> inhibitor from the plasma of the South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*). Protein structure, genomic structure and mechanism of action. *J. Biol. Chem.* 269, 15646-15651.

Fox, J.W., Campbell, R., Beggerly, L. e Bjarnason, J.B. (1986) Substrate specificities and inhibition of two hemorrhagic zinc proteases Ht-c and Ht-d from *Crotalus atrox* venom. *Eur. J. Biochem.* 156, 65-72.

Fox, J.W. e Bjarnason, J. B. (1998a) Metalloproteinase inhibitors. In: *Enzymes from snake venoms*, pp. 599-632 (Bailey, G.S., Ed.). Colorado: Alaken, Inc.

Fox, J.W e Bjarnason, J.B. (1998b) Atrolysin C. In: *Handbook of Proteolytic Enzymes*, pp. 4-6 (Barrett, A. J., Rawlings, N.D e Woessner, J.F., Ed.) Academic Press.

Fox, J. W. e Long, C. (1998) The ADAMs/ MDC family of proteins and their relationships to the snake venom metalloproteinases. In: *Enzymes from snake venoms*, pp.151-178 (Bailey, G.S.,Ed). Colorado: Alaken, Inc.

Freitas, M. A., Geno, P. W., Sumner, L. W., Cooke, M.E., Hudiburg, S. A ., Ownby, C.L., Kaiser, I. I., e Odell, G.V. (1992) Citrate is a major component of snake venoms. *Toxicon.* 30, 461-464.

Gomez, D.E., Alonso, D.F., Yoshiji, H., e Thorgeirsson, U. P. (1997) Tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, regulation and biological functions. *European Journal of Cell Biology.* 74, 111-122.

Gutiérrez, J.M. e Lomonte, B. (1989) Local tissue damage induced by *Bothrops* snake venoms: a review. *Mem.Inst. Butantan.* 51, 211-223.

Gutiérrez, J.M. (1990) Local pathological effects induced by *Bothrops* snake venoms. *Mem.Inst. Butantan.* 52 (supl.), 37-38.

- Gutiérrez, J.M. e Lomonte, B. (1995) Phospholipase A<sub>2</sub> myotoxins from *Bothrops* snake venoms. *Toxicon*. 33, 1405-1424.
- Hati, R., Mitra, P., Sarker, S. e Bhattacharyya, K.K. (1999) Snake venom hemorrhagins. *Critical Reviews in Toxicology*. 29(1), 1-19.
- Hite, L.A., Jia, L.G., Bjarnason, J.B. e Fox, J.W. (1994) cDNA sequences for four snake venom metalloproteinase: structure, classification and their relationship to mammalian reproductive proteins. *Arch. Biochem. Biophys.* 308, 182-191.
- Ishioka, N., Takahashi, N. e Putnam, F.W. (1986) Amino acid sequence of human plasma  $\alpha$ 1B- glycoprotein: homology to the immunoglobulin supergene family. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 83, 2363-2367.
- Iwanaga, S. e Suzuki, T. (1979) Enzymes in snake venom. In: *Handbook of experimental pharmacology*, 52, pp. 61-158 (Lee, C.Y., Ed.) Berlin: Springer Verlag.
- Jia, L., Shimokawa, K., Bjarnason, J.B. e Fox, J.W. (1996) Snake venom metalloproteinases: structure, function and relationship to the ADAMS family of proteins. *Toxicon*. 34, 1269-1276.
- Jia, L., Wang, X.M., Shannon, J.D., Bjarnason, J.B. e Fox, J.W. (1997) Function of disintegrin-like/cysteine-rich domains of atrolysin. *A. J. Biol. Chem.* 272, 13094-13102.
- Johnson, L.L., Dyer, R. e Hupe, D.J. (1998) Matrix metalloproteinases. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2, 466-471.
- Jurgilas, P.B., Neves-Ferreira, A. G.C., Domont, G.B., Moussatché, H. e Perales, J. (1999) Detection of an antithroptic fraction

in opossum (*Didelphis marsupialis*) milk that neutralizes *Bothrops jararaca* venom. *Toxicon*. 37, 167-172.

Kamiguti, A. S., Slupsky, J.R., Zuzel, M. e Hay, C.R.M. (1994b) Properties of fibrinogen cleaved by jararhagin, a metalloproteinase from the venom of *Bothrops jararaca*. *Thromb. Haemost.* 72, 244-249.

Kamiguti, A. S., Hay, C.R.M., Theakston, R.D.G. e Zuzel, M. (1996a) Insights into the mechanism of haemorrhage caused by snake venom metalloproteinases. *Toxicon*. 34(6), 627-642.

Kamiguti, A. S., Hay, C.R.M. e Zuzel, M. (1996b) Inhibition of collagen-induced platelet aggregation as the result of cleavage of  $\alpha 2\beta 1$ -integrin by the snake venom metalloproteinase jararhagin. *Biochem. J.* 320, 635-641.

Killar, L., White, J., Black, R. e Peschon, J. (1999) Adamalysins – A family of metzincins including TNF- $\alpha$  converting enzyme (TACE). *Ann.N.Y. Acad. Sci.* 878, 442-452.

Kobata, A. e Endo, T. (1993) Isolation and fractionation of N-linked oligosaccharides from glycoproteins. *In: Glycobiology – A Practical Approach* (Fukuda, M. E Kobata, A., Eds.) pp. 79-102. Oxford University Press.

Kogaki, H., Inoue, S., Ikeda, K., Samejima, Y., Omori-Satoh, T. e Hamaguchi, K. (1989) Isolation and fundamental properties of a phospholipase A<sub>2</sub> inhibitor from the blood plasma of *Trimeresurus flavoviridis*. *J. Biochem.* 106, 966-971.

Kondo, H., Kondo, S., Ikezawa, H., Murata, R. E Ohsaka, A . (1960) Studies of the quantitative method for determination of hemorrhagic activity of Habu snake venom. *Jpn. J.Med. Sci. Biol.* 13, 43-51.

Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of Bacteriophage T-4. *Nature*. 227, 608-609.

Lehninger, A. L. (1986) In: Princípios de Bioquímica, pp.71-89 (Sarvier., Ed.) São Paulo, Brasil.

Lizano, S., Lomonte, B., Fox, J.W. e Gutiérrez, J.M. (1997) Biochemical characterization and pharmacological properties of a phospholipase A<sub>2</sub> myotoxin inhibitor from the plasma of the snake *Bothrops asper*. *Biochem. J.* 326, 853-859.

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, L.A . e Randall, R.S. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.

Mandelbaum, F.R., Reichl, A. P. e Assakura, M.T. (1976) Some physical and biochemical characteristics of HF<sub>2</sub>, one of the hemorrhagic factors in the venom of *Bothrops jararaca*. In: *Animal, Plant and Microbial Toxins*, Vol. 1, pp. 111-121. (Ohsaka, A., Hayashi, K. e Sawai, Y., Eds.) New York: Plenum Press.

Mandelbaum, F.R., Reichl, A. P. e Assakura, M.T. (1982) Isolation and characterization of a proteolytic enzyme from the venom of the snake *Bothrops jararaca* (jararaca). *Toxicon*. 20, 955-972.

Manzi, A. E. e Varki, A. (1993) In: Glycobiology: a practical approach, pp.27-77. (Fukuda, M. e Kobata, A. Eds.) New York.

Markland, F. S. (1998) Snake venoms and the hemostatic system. *Toxicon*. 36 (12), 1749-1800.

- Marsh, N. (1994) Inventory of haemorrhagic factors from snake venoms. *Thrombosis and Haemostasis*. 71(6), 793-797.
- Maruyama, M., Sugiki, M., Yoshida, E., Mihara, H. e Nakajima, N. (1992) Purification and characterization of two fibrinolytic enzymes from *Bothrops jararaca* (jararaca) venom. *Toxicon*. 30, 853-864.
- Maruyama, M., Tanigawa, M., Sugiki, M., Yoshida, E. e Mihara, H. (1993) Purification and characterization of low molecular weight fibrinolytic/hemorrhagic enzymes from snake (*Bothrops jararaca*) venom. *Enzyme Protein*. 47, 124-135.
- Matsui, T., Fujimura, Y. e Titani, K. (2000) Snake venom proteases affecting hemostasis and thrombosis. *Biochim. Biophys. Acta*. 1477, 146-156.
- Mebis, D., Omori-Satoh, T., Yamakawa, Y. e Nagaoka, Y. (1996) Erinacin, an antihaemorrhagic factor from the European hedgehog, *Erinaceus europaeus*. *Toxicon*. 34, 1313-1316.
- Mebis, D. (1998) Enzymes in snake venoms: an overview. In: *Enzymes from snake venoms*, pp.1-10 (Bailey, G.S., Ed.) Colorado: Alaken, Inc.
- Melo, P.A. e Suarez-Kurtz, G. (1988) Release of sarcoplasmic enzymes from skeletal muscle by *Bothrops jararacussu* venom: antagonism by heparin and by serum of south american marsupials. *Toxicon*. 26, 87-95.
- Moussatché, H., Yates, A., Leonardi, F. e Borche, L. (1979) Mechanisms of resistance of the opossum to some snake venoms. *Toxicon*. 17, 130.
- Moussatché, H., Leonardi, F. e Mandelbaum, F. (1981) Inhibición por una proteína aislada del suero de *Didelphis marsupialis* a

la acción hemorrágica producida por una fracción del veneno de *Bothrops jararaca*. *Acta Cient. Venezolana*. 32, suppl.I.

Murphy, G. e Willenbrock. F. (1995) Tissue inhibitors of matrix metalloendopeptidases. *In: Methods in Enzymology - Proteolytic Enzymes*, vol. 248. Part E, pp.496-510 (Barret, A.J., Ed.) New York : Academic Press.

Neves-Ferreira, A.G., Valente, R.H., Sá, P.G., Rocha, S.L.G., Moussatché, H., Domont, G.B. e Perales, J. (1999) New methodology for the obtainment of antithrombotic factors from the South American opossum (*Didelphis marsupialis*) and jararaca snake (*Bothrops jararaca*). *Toxicon*. 37, 1417-1429.

Neves-Ferreira, A. G.C., Cardinale, N., Rocha, S.L.G., Perales, J. e Domont, G.B. (2000) Isolation and characterization of DM40 e DM43, two snake venom metalloproteinase inhibitors from *Didelphis marsupialis* serum. *Biochim. Biophys. Acta*. 1474, 309-320.

Neves-Ferreira, A. G.C. (2000) Imunidade natural: Inibidores de metaloproteases de veneno de serpentes presentes no soro de *Didelphis marsupialis* (gambá). Tese de Doutorado. Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular, IOC-FIOCRUZ, Rio de Janeiro.

Odell, G. V., Ferry, P.C., Vick, L.M., Fenton, A . W., Decker, L.S., Cowell, R.L., Ownby, C. L. e Gutiérrez, J.M. (1998) Citrate inhibition of snake venom proteases. *Toxicon*. 36, 1801-1806.

Ohkura, N., Okuhara, H., Inoue, S., Ikeda, K. e Hayashi, K. (1997) Purification and characterization of three distinct types of phospholipase A<sub>2</sub> inhibitors from the blood plasma of the chinese mamushi, *Agkistrodon blomhoffii siniticus*. *Biochem. J*. 325, 527-531.

- Omori-Satoh, T. (1977) Antihemorrhagic factor as a proteinase inhibitor isolated from the serum of *Trimeresurus flavoviridis*. *Biochim. Biophys. Acta.* 495, 93-98.
- Omori-Satoh, T., Nagaoka, Y. e Mebs, D. (1994) Muscle extract of hedgehog, *Erinaceus europaeus*, inhibits hemorrhagic activity of snake venoms. *Toxicon.* 32, 1279-1281.
- Ouyang, C. e Huang, T.F. (1976) Purification and characterization of the fibrinolytic principle of *Agkistrodon acutus* venom. *Biochim. Biophys. Acta.* 439, 146-153.
- Ownby, C.L., Selistre de Araujo, H.S., White, S.P. e Fletcher, J.E. (1999) Lysin 49 phospholipase A<sub>2</sub> proteins. *Toxicon.* 37, 411-445.
- Paine, M.J.I., Desmond, H.P., Theakston, R.D.G. e Crampton, J.M. (1992) Purification, cloning, and molecular characterization of a high molecular weight hemorrhagic metalloprotease, Jararhagin, from *Bothrops jararaca* venom. *J. Biol. Chem.* 267, 22869-22876.
- Perales, J., Muñoz, R. e Moussatché, H. (1986) Isolation and partial characterization of a protein fraction from the opossum (*Didelphis marsupialis*) serum, with protecting property against the *Bothrops jararaca* snake venom. *An. Acad. Brasil. Cienc.* 58, 155-162.
- Perales, J., Muñoz, R., Graterol, S., Oviedo, O. e Moussatché, H. (1989) New findings on the purification and characterization of an anti-bothropic factor from *Didelphis marsupialis* (opossum) serum. *Brazilian. J. Med. Biol. Res.* 22, 25-28.

Perales, J., Moussatché, H., Marangoni, S., Oliveira, B., e Domont, G.B. (1994) Isolation and partial characterization of an anti-bothropic complex from the serum of South American Didelphidae. *Toxicon*. 32, 1237-1249.

Perales, J., Villela, C., Domont, G.B., Choumet, V., Saliou, B., Moussatché, H., Bon, C. e Faure, G. (1995) Molecular structure and mechanism of action of the crotoxin inhibitor from *Crotalus durissus terrificus* serum. *Eur. J. Biochem.* 227, 19-26.

Perez, J.C., Pichyangkul, S. e Garcia, V.E. (1979) The resistance of three species of warm-blooded animals to western diamondback rattlesnake (*Crotalus atrox*) venom. *Toxicon*. 17, 601-607.

Pichyangkul, S. e Perez, J.C. (1981) Purification and characterization of a naturally occurring antihemorrhagic factor in the serum of the hispid cotton rat (*Sigmodon hispidus*). *Toxicon*. 19, 205-215.

Preneta, A.Z. (1995) Separation on the basis of size: gel permeation chromatography. In: *Protein Purification Methods: a Practical Approach*, pp. 293-306 (Harris, E.L.V. e Angal, S., Eds.) Oxford: Oxford University Press.

Rawlings, N.D. e Barrett, A.J. (1995) Evolutionary families of metallopeptidases. In: *Methods in Enzimology - Proteolytic Enzymes*, vol. 248. Part E. pp. 183-228 (Barrett, A.J., Ed.) New York: Academic Press.

Robeva, A., Politi, V., Shannon, J. D., Bjarnason, J. B., e Fox, J. W. (1991) Synthetic and endogenous inhibitors of snake venom metalloproteinases. *Biomed. Biochim. Acta.* 50, 4-6.

- Rocha, S.L.G., Lomonte, B., Neves-Ferreira, A.G.C., Domont, G.B., Gutiérrez, J.M. e Perales, J. (2000a) Inhibition of snake venom myotoxicity by DM64, a novel antitoxic protein from *Didelphis marsupialis* opossum serum. *Anais do XIII World Congress on Animal, Plant and Microbial toxins* Paris, França.
- Rocha, S.L.G., Frutuoso, V.S., Domont, G., Martins, M.A., Moussatché, H e Perales, J. (2000b) Inhibition of the hyperalgesic activity of *Bothrops jararaca* venom by an antithrombotic fraction isolated from opossum (*Didelphis marsupialis*) serum. *Toxicon*. 389, 875-880.
- Russell, F.E. (1980) Venoms. In: *Snake venom poisoning*, pp. 139-234. Philadelphia, Lippincott.
- Sanchez, E.F., Freitas, T.V., Ferreira-Alves, D.L., Velarde, D.T., Diniz, M.R., Cordeiro, M.N., Agostini-Cotta, G. e Diniz, C.R. (1992) Biological activities of venoms from South American snakes. *Toxicon*. 30, 95-103.
- Scarborough, R.M., Rose, J.W., Naughton, M.A., Phillips, D.R., Nannizzi, Y., Arfsten, A., Campbell, A. M. e Charo, I.F. (1993) Characterization of the integrin specificities of desintegrins isolated from American pit viper venoms. *J.Biol. Chem.* 268, 1058-1065.
- Shimokawa, K., Shannon, J.D., Jia, L. e Fox, J. W. (1997) Sequence and biological activity of cotrocollastatin-C: a desintegrin-like/cysteine-rich two-domain protein from *Crotalus atrox* venom. *Arch. Biochem. Biophys.* 343 (1), 35-43.
- Spackman, D.H., Stein, W.H. e Moore, S. (1958) Automatic recording apparatus for use in the chromatography of amino acids. *Anal. Chem.* 30, 1190-1206.
- Stöcker, W., Grams, F., Baumann, U., Reinemer, P., Gomis-Rüth, F. X., Mc Kay, D.B. e Bode, W. (1995) The metzincins – Topological and sequential relations between the astacins,

adamalysins, serralysins, and matrixins (collagenases) define a superfamily of zinc-peptidases. *Protein Sci.* 4, 823-840.

Stocker, K.F. (1998) Research, diagnostic and medicinal uses of snake venom enzymes. *In: Enzymes from snake venoms*, pp. 705-736 (Bailey, G.S., Ed.) Colorado: Alaken, Inc.

Stone, A. Kroeger, M., e Sang, Q. X. A. (1999) Structure-function analysis of the ADAM family of disintegrin-like and metalloproteinase-containing proteins. *Journal of Protein Chemistry.* 18, 447-465.

Tanizaki, M.M., Zingali, R.B., Kawazaki, H., Imajoh, S., Yamasaki, S. e Susuki, K. (1989) Purification and some characteristics of a zinc metalloprotease from the venom of *Bothrops jararaca* (jararaca). *Toxicon.* 27, 747-755.

Tanizaki, M.M., Kawasaki, H., Suzuki, K. e Mandelbaum, F.R. (1991) Purification of a proteinase inhibitor from the plasma of *Bothrops jararaca* (Jararaca). *Toxicon.* 29, 673-681.

Tanizaki, M.M. (1998) Bothrolysin. *In: Handbook of Proteolytic Enzymes*, pp. 9-11 (Barrett, A. J., Rawlings, N.D e Woessner, J.F., Ed.) Academic Press.

Tarentino, A. L. e Plummer, J. T. H. (1982) Oligosaccharide accessibility to peptide: N-glycosidase as promoted by protein-unfolding reagents. *J. Biol. Chem.* 257 (18), 10776-10780.

Theakston, R.D.G. e Reid, H.A. (1983) Development of simple standart assay procedures for the characterization of snake venoms. *Bull. World Heath Organ.* 61, 949-956.

Theakston, R.D.G. (1996) Snake bite: The kinetics of envenoming and therapy. *In: Envenomings and their treatments*, pp. 117-126 (Bon, C. & Goyffon, M., Eds.) Lyon: Fondation Marcel Mérieux.

- Thwin, M.M. e Gopalakrishnakone, P. (1998) Snake envenomation and protective natural endogenous proteins: a mini review on the recent developments (1991-1997). *Toxicon*. 36, 1471-1482.
- Tomihara, Y., Yonaha, K., Nozaki, M., Yamakawa, M., Kawamura, Y., Kamura, T. e Toyama, S. (1987) Purification of three antihemorrhagic factors from serum of a mongoose (*Hepestes edwardsii*). *Toxicon*. 25, 685-689.
- Tomihara, Y., Yonaha, K., Nozaki, M., Yamakawa, M., Kawamura, Y., Kamura, T. e Toyama, S. (1988) Purification of an antihemorrhagic factor from the serum of the non-venomous snake *Dinodon semicarinatus*. *Toxicon*. 26, 420-423.
- Tu, A. T. (1996) Overview of snake venom chemistry. *Adv. Exp. Med. Biol.* 391, 37-62.
- Usami, Y., Fujimura, Y., Miura, S., Shima, H., Yoshida, E., Yoshioka, A., Hirano, K., Suzuki, M. e Titani, K. (1994) A 28 kDa-protein with desintegrin-like structure (jararhagin-C) purified from *Bothrops jararaca* venom inhibits collagen- and ADP-induced platelet aggregation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 201, 331-339.
- Valente, R.H., Fox, J.W., Perales, J. e Domont, G.B. (1999a) Isolation and functional studies on *Bothrops jararaca* serum inhibitors of snake venom metalloproteinases. *XXVIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular/SBBq*. Caxambu, MG, Brasil.
- Valente, R.H., Neves-Ferreira, A.G. C., Perales, J., Domont, G.B., Shannon, J.D. e Fox, J.W. (1999b) Snake venom metalloproteinase (SVMP) inhibitors from *Bothrops jararaca* and *Didelphis marsupialis* sera. *I Proteolysis Meeting of the International Proteolysis Society*, Mackinac Island, Michigan, USA.

- Van- Seuningem, I. e Davril, M. (1992) A rapid periodic acid-Schiff staining procedure for the detection of glycoproteins using the Phast System. *Electrophoresis*. 18, 97-99.
- Villela, C.G. (2000) Clonagem e expressão do inibidor de crotoxina, CICS, em *Escherichia coli*. Tese de Doutorado. Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular, IOC-FIOCRUZ, Rio de Janeiro.
- Warrell, D. A. (1989) Snake venoms in science and clinical medicine. I. Russell's viper: biology, venom and treatment of bites. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hygiene*. 83, 732-740.
- Warrell, D.A. e Fenner, P.J. (1993) Venomous bites and stings. *Bri. Med. Bull.* 49, 423-439.
- Warrell, D.A. (1996) Clinical features of envenoming from snake bites. In: *Envenomings and their treatments*, pp. 63-76 (Bon, C. & Goyffon, M., Eds.) Lyon: Fondation Marcel Mérieux.
- Weissenberg, S., Ovadia, M., Gideon, F. e Kochva, E. (1991) Antihemorrhagic factors from the blood serum of the western diamondback rattlesnake *Crotalus atrox*. *Toxicon*. 29, 807-818.
- Weissenberg, S., Ovadia, M. e Kochva, E. (1992) Inhibition of the proteolytic activity of hemorrhagin-e from *Crotalus atrox* venom by antihemorrhagins from homologous serum. *Toxicon*. 30, 591-597.
- Woessner Jr., J. F. (1991) Matrix metalloproteinases and their inhibitor in connective tissue remodeling. *FASEB J.* 5, 2145-2154.

Yamakawa, Y. e Omori-Satoh, T. (1992) Primary structure of the antihemorrhagic factor in the serum of the Japanese Habu: a snake venom metalloproteinase inhibitor with a double-headed cystatin domain. *J. Biochem.* 112, 583-589.