



UNIVERSIDADE FEDERAL DO OESTE DO PARÁ  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO E INOVAÇÃO TECNOLÓGICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS NATURAIS DA AMAZÔNIA  
LABORATÓRIO DE BIOPROSPECÇÃO E BIOLOGIA EXPERIMENTAL

ISOLAMENTO E AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES  
BIOLÓGICAS DE UMA NOVA METALOPROTEINASE (SVMP)  
DE CLASSE PIII DA PEÇONHA DE *Bothrops atrox*

LUCIANA APARECIDA FREITAS DE SOUSA

Santarém, Pará  
Fevereiro, 2014

**LUCIANA APARECIDA FREITAS DE SOUSA**

**ISOLAMENTO E AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES  
BIOLÓGICAS DE UMA NOVA METALOPROTEINASE (SVMP)  
DE CLASSE PIII DA PEÇONHA DE *Bothrops atrox***

ORIENTADORA: D. SC. ROSA HELENA VERAS MOURÃO  
COORIENTADORA: D. SC. ANA M. MOURA DA SILVA

Dissertação apresentada à Universidade Federal do Oeste do Pará – UFOPA, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Ambientais, junto ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Recursos Naturais da Amazônia.

Área de concentração: Estudos e Manejos dos Ecossistemas Amazônicos

Linha de pesquisa: Bioprospecção de Recursos Naturais da Amazônia.

**Santarém, Pará  
Fevereiro, 2014**



# DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho a minha querida mãe Ana que sempre foi e sempre será o pilar que me sustenta nesse caminho, sempre me apoiando em minhas escolhas.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha orientadora Rosa Helena Veras Mourão por todos os ensinamentos adquiridos durante esses longos anos de convivência desde a iniciação científica e principalmente por me ensinar a nunca desistir.

Agradeço a minha coorientadora Ana Maria Moura da Silva pelas grandes contribuições com a parte experimental do trabalho e por me receber em seu laboratório de braços abertos.

Agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Naturais da Amazônia – PGRNA, e a todos os professores e funcionários, em especial Lauro Barata, Antônio Carlos Lola, Troy Beldini, Rodrigo Fadini, Keid Nolan, José Mauro, Patrícia Chaves e Luiz Reginaldo pelo conhecimento adquirido. Agradeço ainda à secretária Rose, por sempre atender minhas solicitações com gentileza.

Agradeço a minha família pelo apoio incondicional, principalmente minha mãe Ana e meus irmãos Lucas, Ismael, Anne Cléia e Luzia.

Agradeço a Juliana Raposo por ser peça fundamental para o crescimento e funcionamento do LaBBEx, como profissional exemplar e uma amiga para todas as horas.

Agradeço ao Dr. Ricardo Bezerra que sempre esteve contribuindo para o meu crescimento dentro da vida científica.

Agradeço aos meus companheiros de LabBBEx, que sempre me deram força, em especial Sandra, Celyane, Adrielle, Norah, Taiara.

Agradeço a toda equipe técnica e alunos do Laboratório de Imunopatologia do Instituto Butantan, em especial a Juliana Lech, Leijiane Figueira, Isa Lima, Michelle Almeida, Antônio Portes-Junior, Paloma, que me ajudaram na realização dos experimentos e discussão dos resultados.

Agradeço ao Prof<sup>o</sup> Msc. Hipócrates Chalkidis e seus alunos do Laboratório de Zoologia das Faculdades Integradas do Tapajós e ao Prof<sup>o</sup> Dr. Alfredo Santos e sua equipe do Laboratório de Zoologia da UFOPA, pelas coletas das serpentes e extração de peçonha.

Agradeço ao biotério do Laboratório de Herpetologia do Instituto Butantan pelo fornecimento da peçonha de espécimes de cativeiro.

Agradeço a Dr<sup>a</sup> Solange Serrano pelas análises de espectrometria de massas, e ao Dr. Benedito Carlos Prezoto pelo auxílio nos testes de coagulação.

Agradeço aos meus queridos amigos e colegas de turma pelo companheirismo e carinho durante o curso, em especial Wania, Alex, Víctor, Margarida, Marissol, e Josan.

Agradeço a minha irmã de vida científica Valéria Mourão, pela força, amizade e contribuições no desenvolvimento da parte escrita.

Agradeço aos meus irmãos de coração que sempre estiveram ao meu lado, nos momentos felizes e tristes, em especial a Leomara, Cárliison, Rayanne, Ana Paula, Thuanny, Joanderson, Lívía, Suzane e Anderson.

Agradeço minha companheira de laboratório e alojamento Diana Amazonas, pela contribuição nas coletas, nas discussões do trabalho e cuidados durante o período fora de casa.

Agradeço o apoio financeiro concedido pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), o Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico (CNPq), Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Toxinas (INCTTox).

# EPÍGRAFE

“Cada fracasso supõe um capítulo a mais na história da nossa vida e uma lição que nos ajuda a crescer. Não desanime com os fracassos. Aprenda com eles, e siga em frente”.

*Autor Desconhecido*

SOUSA, Luciana Aparecida Freitas. Isolamento e avaliação das atividades biológicas de uma nova metaloproteinase (SVMP) de classe PIII da peçonha de *Bothrops atrox*, 2014. 84 pg. Dissertação de Mestrado em Recursos Naturais da Amazônia. Área de concentração: Estudos e Manejos dos Ecossistemas Amazônicos- Programa de Pós-Graduação em Recursos Naturais da Amazônia. Universidade Federal do Oeste do Pará- UFOPA, Santarém, 2014.

## RESUMO

A serpente *Bothrops atrox* é a principal causadora de acidentes ofídicos na Amazônia brasileira. A composição da peçonha dessa espécie sofre variações em função do crescimento e localização geográfica, sendo que as metaloproteinases de peçonha de serpentes (SVMPs) são os componentes mais abundantes dessa peçonha. As SVMPs são responsáveis pela hemorragia, o sintoma mais característico do envenenamento botrópico. Nesse estudo, foram avaliados dois *pools* de peçonha total de *B. atrox*, provenientes de ambiente natural (Floresta Nacional do Tapajós- PA, Brasil) e de cativeiro (serpentário do Instituto Butantan-SP, Brasil). As diferenças na composição dos dois *pools* de peçonha foram avaliadas por cromatografia de fase reversa. Além disso, foram isoladas duas isoformas de SVMPs de classe PIII por cromatografia de interação hidrofóbica e troca aniônica dos *pools* avaliados. Os *pools* de peçonhas exibiram perfis cromatográficos similares, porém com diferenças quantitativas na expressão de fosfolipases A<sub>2</sub>, SVMPs classe P-I e serinoproteinases, que predominaram na peçonha da área de floresta. Em ambos os casos, as SVMPs foram as toxinas majoritárias nas peçonhas de serpentes dos dois ambientes. As SVMPs-PIII isoladas exibiram atividade hemorrágica elevada e capacidade de degradar a fibrina de maneira dose dependente. No entanto, apenas a isoforma presente na peçonha oriunda de espécimes de cativeiro exibiu atividade pró-coagulante em presença de cálcio. Após o isolamento das SVMPs de classe P-III e sequenciamento com mais de 50% de cobertura, não foi possível detectar diferenças estruturais entre elas ou com a jararagina (SVMPs-PIII de *Bothrops jararaca*). Quando comparadas as SVMPs de *B. atrox* e *B. jararaca*, apenas a jararagina foi capaz de inibir a agregação plaquetária induzida por colágeno, o que sugere a presença de diferenças entre as moléculas, seja nas regiões que não foram sequenciadas ou glicosilação. Assim foi isolada uma nova SVMP de classe PIII da peçonha de *B. atrox* muito similar em estrutura com a jararagina, porém sem atividade de inibição agregação plaquetária.

Palavras-chave: *Bothrops atrox*; SVMPs-PIII; hemorragia; cativeiro; floresta.

SOUSA, Luciana Aparecida Freitas. Isolation and evaluation of the biological activities of a new metalloproteinase (SVMP) PIII class from *Bothrops atrox*, 2014. 84 pg. Master's degree in Natural Resources from Amazon. Area of concentration: Bioprospecting and Natural Resource Management from Amazon. Universidade Federal do Oeste do Pará- UFOPA, Santarém, 2014.

## ABSTRACT

The *Bothrops atrox*, is the main cause of snakebites in the Brazilian Amazon. The venom's composition of this species suffer variations due to growth and geographic location, but the snake venom metalloproteinases (SVMPs) are the most abundant components of this venom. The SVMPs are responsible for hemorrhage, the most characteristic symptom of *Bothrops* poisoning. In this study, two pools of full venom of *B. atrox* were evaluated, from the natural environment (Floresta Nacional do Tapajós, PA, Brazil) and captive (serpentarium of Instituto Butantan, SP, Brazil). The differences in the composition of the two pools of venom were evaluated by reverse phase chromatography. In addition, two SVMPs isoforms from PIII class were isolated by hydrophobic interaction chromatography and anion exchange of the pools evaluated. The pools of venoms showed similar chromatographic profiles, but with quantitative differences in expression of phospholipase A<sub>2</sub>, SVMPs PI class and serino proteinases, which predominated in the venom of forest area. In both cases, the majority were SVMPs toxins in snake venoms of the two environments. The SVMPs-PIII isolated exhibited hemorrhagic activity and high ability to degrade fibrin in a dose-dependent way. However, only the isoform present in the venom of deriving captive specimens exhibited procoagulant activity in the presence of calcium. After isolation of SVMPs P- III class and sequencing of more than 50 % coverage, we could not detect structural differences between them or with jararhagin (SVMPs-PIII *Bothrops jararaca*). Though only the jararhagin was able to inhibit platelet aggregation induced by collagen, suggesting the presence of differences between the molecules, or in regions that have not been sequenced or glycosylation. So was isolated a new class of SVMP- PIII venom of *B. atrox* very similar in structure with jararhagin, but without inhibiting platelet aggregation activity.

Keywords: *Bothrops atrox*; SVMPs - PIII; hemorrhage; captivity; forest.

# SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS .....</b>	<b>XII</b>
<b>INTRODUÇÃO GERAL .....</b>	<b>14</b>
<b>1. Revisão Bibliográfica .....</b>	<b>15</b>
1.1 Família Viperidae.....	15
1.1.1 Gênero <i>Bothrops</i> .....	17
1.1.2. <i>Bothrops atrox</i> .....	18
1.2 Peçonha de Serpentes .....	19
1.2.1 Metaloproteínas de peçonhas de serpentes (SVMPs) .....	21
1.2.2 Variabilidade na composição da peçonha de <i>B. atrox</i> .....	24
<b>2. Objetivos.....</b>	<b>25</b>
2.1 Objetivo Geral .....	25
2.2 Objetivos Específicos .....	26
<b>3. Referências .....</b>	<b>26</b>
<b>CAPÍTULO 1 .....</b>	<b>33</b>
<b>1. Introdução.....</b>	<b>34</b>
<b>2. Material e Métodos .....</b>	<b>36</b>
2.1 Peçonha.....	36
2.2 Fracionamento cromatográfico da peçonha de <i>B. atrox</i> .....	36
2.2.1 Fracionamento em coluna de fase reversa.....	36
2.2.2 Isolamento das metaloproteínas (SVMPs).....	37
2.2.2.1 Primeira etapa de purificação.....	37
2.2.2.2.Segunda etapa de purificação.....	38
2.3 Determinação quantitativa de proteínas .....	38
2.4 Eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de SDS (SDS-PAGE).....	38
2.5 Autólise das SVMPs isoladas.....	39
2.6 Análise por espectrometria de massas .....	39
2.7 Atividades Biológicas .....	40
2.7.1 Modelos animais utilizados.....	40
2.7.2 Atividade hemorrágica .....	40
2.7.2.1 Determinação do diâmetro médio da lesão hemorrágica .....	40
2.7.3 Atividade fibrinolítica.....	41
2.7.4 Atividade Coagulante .....	41

2.7.5 Agregação Plaquetária .....	42
2.8 Análise estatística.....	43
<b>3. Resultados</b> .....	<b>43</b>
3.1 Comparação dos perfis cromatográficos dos pools de peçonha.....	43
3.2 Isolamento das SVMPs classe PIII .....	44
3.3 Autólise das SVMPs isoladas.....	48
3.4 Caracterização das SVMPs por espectrometria de massas .....	49
3.5 Determinação das atividades biológicas.....	52
3.5.1 Atividade Hemorrágica .....	52
3.5.2 Atividade Fibrinolítica.....	52
3.5.3 Atividade Coagulante .....	53
3.5.4 Atividade de inibição da agregação plaquetária .....	56
<b>4. Discussão</b> .....	<b>56</b>
<b>5. Conclusão</b> .....	<b>59</b>
<b>Agradecimentos</b> .....	<b>60</b>
<b>Conflito de interesse</b> .....	<b>60</b>
<b>Referências</b> .....	<b>60</b>
<b>ANEXOS</b> .....	<b>66</b>

## LISTA DE FIGURAS

### Figuras da Revisão Bibliográfica

<b>Figura 1.</b> <i>Azemiops feae</i> .....	14
<b>Figura 2-</b> Juvenil e adulto de <i>Bothrops atrox</i> e sua distribuição geográfica.....	17
<b>Figura 3-</b> Representação esquemática da estrutura do sítio ativo das metaloproteinases do clã das metzincinas.....	19
<b>Figura 4-</b> Estrutura das classes de SVMPs e suas subclasses.....	20

### Figuras do Capítulo 1

<b>Figura 1</b> - Perfil cromatográfico obtido em coluna de fase reversa da peçonha de <i>Bothrops atrox</i> .....	43
<b>Figura 2</b> - Perfil cromatográfico obtido em coluna de interação hidrofóbica da peçonha de <i>Bothrops atrox</i> .....	44
<b>Figura 3</b> - Perfil cromatográfico obtido em coluna de troca aniônica de frações isoladas da peçonha de <i>Bothrops atrox</i> .....	45
<b>Figura 4</b> - Autólise das metaloproteinases isoladas de <i>Bothrops atrox</i> .....	46
<b>Figura 5</b> - Sequência parcial das metaloproteinases isoladas de <i>Bothrops atrox</i> alinhadas com outras SVMPs de classe PIII.....	48
<b>Figura 6</b> - Sequência parcial das metaloproteinases isoladas de <i>Bothrops atrox</i> alinhadas com a sequência da jararagina.....	49
<b>Figura 7</b> - Atividade hemorrágica das metaloproteinases isoladas de <i>Bothrops atrox</i> .....	50
<b>Figura 8-</b> Comparação da atividade fibrinolítica da peçonha e das metaloproteinases isoladas de <i>Bothrops atrox</i> .....	51
<b>Figura 9</b> - Comparação da atividade fibrinolítica das metaloproteinases isoladas de <i>Bothrops atrox</i> .....	51
<b>Figura 10</b> - Representação gráfica do processo de coagulação induzida pela peçonha e metaloproteinases isoladas de <i>Bothrops atrox</i> .....	52
<b>Figura 11</b> - Tempo de coagulação induzido pela peçonha e metaloproteinases isoladas de <i>Bothrops atrox</i> .....	53

**Figura 12** - Firmeza máxima do coágulo induzida pela peçonha e metaloproteinases isoladas de *Bothrops atrox*.....53

**Figura 13** - Ensaio de inibição da agregação plaquetária com as metaloproteinases isoladas de *Bothrops atrox*.....54

## INTRODUÇÃO GERAL

O envenenamento causado por serpentes é um problema médico-social relevante. Apesar dos dados epidemiológicos com relação ao envenenamento por serpentes não serem precisos, a Organização Mundial de Saúde considera o ofidismo como uma doença tropical negligenciada, que afeta milhares de indivíduos seja na forma de mortalidade e/ou morbidade (sequelas) (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2009). No Brasil, segundo dados do Ministério da Saúde no ano de 2012 ocorreram 27.719 acidentes com serpentes peçonhentas, o gênero *Bothrops* foi responsável por 75% desses acidentes (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014 <<http://dtr2004.saude.gov.br/sinanwebr>>). A região Norte responde por 32% dos acidentes registrados, e o Pará é o Estado onde mais ocorreram acidentes ofídicos, com 4.823 casos notificados. A cidade de Santarém é o município paraense com o maior número de notificações de acidentes com serpentes do gênero *Bothrops*, com 1841 casos notificados no período de 2001 a 2011 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014 <<http://dtr2004.saude.gov.br/sinanwebr>>).

Os envenenamentos botrópicos são caracterizados por efeitos locais, sistêmicos ou ambos. Efeitos locais frequentemente incluem dor, hemorragia, edema, mionecrose e inflamação no local da picada (WARRELL, 2004). Efeitos sistêmicos resultam em alterações na coagulação sanguínea com quadro de coagulopatia de consumo, alterações cardiovasculares, choque hipovolêmico, alterações renais e hemorragias distantes do local da picada (WARRELL, 2004). Estas alterações são manifestadas logo após o acidente e resultam da ação sinérgica das diferentes toxinas que compõem a peçonha (GUTIÉRREZ & RUCAVADO, 2000; GUTIÉRREZ et al., 2005).

As peçonhas de serpentes surgiram no processo evolutivo como importante vantagem para a imobilização rápida da presa e a defesa contra predadores (LÓPEZ-LOZANO et al. 2002). Para isso incluem-se nas peçonhas toxinas extremamente ativas direcionadas a importantes alvos fisiológicos de mamíferos ou invertebrados, principalmente no sistema nervoso e no controle da hemostasia (CALVETE et al., 2009). Dentre as toxinas, as metaloproteinases presentes na peçonha são as principais responsáveis pelo quadro hemorrágico característico do envenenamento botrópico (GUTIERREZ et al., 2005; MOURA-DA-SILVA et al., 2007).

Dentro deste contexto, e como parte do projeto de pesquisa, “*Bothrops atrox* no Oeste do Pará - hábitos alimentares, composição do veneno e envenenamento experimental de espécimes coletados em áreas de floresta, savana e cultivo de soja (CAPES Processo AUX-PE-TOXINOLOGIA-1217/2011)”, o presente trabalho avaliou a composição da peçonha de *Bothrops atrox* de dois ambientes diferentes, ambiente natural (Floresta Nacional do Tapajós-PA, Brasil) e de cativeiro (serpentário do Instituto Butantan-SP, Brasil). Além disso, foi realizado o isolamento e a caracterização das atividades biológicas de metaloproteinases hemorrágicas da peçonha de *B. atrox*.

## 1. Revisão Bibliográfica

### 1.1 Família Viperidae

As serpentes peçonhentas estão incluídas na superfamília Colubroidea (CUNDALL & GREENE, 2000) e esta subdivida em sete famílias: Colubridae, Elapidae, Homalopsidae, Lamprophiidae, Preatidae, Viperidae e Xenodermatidae (PYRON et al., 2011). No Brasil, as famílias Viperidae e Elapidae representam o grupo de maior importância para a saúde pública, sendo que Viperidae é a responsável pela maioria e os mais graves acidentes ofídicos registrados (MELGAREJO, 2009).

As serpentes pertencentes à família Viperidae possuem dentição tipo solenóglifa, na qual o maxilar é reduzido e móvel com presas muito desenvolvidas na região anterior. As presas são canaliculadas e ligadas por meio de ductos a glândulas de peçonha (LOCK, 2008). Os viperídeos de pequeno porte e juvenis de espécies grandes se alimentam de lagartos e anfíbios, enquanto que as espécies maiores se alimentam de mamíferos. No entanto, as dietas algumas vezes podem ser extremamente variadas (POUGH et al., 2004).

Os representantes de Viperidae estão distribuídos nas Américas, África (exceto Madagascar), Europa, Ásia, Indonésia, Filipinas. Não ocorrem na Austrália e em Papua-Nova Guiné (FRANCO, 2009). A maioria das espécies são terrícolas, porém alguns representantes são arborícolas, sendo encontradas em ambientes de floresta tropical, desertos e até em regiões montanhosas. Viperidae apresenta aproximadamente 228 espécies (POUGH et al., 2004), distribuídas nas subfamílias Azemiopinae, Viperinae, Crotalinae (FRANCO, 2009; PYRON et al., 2011).

A subfamília Azemiopinae é composta apenas por *Azemiops feae*, uma espécie rara do Sudeste Asiático (FERRAREZZI, 1994), considerada por muitos autores como mais primitiva (POUGH et al., 2004). A serpente *Azemiops feae* é ovípara, apresenta cerca de 70 cm de comprimento, cabeça achatada e elíptica, cauda curta, corpo robusto e recoberto com escudos grandes, dentes curtos, glândulas de peçonha pequenas, e hiberna durante o inverno (MALOOW et al., 2003).



**Figura 1.** *Azemiops feae*. Foto Ivan Hendrxx. Fonte: [iwanhx.blogspot.com.br/2010/10/azemiops-update.html](http://iwanhx.blogspot.com.br/2010/10/azemiops-update.html) Acessado em 18-04-14.

A subfamília de Viperinae está distribuída na África, Europa, Ásia e Ilhas Indonésias, com aproximadamente 9 a 12 gêneros, cerca de 72 espécies. Os gêneros mais representativos desta subfamília são: *Atheris*, *Bitis*, *Causus*, *Cerastes*, *Daboia*, *Echis*, *Eristocophis*, *Macrovipera* e *Vipera* (POUGH et al., 2004). Os representantes não apresentam fosseta loreal, com as placas labiais separadas do olho, escamas dorsais geralmente quilhadas e com cabeça recoberta dorsalmente por escamas pequenas com raras excessões (FERRAREZZI, 1994). As espécies podem ser vivíparas ou ovíparas, e o comprimento do corpo pode variar desde 1,0 m até espécies maiores que 1,7 m (*Daboia russelii*) (POUGH et al., 2004).

A subfamília Crotalinae apresenta cerca de 18 gêneros, 156 espécies distribuídas pelas Américas, leste da Ásia (Japão e Índia), Filipinas e Ilhas da Indonésia. Os gêneros mais representativos de Crotalinae são: *Agkistrodon*, *Bothriechis*, *Bothrops*, *Calloselasma*, *Cerrophidion*, *Crotalus*, *Deinagkistrodon*, *Gloydus*, *Hypnale*, *Lachesis*, *Ovophis*, *Porthidium*, *Sistrurus*, *Trimeresurus*, *Tropidolaemus* (POUGH et al., 2004). A característica exclusiva da subfamília é a presença de fosseta loreal, órgão termossensível que permite a captação de variações de temperatura no ambiente (WUSTER et al., 2008). Os maiores

crotalíneos ultrapassam o comprimento de 3,5 metros (*Lachesis*), e geralmente são vivíparos exceto *Calloselasma*, *Ovophis*, *Lachesis* e *Trimeresurus* que são ovíparos (POUGH et al., 2004).

### 1.1.1 Gênero *Bothrops*

Os botropóides sul-americanos (Viperidae) compreendem um grupo de serpentes muito diverso que, inicialmente, eram incluídos no gênero *Bothrops* e depois foram classificados em cinco gêneros: *Botrocophias*, *Bothriopsis*, *Bothropoides*, *Rhinocerophis* e *Bothrops*. A filogenia do grande grupo de botropóides sul-americanos já passou por diversas revisões taxonômicas (WERMAN, 1992; SALOMÃO et al., 1997; PARKINSON, 1999; WUSTER et al., 2002; FENWICK et al., 2009; CARRASCO et al. 2012), mas ainda não está totalmente elucidada. De acordo com a última revisão taxonômica, proposta por Carrasco e colaboradores (2012), apenas a linhagem correspondente ao gênero *Botrocophias* foi considerada como um grupo monofilético na base dos botropóides sul-americanos. Por conseguinte, os autores propuseram a sinonimização de *Bothriopsis*, *Bothropoides* e *Rhinocerophis* com *Bothrops*. O gênero *Bothrops* foi então considerado como um grupo monofilético suportado por cinco sinapomorfias: espaço interorbital/largura máxima da cabeça, largura mínima entre escamas frontais, comprimento da escama frontal, escamas internas em contato e escama parietal em forma quadrangular.

O gênero *Bothrops* atualmente compreende 42 espécies (Carrasco et al., 2012), com características morfológicas e ecológicas bem diversificadas. Os representantes deste gênero possuem a cauda sem maiores modificações, geralmente com escamas subcaudais em pares (MELGAREJO, 2009), e os juvenis de algumas espécies apresentam a cauda com coloração clara, que geralmente escurece com o amadurecimento (CAMPBELL & LAMAR, 2004). As espécies apresentam dentição do tipo solenóglifa, fosseta loreal e grande variação no padrão de coloração (MELGAREJO, 2009). As serpentes do gênero possuem hábito noturno, no entanto, algumas espécies que habitam regiões em altitudes elevadas são ativas durante o dia (CAMPBELL & LAMAR, 2004).

As serpentes botrópicas são conhecidas comumente como jararacas e amplamente distribuídas nas regiões tropicais da América Latina, partes do sul das ilhas menores do Caribe, Santa Lúcia e Martinica (CAMPBELL & LAMAR, 2004). O hábito generalista da maioria das espécies é um dos fatores responsáveis pela alta abundância nos mais diversos habitats (MARTINS et al., 2002). Algumas espécies com distribuições relativamente largas são a principal causa de acidentes ofídicos no continente (WARRELL, 2004), dentre essas *B.*

*atrox* é o viperídeo mais frequente na região amazônica, e certamente é considerada a principal causadora de acidentes ofídicos na Região Norte do Brasil (MELGAREJO, 2009).

### 1.1.2. *Bothrops atrox*

*Bothrops atrox* (Figura 1) é encontrada nas planícies tropicais da América do Sul e leste dos Andes, no sudeste da Colômbia, sul e leste da Venezuela, Guiana, Suriname, Guiana Francesa, leste do Equador, leste do Peru, norte da Bolívia e no norte do Brasil, e também ocorre na ilha de Trinidad (CAMPBELL & LAMAR, 2004).

Quanto a dieta alimentar de *B. atrox* esta é bem diversificada, e inclui pequenos mamíferos, aves, sapos e lagartos (MARTINS et al., 2002). *B. atrox* é encontrada com maior frequência em áreas próximas a rios, córregos e igarapés (MELGAREJO, 2009), habita principalmente o chão das matas, embora os juvenis sejam mais abundantes sobre a vegetação baixa (OLIVEIRA & MARTINS, 2001). Além disso, esta serpente pode ser encontrada com frequência em áreas cultivadas, campos úmidos e em torno de habitações humanas (CAMPBELL & LAMAR, 2004).

Os adultos de *B. atrox* apresentam comprimento entre 75-125 cm. A coloração dorsal é extremamente variável e pode ser oliva, marrom, cinza, amarelo ou, raramente amarelo enferrujado (CAMPBELL & LAMAR, 2004). O padrão ventral encontrado varia entre branco, creme, cinza ou amarelado, com manchas escuras que aumentam posteriormente e manchas escuras paraventrals em escalas alternadas. A faixa pós-ocular geralmente sem margem branca, focinho ligeiramente agudo, supralabiais geralmente com pintas escuras. (CAMPBELL & LAMAR, 2004).

A

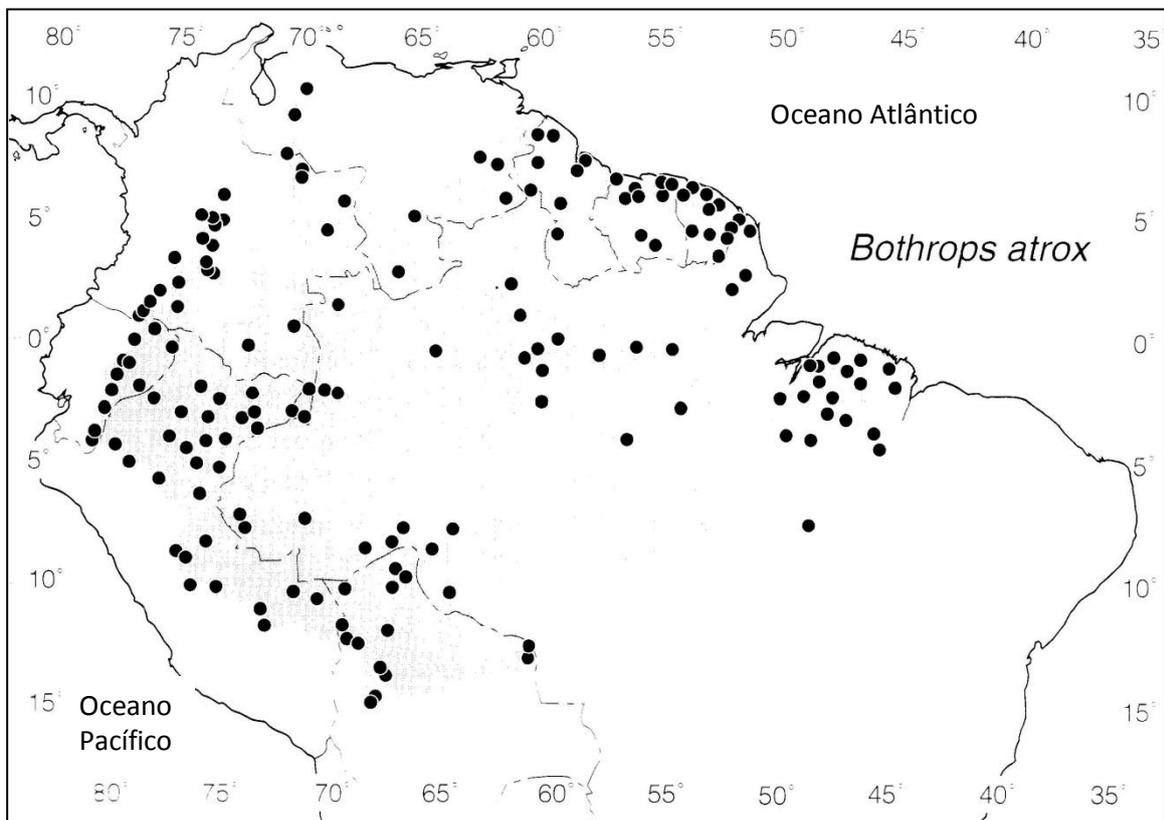


Juvenil



Adulto

B



**Figura 02.** A) Juvenil e adulto de *Bothrops atrox* (extraído de TURCI *et al.*, 2009). B) Distribuição da espécie no norte da América do Sul (extraído de CAMPBELL E LAMAR, 2004).

## 1.2 Peçonha de Serpentes

As serpentes peçonhentas no decorrer do processo evolutivo dos colubroides adquiriram a capacidade de produzir, secretar e inocular toxinas capazes de subjugar suas presas. A peçonha das serpentes é produzida por um par de glândulas exócrinas localizadas junto à margem inferior da mandíbula superior destes animais (FOX & SERRANO, 2008),

que evoluiu a partir de células serosas da glândula oral posterior (KOCHVA, 1987). Em adição a evolução química das peçonhas, diversas modificações na dentição e morfologia cranial surgiram para o desenvolvimento de um mecanismo extraordinário de injeção hipodérmica (POUGH et al., 2004). Assim a sofisticação do aparato inoculador juntamente com a evolução de toxinas letais proporcionaram às serpentes uma grande vantagem no processo evolutivo (RAMOS & SELISTRE-DE-ARAÚJO, 2006), no qual a dieta alimentar desempenhou um papel central na radiação adaptativa dessas serpentes (CALVETE et al., 2009).

A glândula de peçonha secreta uma mistura complexa de moléculas de diferentes naturezas químicas adaptadas pela seleção natural para atuar em sistemas vitais da presa (CALVETE et al., 2009). As peçonhas constituem conjuntos de peptídeos e proteínas (mais de 90% do peso seco), compostos orgânicos com baixo peso molecular e alguns íons, como cálcio, cobalto, ferro, fósforo, potássio, magnésio, manganês, sódio e zinco (MARKLAND, 1998; RAMOS & SELISTRE-DE-ARAÚJO, 2006).

De acordo com os efeitos tóxicos mais intensos as peçonhas de serpentes são classificadas em neurotóxicas ou hemorrágicas. O primeiro grupo compreende as peçonhas de serpentes elapídicas (mambas, cobras e serpentes australianas), e o segundo grupo as de viperídeos (CALVETE et al., 2005). Entre as famílias de proteínas presentes nas peçonhas de viperídeos se destacam: metaloproteinases, serinoproteinases (SVSPs), L-aminoácido oxidases (LAOs), fosfolipases A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>), lectinas tipo-C (CLEC), dentre outras (CALVETE et al., 2009).

A maioria das famílias de proteínas que compõem as peçonhas de viperídeos participa do quadro hemorrágico, interferindo de diferentes formas na coagulação sanguínea e na agregação plaquetária. As metaloproteinases degradam os componentes da membrana basal dos capilares sanguíneos, com conseqüente extravasamento de sangue pelo rompimento dos capilares (GUTIÉRREZ et al., 2005). As PLA<sub>2</sub> causam lesões e necrose nas fibras musculares (GUTIERREZ E RUCAVADO, 2000) e juntamente com as metaloproteinases estimulam a resposta inflamatória local com indução da produção de citocinas, indução de edema e influxo leucocitário (TEIXEIRA et al., 2003; MOURA-DA-SILVA et al., 2007; ZYCHAR et al., 2010) que estariam indiretamente envolvidos na necrose tecidual ocorrente nos envenenamentos (LAING et al., 2003). As SVSPs afetam a agregação plaquetária, clivam o fibrinogênio e atuam na ativação de protrombina (CHUDZINSKI-TAVASSI et al., 2009). As

CLEC ligam-se aos fatores II, IX e X da coagulação e formam complexos que bloqueiam a ativação dos fatores subsequentes da coagulação (CASTRO et al., 2003; LI et al., 2005). As LAOs influenciam a agregação plaquetária, ativam (RODRIGUES et al., 2009) ou inibem a agregação (SUN et al., 2010).

### 1.2.1 Metaloproteínas de peçonhas de serpentes (SVMPs)

As metaloproteínas de peçonha de serpente (SVMPs- *Snake Venoms Metalloproteinases*) são um dos principais alvos de pesquisas, pois desempenham um papel fundamental no envenenamento por viperídeos. As SVMPs constituem um grande grupo de proteases metais-dependentes. Os metais, principalmente os cátions divalentes, como o cálcio e o zinco, desempenham um papel crítico na atividade proteolítica e conseqüentemente na atividade biológica dessas proteases (FOX & SERRANO, 2009). As SVMPs juntamente com as ADAMs (*A Disintegrin And Metalloproteinase*) formam a família adamalinas/reprolisinas (M12b), pertencente ao clã das Metzincinas (BALABAN et al., 2012). Essas enzimas possuem em comum um domínio de ligação de zinco, e um resíduo conservado de metionina que está localizado na porção C-terminal do sítio de ligação com o zinco (HEGE & BAUMANN, 2001). O sítio ligante de zinco do grupo Metzincina (Figura 3) tem uma seqüência de aminoácidos comum em todas as subfamílias (HEBXHXBGBXHZ) no qual H representa a histidina; E, o ácido glutâmico; G, a glicina; B, um resíduo hidrofóbico; X, um aminoácido qualquer e Z, um aminoácido diferente entre as quatro subfamílias, mas é conservado dentro de cada subfamília específica (MARKLAND, 1998).

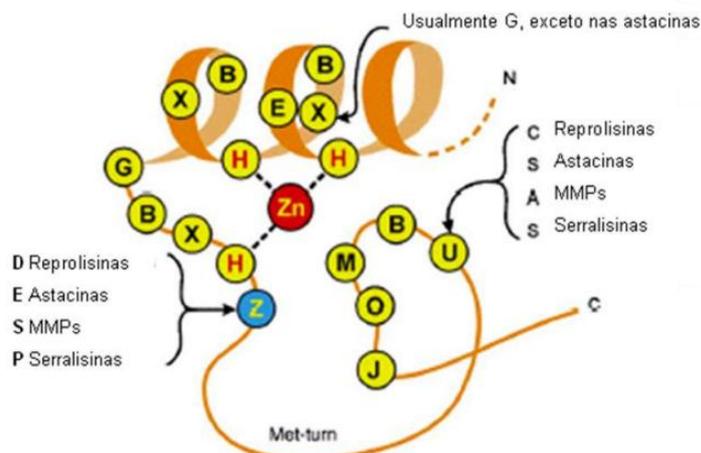
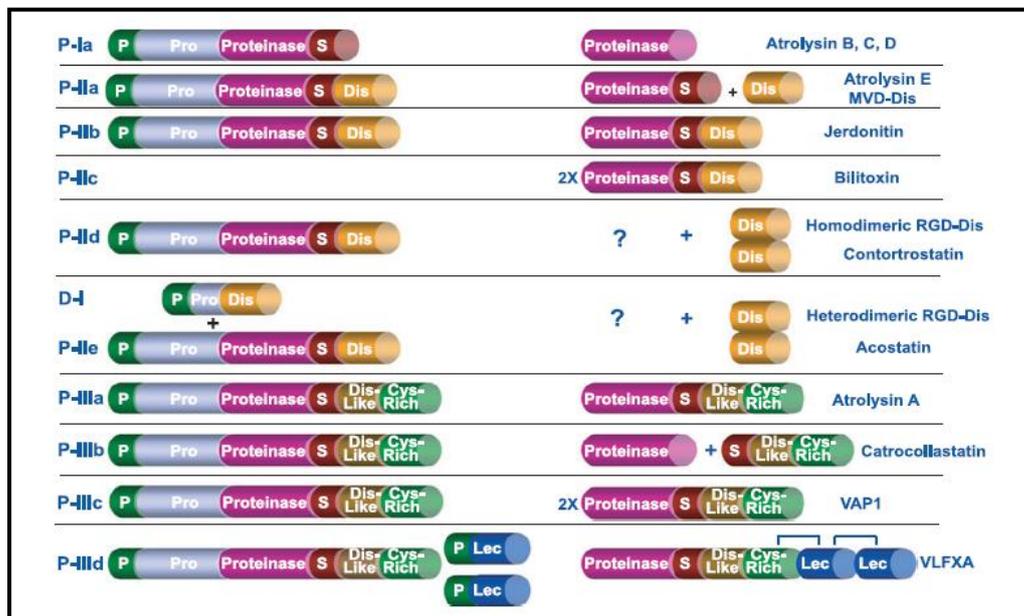


Figura 3: Representação esquemática da estrutura do sítio ativo das metaloproteínas do clã das metzincinas (Adaptada de FOWLKES e WINKLER (2002).

De acordo com a organização de seus domínios e a presença ou ausência destes, as SVMPs são classificadas em três classes: PI, PII e PIII (Figura 4) (FOX & SERRANO, 2008).

A classe PI tem apenas um domínio metaloproteinase, a PII apresenta o domínio metaloproteinase e um domínio disintegrina, a classe PIII possui um domínio rico em cisteína (*Cys-rich*) em adição aos domínios metaloproteinase e tipo disintegrina (*Disintegrin-like*). Evolutivamente a formação das estruturas das SVMPs de viperídeos é caracterizada pela perda repetida de domínios, a perda do domínio rico em cisteína de P-III precede a formação de uma estrutura P-II, que por sua vez precede a evolução de estrutura PI, com a perda do domínio disintegrina (MOURA-DA-SILVA et al., 1996).

As SVMPs são sintetizadas no citoplasma das células secretórias, transferidas para o retículo endoplasmático, em seguida para o complexo de Golgi e depois transportadas para o lúmen da glândula de peçonha através de vesículas secretórias (FOX & SERRANO, 2008). Durante o transporte pelo retículo endoplasmático o peptídeo sinal das proteínas é removido, já no complexo de Golgi ocorrem as modificações pós-traducionais como ativação enzimática pela remoção do segmento pró-proteína (Pro), e clivagem entre os domínios metaloproteinase e disintegrina, que geram as diferentes subclasses (PIa, PIIa, PIIb, PIIc, PIIId, PIIe, PIIIa, PIIIb, PIIIc e PIIId) como mostrado na figura 2 (FOX & SERRANO, 2008).



**Figura 4.** Estrutura das classes de SVMPs e suas subclasses após modificações pós-traducionais (FOX & SERRANO, 2008). P: peptídeo sinalizador; Pro: segmento da pró-proteína, removido durante sua ativação; S: espaçador; Proteinase: sequência HEBXHXBG BXH; Dis: domínio disintegrina; Dis-like: domínio semelhante à disintegrina; Cys-rich: domínio rico em cisteína; Lec: lectina tipo-C; (?): produto processado, mas não identificado na peçonha.

As metaloproteinases da classe I (PI) apresentam na forma madura entre 20 e 30 kDa, e podem ter diversas atividades biológicas como fibrino(geno)lítica, hemorrágica, mionecrótica, inflamatória, pró-apoptótica, ativadora de protrombina, além de inibição da agregação plaquetária (RAMOS & SELISTRE-DE-ARAÚJO, 2006; MOURA-DA-SILVA et al., 2007). Diversas SVMPs de classe PI já foram isoladas da peçonha de *B. atrox*, como a atroxlysin-I, com massa molecular de 23 kDa, que foi purificada da peçonha proveniente do Peru (SANCHEZ et al., 2010). A atroxlysin-I desempenha papel na digestão e degradação dos tecidos, além de ter especificidade seletiva para proteínas plasmáticas, colágeno tipo I e IV, laminina e outros. A batroxase uma isoforma da atroxlysin-I foi isolada da peçonha de *B. atrox* proveniente do Brasil (Estado do Pará), com forte atividade fibrinolítica (CINTRA et al., 2012). Patino e colaboradores (2010) purificaram da peçonha de *B. atrox* proveniente da Colômbia a Batx-I, por meio das técnicas cromatográficas por troca iônica e afinidade. A Batx-I é uma SVMPs-PI com fraca atividade hemorrágica e fibrinogenolítica.

As SVMPs da classe PII são distinguidas por possuírem na forma não processada o domínio metaloprotease ligado ao domínio disintegrina que, na maioria dos casos, após o processamento proteolítico são encontrados na peçonha de forma independente (FOX & SERRANO, 2008). A massa molecular da classe P-II com atividade catalítica varia entre 30 e 60 kDa. As disintegrinas livres monoméricas podem apresentar de 40 a 84 aminoácidos e as diméricas, em torno de 67 resíduos em cada subunidade (CALVETE et al., 2005). As disintegrinas possuem uma sequência conservada de aminoácidos RGD (arginina-glicina-asparagina) e inibem a agregação plaquetária ao se ligarem a integrina  $\alpha_{IIb}\beta_3$  que tem papel fundamental na agregação plaquetária (ANDREWS et al., 2001).

A classe PIII geralmente pode ser encontrada na forma processada com a presença dos três domínios, e apresenta massa molecular entre 60 e 100 kDa, ou ainda apenas com os domínios disintegrina e rico em cisteína (FOX & SERRANO 2008; MARKLAND & SWENSON, 2012). Além disso, esta classe pode apresentar duas cadeias polipeptídicas conectadas por ligações dissulfeto, sendo que uma das cadeias é constituída pelos três domínios característicos das enzimas PIII e a outra por lectina tipo-C (FOX & SERRANO, 2008). As toxinas da classe PIII são altamente hemorrágicas, atuando em células endoteliais, possuem atividade pró-inflamatória e inibem a agregação plaquetária dependente de colágeno (MOURA-DA-SILVA et al., 2007). Da peçonha de *B. atrox* foi isolado uma SVMP de classe PIII, com massa molecular de 55 kDa, que sofre degradação proteolítica e gera um fragmento proteico com apenas os domínios tipo disintegrina e rico em cisteína (PETRETSKI et al.,

2000). Tavares e colaboradores (2008) descreveram três sequências de SVMPs-PIII (Batroxtatin 1, 2 e 3), provenientes do RNAm da glândula de peçonha de um único espécime de *B. atrox* coletado na Serra de Itapipoca (Ceará/Brasil).

### 1.2.2 Variabilidade na composição da peçonha de *B. atrox*

A composição das peçonhas aparentemente é o reflexo da sua função (CASEWELL et al., 2013), na qual quando utilizadas para o forrageamento apresentam alto grau de variação (FRY et al., 2009), o que possibilita as serpentes peçonhentas a capacidade de adaptação a diferentes nichos ecológicos (GIBBS et al., 2011). A variabilidade das peçonhas pode ser verificada entre as diferentes espécies, mas também de forma intraespecífica, representada por variações ontogenéticas (SALDARRIAGA et al., 2003, GUÈRCIO et al., 2006), ligadas ao sexo (MENEZES et al., 2006), ou conforme a distribuição geográfica (ALAPE-GIRÓN et al., 2008). Embora os mecanismos de seleção genética estejam envolvidos nos índices de variabilidade intra-específicas (GIBBS et al., 2009), fatores ambientais como o tipo de alimentação utilizado pelas serpentes, podem influenciar na abundância relativa de classes distintas de toxinas (GIBBS et al., 2011).

Nunez e colaboradores (2009) apresentaram uma análise comparativa dos proteomas de amostras da peçonha de *B. atrox* da Colômbia, Brasil, Peru e Equador, onde os resultados evidenciaram a existência de duas peçonhas (norte e sul) com fenótipos geograficamente diferenciados. Na peçonha proveniente da Colômbia as SVMPs da classe PI e PLA<sub>2</sub> representam as toxinas mais abundantes. No entanto, as peçonhas oriundas do Brasil, Equador e Peru possuem um predomínio de SVMPs da classe PIII. Neiva e colaboradores (2009) analisaram transcriptomas da glândula de peçonha de espécimes de *B. atrox* capturados na região de Manaus (Amazonas-Brasil) e confirmaram o mesmo padrão descrito por Nunez e colaboradores (2009) na composição da peçonha.

As diferenças na composição da peçonha de *B. atrox*, também foram encontradas por Calvete e colaboradores (2011). Os autores analisaram o perfil cromatográfico de peçonhas provenientes dos seguintes locais: Colômbia (Magdalena Médio (Antioquia “Department”)); Venezuela (El Paují (Orinoquia) e Puerto Ayacucho (Amazônia)); e Brasil (São Gabriel da Cachoeira e Presidente Figueiredo (Amazonas), São Bento (Maranhão) e Monte Alegre, Ananindeua, Santa Isabel, Tucuruí, Icoaraci, Barcarena, Acará, Belém, Ilha de Mosqueiro, e Santarém (Pará)). As peçonhas das serpentes colômbianas e venezuelanas analisadas

demonstraram possuir um fenótipo com perfil ontogenético, com predominância de SVMPs classe P-I e PLA<sub>2</sub>s, enquanto que as peçonhas obtidas de serpentes coletadas nas diferentes regiões brasileiras apresentaram fenótipos pedomórficos, com predominância de SVMPs classe P-III.

As peçonhas coletadas nos Estados brasileiros do Amazonas (São Gabriel de Cachoeira, e Presidente Figueiredo), Maranhão (São Bento) e Pará (Monte Alegre, Santarém, Ananindeua, Santa Isabel, Tucuruí, Icoaraci, Barcarena, Acará, Belém, e Ilha de Mosqueiro) apresentaram um perfil cromatográfico muito similar e composições relativas de toxinas das mesmas famílias. Estas peçonhas partilham seis classes de toxinas: SVMPs das classes PIII e PI, PLA<sub>2</sub>, SVSPs, LAOs e proteína secretória rica em cisteína (CRISP). Em adição, as peçonhas oriundas de Acará, Icoaraci e São Gabriel da Cachoeira contêm CLEC. As SVMPs-PIII são as toxinas mais representativas em todas essas peçonhas, e compreendem mais de 50% do total de proteínas. Em particular, as amostras de serpentes coletadas em Santarém apresentaram 69% dessas toxinas (CALVETE et al., 2011). Sousa e colaboradores (2013) também avaliaram a composição da peçonha proveniente da região Oeste do Pará (Floresta Nacional do Tapajós) e verificaram a presença de 42% de SVMPs de classe PIII.

Vale salientar que a maioria das SVMPs isoladas nos trabalhos anteriores são da classe P-I, que embora mantenham a atividade catalítica, não possuem atividade hemorrágica considerável. Dessa forma, dada à abundância de SVMPs da classe P-III nas peçonhas oriundas de Santarém, a grande participação das mesmas no quadro hemorrágico e a alta incidência de acidentes ofídicos na região o isolamento dessas toxinas é extremamente importantes na compreensão dos envenenamentos da região.

## 2. Objetivos

### 2.1 Objetivo Geral

- Isolar e avaliar as atividades biológicas de SVMPs da classe P-III da peçonha de *B. atrox*, proveniente da Floresta Nacional do Tapajós e do serpentário do Instituto Butantan.

## 2.2 Objetivos Específicos

- Comparar os perfis eletroforético e cromatográficos de dois *pools* de peçonha de *B. atrox* extraídos de espécimes provenientes da Floresta Nacional do Tapajós e do serpentário do Instituto Butantan;
- Isolar SVMPs (PIII) da peçonha de *B. atrox* extraída de espécimes provenientes da Floresta Nacional do Tapajós e do serpentário do Instituto Butantan, por meio das técnicas cromatográficas por interação hidrofóbica e por troca aniônica;
- Determinar a sequência das SVMPs isoladas por espectrometria de massas;
- Avaliar as atividades biológicas das SVMPs isoladas: atividade hemorrágica, atividade fibrinolítica, inibição da agregação plaquetária e atividade coagulante.

## 3. Referências

- ALAPE-GIRÓN, A.; SANZ, L.; ESCOLANO, J.; FLORES-DÍAZ, M.; MADRIGAL, M.; SASA, M.; CALVETE, J.J. Snake venomomics of the lancehead pitviper *Bothrops asper*: geographic, individual, and ontogenetic variations. **Journal of Proteome Research** v.7, p.3556–3571, 2008.
- ANDREWS, R.K.; KAMIGUTI, A.S.; BERLANGA, O.; LEDUC, M.; THEAKSTON, R.D. G.; WATSON, S.P. The use of snake venom toxins as tools to study platelet receptors for collagen and von willebrand factor. **Haemostasis** v.31, p.155–172, 2001.
- BALABAN, N.P.; RUDAKOVA, N.L.; SHARIPOVA, M.R.. Structural and Functional Characteristics and Properties of Metzincins. **Biochemistry** v.77, p.119-127, 2012.
- CAMPBELL, J.A.; LAMAR, W.W. **The Venomous Reptiles of the Western Hemisphere**. Cornell University Press: Ithaca, New York, 2004.
- CALVETE, J.J.; MARCINKIEWICZ, C.; MONLEÓN, D.; ESTEVE, V.; CELDA, B.; JUÁREZ, P.; SANZ, L. Snake venom disintegrins: evolution of structure and function. **Toxicon** v.45, p.1063–1074, 2005.
- CALVETE, J.J.; SANZ, L.; ANGULO, Y.; LOMONTE, B.; GUTIÉRREZ, J.M. Venoms, venomomics, antivenomics. **FEBS Letters**, v.583, p. 1736–1743, 2009.
- CALVETE, J.J.; SANZA, L.; PÉREZA, A.; BORGES, A.; VARGAS, A.M.; LOMONTE, B.; ÂNGULO, Y.; GUTIÉRREZ, J.M.; CHALKIDIS, H.M.; MOURÃO, R.H.V.; FURTADO, M.F.; MOURA-DA-SILVA, A.M. Snake population venomomics and antivenomics of *Bothrops*

- atrox*: Paedomorphism along its transamazonian dispersal and implications of geographic venom variability on snakebite management. **Journal of proteomics** v.74, p. 510–527, 2011.
- CARRASCO, P.A.; MATTONI, L.I.; LEYNAUD, G.C.; SCROCCHI, G.J. Morphology, phylogeny and taxonomy of South American bothropoid pitvipers (Serpentes, Viperidae). **Zoologica Scripta** v.41, p.109-124, 2012.
- CASEWELL, N.R.; WUSTER, W.; VONK, F.J.; HARRISON, R.A.; FRY, B.G. Complex cocktails: the evolutionary novelty of venoms. **Trends in Ecology and Evolution** v.28, 2013.
- CASTRO, H.C.; LEMOS, M.G.J.; BON, C.; ZINGALI, R.B. Comparative evaluation of immunological and structural similarities of snake venom C-type lectin proteins. **Toxicon** v.41, p.525–528, 2003.
- CHUDZINSKI-TAVASSI, A.M.; CARRIJO-CARVALHO, L.C.; FARIA, F.; FLORES, M.P.A.; SIMONS, S.M. Exogenous factors affecting hemostasis – Therapeutic perspectives and biotechnological approaches. In: LIMA, M.E. et al. (Eds). **Animal toxins: State of the Art**. Ed. UFMG: Belo Horizonte, p.495-523, 2009.
- CINTRA, A.C.O.; DE TONI, L.G.B.; SARTIM, M.A.; FRANCO, J.J.; CAETANO, R.C.; MURAKAMI, M.T.; SAMPAIO, S.V. Batroxase, a new metalloproteinase from *B. atrox* snake venom with strong fibrinolytic activity. **Toxicon** v.60, p.70–82, 2012.
- CUNDALL, D.; GREENE, H.W. Feeding in snakes. In: SCHWENK, K. (Ed) **Feeding: Form, Function and Evolution in Tetrapod Vertebrates**. Academic Press, p.293-333, 2000.
- FENWICK, A.M.; GUTBERLET, R.L.; JR, EVANS, J.A.; PARKINSON, C.L. Morphological and molecular evidence for phylogeny and classification of South American pitvipers, genera *Bothrops*, *Bothriopsis* and *Bothrocophias* (Serpentes: Viperidae). **Zoological Journal of the Linnean Society**, v.56, p. 617–640, 2009.
- FERRAREZZI, H. Uma sinopse dos gêneros e classificação das Serpentes (Squamata) I. Scolecophidia e Alethynophidia não colubrídeos. In: NASCIMENTO L. et al. (Eds) **Herpetologia no Brasil**. Fund. Biodiversitas & Fund. Ezequiel Dias: Belo Horizonte, p.69-80, 1994.
- FOWLKES, J.L.; WINKLER, M. K. Exploring the interface between metallo-proteinase activity and growth factor and cytokines bioavailability. **Cytokine Growth Factor Reviews**, v. 13, p.277-287, 2002.
- FOX, J.W.; SERRANO, S.M.T. Insights into and speculations about snake venom metalloproteinase (SVMP) synthesis, folding and disulfide bond formation and their contribution to venom complexity. **FEBS Journal**, v.275, p. 3016–30, 2008.

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

FRANCO, L. F. Origem e diversidade das serpentes. In: CARDOSO, J.L.C. et al. (Orgs.) **Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes**. Sarvier: São Paulo, p.22-41, 2009.

FRY, B.G.; KIM ROELANTS, K.; CHAMPAGNE, D. E.; SCHEIB, H.; TYNDALL, J.D.A.; KING, G.F.; NEVALAINEN, T.J.; NORMAN, J.A.; LEWIS, R.J.; NORTON, R.S.; RENJIFO, C.; RODRÍGUEZ DE LA VEGA, R.C. The toxicogenomic multiverse: convergent recruitment of proteins into animal venoms. **Annual Review of Genomics and Human Genetics** v.10, p.483–511, 2009.

GIBBS H.L.; MACKCESSY, S.P. Functional basis of a molecular adaptation: Prey-specific toxic effects of venom from *Sistrurus rattlesnakes*. **Toxicon** v.53, p.672–679, 2009.

GIBBS, H.L.; SANZ, L.; CHIUCCHIA, J.E.; FARRELLC, T.M.; CALVETE, J.J. Proteomic analysis of ontogenetic and diet-related changes in venom composition of juvenile and adult Dusky Pigmy rattlesnakes (*Sistrurus miliarius barbouri*). **Journal of Proteomics** v.74, p.2169-2179, 2011.

GUÉRCIO, R.A.P.; SHEVCHENKO, A.; SHEVCHENKO, A.; LÓPEZ-LOZANO, J.L.; JAIME PABA, J.; SOUSA, V.S.; RICART, C.A.O. Ontogenetic variations in the venom proteome of the Amazonian snake *Bothrops atrox*. **Proteome Science** v.4, 2006.

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

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

HEGE, T.; BAUMANN, U. The Conserved Methionine Residue of the Metzincins: A Site-directed Mutagenesis Study. **Journal of Molecular Biology** v.314, p.181-186, 2001.

KOCHVA, E. The origin of snakes and evolution of the venom apparatus. **Toxicon** v.25, p.65-106, 1987.

LAING, G. D.; CLISSA, P. B.; THEAKSTON, R. D. MOURA-DA-SILVA, A. M.; TAYLOR, M. J. Inflammatory pathogenesis of snake venom metalloproteinase induced skin necrosis. **European Journal of Immunology** v.33, p.3458-3463, 2003.

LI, W. F.; CHEN, L.; LIU, J. A C-Type lectin protein from *Agkistrodon acutus* venom binds to both platelet glycoprotein Ib and coagulation factor IX/factor X. **Biochemical Biophysical Research Communications** v.332, p.904-912, 2005.

- LOCK, B. Venomous snake restraint and handling. **Journal of Exotic Pet Medicine** v.17, p.273-284, 2008.
- LOPEZ-LOZANO, J.L.; SOUSA, M.V.; RICART, C.A.O.; CHÁVEZ-OLORTEGUI, C.; SANCHEZ, E.F.; MUNIZ, E.G.; BUHRNHEIM, P.F.; MORHY, L. Ontogenetic variation of metalloproteinases and plasma coagulant activity in venoms of wild *Bothrops atrox* specimens from Amazonian rain forest. **Toxicon** v.40, p.997-1006, 2002.
- MALLOW, D.; LUDWIG, D.; NILSON, G. **True Vipers: Natural History and Toxinology of Old World Vipers**. Krieger Publishing Company. 359 pg., 2003.
- MARTINS, M., MARQUES, O. A. V.; SAZIMA, I. Ecological and phylogenetic correlates of feeding habits in Neotropical pitvipers of the genus *Bothrops*. In: SCHUETT, G.W et al. (Eds) **Biology of the Vipers**. Eagle Mountain Publishing: Eagle Mountain, Utah, p. 307-328, 2002.
- MARKLAND, F.S. Snake venoms and the hemostatic system. **Toxicon** v.36, p.1749–1800, 1998.
- MARKLAND, F.S.; SWENSON, S. Snake venom metalloproteinases. **Toxicon** xxx, p.1–16, 2012.
- MELGAREJO, A.R. Serpentes peçonhentas do Brasil. In: CARDOSO, J.L.C. et al. (Org.). **Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes**. Sarvier: São Paulo, p. 42-70, 2009.
- MENEZES, M.C.; FURTADO, M.F.; TRAVAGLIA-CARDOSO, S.R.; CAMARGO, A.C.M.; SERRANO, S.M.T. Sex-based individual variation of snake venom proteome among eighteen *Bothrops jararaca* siblings. **Toxicon** v.47, p.304–312, 2006.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2012. Disponível em: <http://dtr2004.saude.gov.br/sinanwebr>. Acessado em: 15/08/2012.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014. Disponível em: <http://dtr2004.saude.gov.br/sinanwebr>. Acessado em: 09/01/2014.
- MOURA-DA-SILVA, A.M.; BUTERA, D.; TANJONI, I. Importance of snake venom metalloproteinases in cell biology: effects on platelets, inflammatory and endothelial cells. **Current Pharmaceutical Design** v.13, p.2893–905, 2007.
- MOURA-DA-SILVA, A.M.; DAVID G. THEAKSTON, D. G.; CRAMPTON. J. M. Evolution of Disintegrin Cysteine-Rich and Mammalian Matrix-Degrading Metalloproteinases: Gene Duplication and Divergence of a Common Ancestor Rather Than Convergent Evolution. **Journal of Molecular Evolution** v.43, p.263-269, 1996.
- NEIVA, M.; ARRAES, F.B.M.; DE SOUZA, J.V.; RÁDIS-BAPTISTA, G.; DA SILVA, A.R.B.P.; WALTER M.E.M.T.; BRIGIDO, M.M.; YAMANE, T.; LOPEZ-LOZANO, J.L.;

ASTOLFI-FILHO, S. Transcriptome analysis of the Amazonian viper *Bothrops atrox* venom gland using expressed sequence tags (ESTs). **Toxicon** v.53, p.427–36, 2009.

NÚÑEZ, V.; CID, P.; SANZ, L.; DE LA TORRE, P.; ANGULO, Y.; LOMONTE, B.; GUTIÉRREZ, J.M.; CALVETE, J.J. Snake venomomics and antivenomics of *Bothrops atrox* venoms from Colômbia and the Amazon regions of Brazil, Perú and Ecuador suggest the occurrence of geographic variation of venom phenotype by a trend towards paedomorphism. **Journal of Proteomics** v.73, p.57–78, 2009.

OLIVEIRA, M.E.; MARTINS, M. When and where to find a pitviper: activity patterns and habitat use of the lancehead, *Bothrops atrox*, in central Amazonia, Brazil. **Herpetological Natural History** v.8, p.101-110, 2001.

PARKINSON, C. L. Molecular systematic and biogeographical history of pitvipers as determined by mitochondrial ribosomal DNA sequences. **Copeia**, v.3, p.576-586, 1999.

PATIÑO, A. C.; PEREAÑEZ, J. A.; NÚÑEZ, V.; BENJUMEA, D. M.; FERNANDEZ, M.; RUCAVADO, A.; SANZ, L.; CALVETE, J.J. Isolation and biological characterization of Batx-I, a weak hemorrhagic and fibrinolytic PI metalloproteinase from Colombian *Bothrops atrox* venom. **Toxicon** v.56, p.936–943, 2010.

PETRETSKI, J.H.; KANASHIRO, M.M.; RODRIGUES, F. R.; ALVES, E. W.; MACHADO, O.L.T.; KIPNIS, T. L. Edema induction by the disintegrin-like cysteine-rich domains from a *Bothrops atrox* hemorrhagin. **Biochemical and Biophysical Research Communications** v.276, p.29-34, 2000.

POUGH, F.H.; ANDREWS, R.M.; CADLE, J.E.; CRUMP, M.L.; SAVITZKY, A.H.; WELLS, K.D. **Herpetology**, 3<sup>a</sup> ed., Pearson Prentice Hall, Upper Saddle, New Jersey, 2004.

PYRON, R. A.; BURBRINK, F. T.; COLLI, G. R.; DE-OCA, A. N.; VITT, C. A.; KUCZYNSKI, C. A.; WIENS, J. J. The phylogeny of advanced snakes (Colubroidea), with discovery of a new subfamily and composition of support methods for likelihood trees. **Molecular Phylogenetics and Evolution** v. 58, p. 329-342, 2011.

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

RODRIGUES, R. S.; DA-SILVA, J. F.; BOLDRINI-FRANÇA, J.; FONSECA, F. P.; OVATIANO, A. R.; HENRIQUE-SILVA, F.; HAMAGUCHI, A.; MAGRO, A. J.; BRAZ, A. S.; DOS-SANTOS, I. J.; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I.; FONTES, M. R.; FULY, A. L.; SOARES, A. M.; RODRIGUES, V. M. Structural and functional properties of Bp-LAAO, a new L-amino acid oxidase isolated from *Bothrops pauloensis* snake venom. **Biochimie** v.91, n.4, p.490-501, 2009.

SALDARRIAGA, M.M.; OTERO, R.; NÚÑEZ, V.; TORO, M.F.; DÍAZ, A.; GUTIÉRREZ J.M. Ontogenetic variability of *Bothrops atrox* and *Bothrops asper* snake venoms from Colombia. **Toxicon** v. 42, p.405–411, 2003.

SALOMÃO, M. G.; WÜSTER, W.; THORPE, R. S. DNA evolution of South American pitvipers of the genus *Bothrops* (Reptilia: Serpente: Viperidae). In: THORPE, R. S.; WÜSTER, W.; MALHOTRA, A. (Eds). **Venomous snakes: ecology, evolution, and snakebite**. Zoological Society of London, Oxford: Claredon Press, p.89-98, 1997.

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

SUN, M. Z.; GUO, C.; CHEN, D.; GREENAWAY, F. T.; LIU, S. Biochemical, functional and structural characterization of Akbu-LAAO: a novel snake venom L-amino acid oxidase from *Agkistrodon blomhoffii ussurensis*. **Biochimie** v. 92, p.443-449, 2010.

SOUSA, L.F.; NICOLAU C.A.; PEIXOTO, P.S.; BERNADONI, J.L.; OLIVEIRA, S.S.; Portes-Junior, J.A.; MOURÃO, R.H.V.; LIMA-DOS-SANTOS, I.; SANO-MARTINS, I.S.; Chalkidis, H.M.; VELENTE, R.H.; MOURA-DA-SILVA, A.M. Comparison of Phylogeny, Venom Composition and Neutralization by Antivenom in Divers e Species of *Bothrops* Complex. **PLOS Neglected Tropical Diseases** v.7, 2013.

TAVARES, N.A.C.; CORREIA, J.M.; GUARNIERI, M.C.; LIMA-FILHO, J.L.; PRIETO-DA-SILVA, A .R.B.; RÁDIS-BAPTISTA, G. Expression of mRNAs coding for VAP1 /crotastatin -like metalloproteases in the venom glands of three South American pit vipers assessed by quantitative real-time PCR. **Toxicon** v.52, 897–907, 2008.

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

TURCI, L.C.B.; ALBUQUERQUE, S.; BERNARDE, P.S.; MIRANDA, D.B. Uso do hábitat, atividade e comportamento de *Bothriopsis bilineatus* e de *Bothrops atrox* (Serpentes: Viperidae) na floresta do Rio Moa, Acre. Brasil **Biota Neotropica** v.9, p.197–206, 2009.

WARRELL, D. A. Snakebites in Central and South America: epidemiology, clinical features, and clinical management. In: CAMPBELL, J.A.; LAMAR, W.W. (Eds). **The Venomous Reptiles of the Western Hemisphere**. Cornell University Press: Ithaca, New York, v. 2, p.709–761, 2004.

WERMAN, S. D. Phylogenetics relationships of Central and South American pitvipers of genus *Bothrops* (sensu lato): cladistic analysis of biochemicals and anatomical characters. In: CAMPBELL, J. A.; BRODIE, E. D. (Eds). **Biology of the pitvipers**. Tyler, TX: Selva, p.21-40, 1992.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. 2009. Neglected tropical diseases: snakebite. Disponível em: <[http://www.who.int/neglected\\_diseases/diseases/snakebites/en/](http://www.who.int/neglected_diseases/diseases/snakebites/en/)> Acessado: em 02/11/2011.

WUSTER, W.; SALOMÃO, M.G.; QUIJADA-MASCARENÃS, J.A.; THORPE, R.S; BBBSP. Origins and evolution of the South American pitvipers fauna: evidence from mitochondrial DNA sequence analysis. In: SCHUETT, G.W. et al. (Eds) **Biology of the Vipers**, Eagle Mountain Publishing: Eagle Mountain, Utah, p. 111– 129, 2002.

WUSTER, W.; PEPPIN, L.; POOK, C.E.; WALKER, D.E. A nesting of vipers: phylogeny and historical biogeography of the Viperidae (Squamata: Serpentes). **Molecular Phylogenetics and Evolution** v.49, p. 445–459, 2008.

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

## CAPÍTULO 1

### ISOLAMENTO E AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE UMA NOVA METALOPROTEINASE (SVMP) DE CLASSE PIII DA PEÇONHA DE *Bothrops atrox*\*

Luciana Aparecida Freitas de Sousa

Ana Maria Moura da Silva

Rosa Helena Veras Mourão

\*Capítulo escrito de acordo com as normas do periódico Toxicon (ISSN 0041-0101), após revisão o mesmo será traduzido para língua inglesa e submetido ao periódico.

## Isolamento e avaliação das atividades biológicas de metaloproteínas (SVMPs) de classe PIII da peçonha de *Bothrops atrox*

Luciana Aparecida Freitas de Sousa<sup>1\*</sup>; Ana Maria Moura da Silva<sup>2</sup>, Rosa Helena Veras Mourão<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Programa de Pós-Graduação em Recursos Naturais - Universidade Federal do Oeste do Pará/UFOPA, Rua Vera Paz, s/n Santarém 68135-110 - Santarém, Pará, Brasil

<sup>2</sup> Instituto Butantan, Av. Vital Brasil 1500, São Paulo 05503-900, São Paulo, Brasil

### RESUMO

A serpente *Bothrops atrox* é a principal causadora de acidentes ofídicos na Amazônia brasileira. A composição da peçonha dessa espécie sofre variações em função do crescimento e localização geográfica, sendo que as metaloproteínas de peçonha de serpentes (SVMPs) são os componentes mais abundantes dessa peçonha. As SVMPs são responsáveis pela hemorragia, o sintoma mais característico do envenenamento botrópico. Nesse estudo, foram avaliados dois *pools* de peçonha total de *B. atrox*, provenientes de ambiente natural (Floresta Nacional do Tapajós- PA, Brasil) e de cativeiro (serpentário do Instituto Butantan-SP, Brasil). As diferenças na composição dos dois *pools* de peçonha foram avaliadas por cromatografia de fase reversa. Além disso, foram isoladas duas isoformas de SVMPs de classe PIII por cromatografia de interação hidrofóbica e troca aniônica dos *pools* avaliados. Os *pools* de peçonhas exibiram perfis cromatográficos similares, porém com diferenças quantitativas na expressão de fosfolipases A<sub>2</sub>, SVMPs classe P-I e serinoproteínas, que predominaram na peçonha da área de floresta. Em ambos os casos, as SVMPs foram as toxinas majoritárias nas peçonhas de serpentes dos dois ambientes. As SVMPs-PIII isoladas exibiram atividade hemorrágica elevada e capacidade de degradar a fibrina de maneira dose dependente. No entanto, apenas a isoforma presente na peçonha oriunda de espécimes de cativeiro exibiu atividade pró-coagulante em presença de cálcio. Após o isolamento das SVMPs de classe P-III e sequenciamento com mais de 50% de cobertura, não foi possível detectar diferenças estruturais entre elas ou com a jararagina (SVMPs-PIII de *Bothrops jararaca*). Quando comparadas as SVMPs de *B. atrox* e *B. jararaca*, apenas a jararagina foi capaz de inibir a agregação plaquetária induzida por colágeno, o que sugere a presença de diferenças entre as moléculas, seja nas regiões que não foram sequenciadas ou glicosilação. Assim foi isolada uma nova SVMP de classe PIII da peçonha de *B. atrox* muito similar em estrutura com a jararagina, porém sem atividade de inibição agregação plaquetária.

Palavras-chave: *Bothrops atrox*; SVMPs-PIII; hemorragia; cativeiro; floresta.

### 1. Introdução

O gênero *Bothrops* (Familia Viperidae, Subfamilia Crotalinae) compreende 42 espécies de serpentes (Carrasco et al., 2012), distribuídas pela América Latina, desde o nordeste do México a Argentina, e partes do sul das ilhas do Caribe (Campbell e Lamar, 2004). No Brasil,

\*Correspondência para: Luciana Aparecida Freitas de Sousa

Tel.: + 55 (93) 21014943; fax: + 55 (93) 30649052

Rua Vera Paz, s/n – Universidade Federal do Oeste do Pará, Campus Tapajós - Bairro Salé - CEP: 68135110 - Santarém, Pará, Brasil

Email: lucianabio\_07@yahoo.com.br

segundo dados do Ministério da Saúde no ano de 2012 o gênero *Bothrops* foi responsável por 75% dos acidentes ofídicos, e a Região Norte do país apresentou cerca de 34% de todos os acidentes botrópicos notificados (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014 <<http://dtr2004.saude.gov.br/sinanwebr>>). *Bothrops atrox* é o viperídeo mais frequente na região amazônica, e certamente é considerada a principal causadora de acidentes ofídicos na Região Norte do Brasil (Melgarejo, 2009).

Acidentes ocasionados por espécies do gênero *Bothrops* são caracterizados por efeitos patológicos locais que se desenvolvem rapidamente após a picada, e dependendo da severidade do caso podem resultar em dano tecidual e algumas sequelas (Rucavado et al., 2008). Os efeitos locais frequentemente incluem dor, hemorragia, edema, mionecrose e inflamação no local da picada (Warrell, 2004). A hemorragia um dos principais sintomas é ocasionada pela ação de metaloproteinasas presentes nas peçonhas de serpentes, que atuam degradando componentes da membrana basal dos capilares (Gutierrez et al., 2005; Moura-da-Silva et al., 2007).

As metaloproteinasas de peçonha de serpentes (SVMPs- *Snake Venom Metalloproteinases*) são enzimas zinco-dependentes, e juntamente com as ADAMs (A Disintegrin And Metalloproteinase) formam a família adamalinas/reprolisinas (M12b), pertencente ao clã das Metzincinas (Balaban et al., 2012). As metzincinas são caracterizadas pela presença de um resíduo conservado de metionina, localizado na porção C-terminal do sítio de ligação com o zinco (Hege e Baumann, 2001). O sítio ligante de zinco do clã metzincina tem uma sequência de aminoácidos comum em todas as famílias (HEBXHXBGBXHZ) (Markland, 1998). De acordo com a organização de seus domínios e a presença ou ausência dos domínios não-protease, as SVMPs são distribuídas em três classes: PI, PII e PIII (Fox e Serrano, 2008). A classe PI tem apenas um domínio metaloprotease, a PII apresenta o domínio metaloprotease e um domínio disintegrina, a classe PIII possui um domínio rico em cisteína, em adição aos domínios metaloprotease e tipo disintegrina (Fox e Serrano, 2008).

A capacidade de produzir hemorragia, uma característica das SVMPs de classe PIII, é considerada a assinatura das peçonhas de viperídeos (Fox e Serrano, 2005). A peçonha de *Bothrops atrox* mantém essa predominância, porém algumas variações ontogenéticas e geográficas na sua composição foram descritas para a espécie (Lopez-Lozano et al., 2002;

Saldarriaga et al., 2003; Salazar et al., 2007; Alape-Girón et al., 2008, Neiva et al., 2009; Calvete et al., 2011). O tipo de alimentação das serpentes também pode ser uma fator que influencia na abundância relativa de classes distintas de toxinas (Gibbs et al., 2011). Neste trabalho, avaliou-se a composição da peçonha de *B. atrox* de dois ambientes diferentes, natural (Floresta Nacional do Tapajós- PA, Brasil) e de cativeiro (serpentário do Instituto Butantan-SP, Brasil). Além disso, foi realizado o isolamento e a caracterização das atividades biológicas de metaloproteinases hemorrágicas da peçonha de *B. atrox*.

## 1. Material e Métodos

### 2.1 Peçonha

Neste trabalho foi utilizado um *pool* de peçonhas da serpente *B. atrox* proveniente da Floresta Nacional do Tapajós (FLONA), Pará, Brasil, (Licença SISBio 32098) coletada pelo grupo de pesquisa do Laboratório de Pesquisas Zoológicas- LPZ das Faculdades Integradas do Tapajós-FIT, o qual é coordenado pelo prof. Hipócrates Chalkidis. Um segundo *pool* peçonha proveniente do biotério do Laboratório de Herpetologia do Instituto Butantan (IB), São Paulo, Brasil foi utilizado. Neste ultimo, as serpentes utilizadas na coleta da peçonha nasceram em cativeiro e os espécimes que originaram a colônia foram trazidos de São Bento, Maranhão, Brasil.

### 2.2 Fracionamento cromatográfico da peçonha de *B. atrox*

#### 2.2.1 Fracionamento em coluna de fase reversa

As peçonhas de *B. atrox* foram fracionadas em coluna de fase reversa semipreparativa (Coluna C-18, Vydac, 10 µm, 4,6 mm i.d. x 250 mm), em sistema de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência-CLAE (Shimadzu, Japão). Amostras de 5 mg da peçonha dos espécimes tanto da FLONA quanto do IB foram dissolvidas em 500 µL de 0,1% de ácido trifluoroacético (TFA) em água. Em seguida, a mistura foi centrifugada a 18.400 g por 10 minutos e o sobrenadante foi aplicado na coluna previamente equilibrada com a mesma solução. Os parâmetros para eluição foram fluxo de 2 mL/min, detecção UV<sub>214nm</sub>, e sistema gradiente com a concentração de 0 a 100% da solução B (acetonitrila), durante 100 minutos. O gradiente foi segmentado em 6 etapas:

- 1- 0 a 5 min: 5% de B
- 2- 5 a 15 min: 5% a 15% de B
- 3- 15 a 75 min: 15% a 45 % de B

- 4- 75 a 85 min: 45 % a 70 % de B
- 5- 85 a 90 min: 70 % a 100 % de B
- 6- 90 a 100 min: 100 % de B

As frações foram coletadas manualmente e submetidas ao um *speed vac* (evaporador centrífugo a vácuo) por 30 min para evaporação da acetonitrila, e analisadas pela massa molecular relativa por eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) em presença de dodecil sulfato de sódio (SDS) em condições não redutoras.

## 2.2.2 Isolamento das metaloproteinases (SVMPs)

O isolamento das toxinas de interesse foi realizado em cromatógrafo líquido (GE, modelo AKTAexplorer 10S) equipado com detector UV-VIS. Foram utilizadas as técnicas de separação cromatográfica por interação hidrofóbica e por troca iônica, em diferentes sistemas de tampão e gradientes de eluição, sob monitoramento da absorbância a UV<sub>280nm</sub>. Os métodos utilizados para isolamento de SVMPs da peçonha de *B. atrox* foram realizados conforme metodologia descrita por Paine e colaboradores (1992) e Moura-da-Silva e colaboradores (2003) e são descritos abaixo.

### 2.2.2.1 Primeira etapa de purificação

Cerca de 86 mg da peçonha de *B. atrox* do IB e FLONA foram dissolvidas em 1,075 mL de água milli-Q e o material centrifugado a 13.780 g por 10 min. Após a centrifugação, ao sobrenadante foi adicionado 1,075 mL do tampão de diluição em pH 7,4 (20 mM de Tris-HCl + 2 M de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> + 1 mM de CaCl<sub>2</sub>), no qual ficou em uma concentração de 1 M de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. A amostra foi injetada manualmente no cromatógrafo (loop de 2 mL). Para esta etapa foi utilizada a coluna Hitrap Phenyl FF low sub (5 mL 1,6 x 2,5 cm, GE Healthcare) como fase estacionária, e como fase móvel o tampão A (20 mM Tris-HCl + 1,2 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> + 1 mM CaCl<sub>2</sub> pH 7,4) e o tampão de eluição B (20 mM Tris-HCl + 1 mM CaCl<sub>2</sub> pH 7,4). Os parâmetros para eluição foram fluxo de 1 mL/min, detecção UV<sub>280nm</sub>, e sistema de eluição com gradiente de 0 a 100% do tampão B, durante 80 minutos. Durante todo o processo de purificação as amostras de peçonha e frações isoladas foram mantidas em gelo.

As frações resultantes da eluição cromatográfica foram avaliadas quanto à presença ou ausência da atividade hemorrágica como descrito no item **2.7.2**, e analisadas pela massa molecular relativa por SDS-PAGE, em condições não redutoras.

### 2.2.2.2. Segunda etapa de purificação

As frações eluídas na primeira etapa de purificação que apresentaram atividade hemorrágica foram dialisadas contra tampão de diálise (20 mM Tris-HCl + 1 mM CaCl<sub>2</sub> pH 6,8). Após a diálise as amostras foram injetadas manualmente (*loop* 2mL) no cromatógrafo, acoplado a coluna de troca aniônica Mono Q<sup>TM</sup> 5/50 GL (1 mL 5x50 mm, GE Healthcare) e como fase móvel foram utilizados o tampão A (20 mM Tris-HCl + 1 mM CaCl<sub>2</sub>) e o tampão de eluição B (20 mM Tris-HCl + 1M NaCl + 1 mM CaCl<sub>2</sub>) ambos no mesmo pH do tampão de diálise. Os parâmetros para eluição foram fluxo de 1 mL/min, detecção UV<sub>280nm</sub>, e sistema de eluição com gradiente de 0 a 100% do tampão B, durante 61 minutos. O gradiente foi segmentado em 4 etapas:

- 7- 0 a 11 min: 0% de B
- 8- 11 a 51 min: 0% a 25% de B
- 9- 51 a 56 min: 25% a 100 % de B
- 10- 56 a 61 min: 100 % de B

As frações resultantes da eluição cromatográfica foram analisadas pela massa molecular por SDS-PAGE, e avaliadas a presença ou ausência da atividade hemorrágica como descrito no item 2.7.2.

### 1.3 Determinação quantitativa de proteínas

A concentração de proteínas presente na peçonha e nas frações isoladas foi determinada pelo método de Bradford (1976), e a albumina sérica bovina (BSA) como padrão para quantificação.

### 1.4 Eletroforese em gel de poli(acrilamida) em presença de SDS (SDS-PAGE)

A determinação da massa molecular das proteínas de interesse foi realizada por meio de SDS-PAGE, conforme metodologia descrita por Laemmli (1970). As amostras de peçonha e SVMPs isoladas foram diluídas em tampão de amostra (Fosfato de Na 1M; 10% de SDS; 50% de glicerol; 0,1% de azul de bromofenol) na presença ou ausência de agente redutor (ditiotreitól-DTT), fervidas em banho-maria durante 5 minutos e aplicadas em um gel de poli(acrilamida) (4% para o gel de empilhamento e 12,5% para o gel de resolução). A seguir, as mesmas foram submetidas à eletroforese com amperagem constante de 35 mA e voltagem de 180 V. O gel resultante foi corado com azul de Comassie (0,1% de brilhant blue R-250; 25% de metanol; 5% de ácido acético) e descorado com solução descorante (metanol 37% + ácido acético 10%). O padrão de massa molecular (GE Healthcare) utilizado para comparação

apresentava as seguintes proteínas: fosforilase B (97 kDa), albumina sérica bovina (66 kDa), ovoalbumina (45 kDa), anidrase carbônica (30 kDa), inibidor de tripsina (20,1 kDa) e  $\alpha$ -lactalbumina (14,4 kDa).

### 1.5 Autólise das SVMs isoladas

A avaliação da autólise das SVMs isoladas foi baseada na metodologia descrita por Moura-da-Silva e colaboradores (2003). As amostras foram incubadas a 37 °C na concentração de 0,5 mg/mL em tampão pH 6,8 (20mM Tris/HCl + 150 mM de NaCl + 1 mM CaCl<sub>2</sub>), por 72 h. Alíquotas das amostras foram retiradas em diferentes intervalos de tempo e a reação interrompida com a adição do tampão de amostra com ou sem DTT, e em seguida foram fervidas em banho-maria por 5 min. Para avaliar os produtos de autólise as alíquotas foram submetidas à SDS-PAGE (12,5%) realizada como descrito no item 2.4.

### 2.6 Análise por espectrometria de massas

As SVMs isoladas foram submetidas à SDS-PAGE. Após os processos de coloração e descoloração do gel, as bandas proteicas foram recortadas e transferidas para um tubo, onde foram cortadas em fragmentos menores. Os fragmentos foram digeridos *in gel* com tripsina conforme o procedimento proposto por Hanna e colaboradores (2000) com algumas modificações. Todos os reagentes utilizados foram preparados no momento do uso. As amostras foram ressuspendidas em 15  $\mu$ L de ácido fórmico (0,1%) e analisadas em um espectrômetro de massas sequencial (MS/MS) Linear Trap Quadrupole (LTQ) VELOS ORBITRAP (Thermo Scientific) acoplado a um sistema de cromatografia líquida EASY-nLC II (Proxeon Biosystems). A separação cromatográfica em fase reversa foi realizada em coluna C18 (75  $\mu$ m x 100  $\mu$ m x 1,7  $\mu$ m) com uma pré-coluna C18 (75  $\mu$ m x 5 mm x 10  $\mu$ m). Para as corridas foi utilizado um gradiente de 5-40% de acetonitrila em 0,1% de ácido fórmico em 45 minutos sob um fluxo de 300 nL/min.

A aquisição dos dados foi realizada no modo positivo, e os espectros de MS e MS/MS foram adquiridos na faixa de massa de 200-2000 Da, com fragmentação por CID (dissociação induzida por colisão do inglês *collision-induced dissociation*) dos 10 íons mais intensos por scan, com exclusão dinâmica dos íons mais intensos por scan com duração de 15 segundos com repetições a cada 30 segundos. A busca no banco de dados e identificação de peptídeos/proteínas foi realizada por meio do programa Mascot (Matrix Science) acessado por meio de um servidor instalado no CAT-Cepid (Mascot Server versão 2.2). Essas análises

foram realizadas no Centro de Toxinologia Aplicada do Instituto Butantan, em colaboração com a Dr<sup>a</sup> Solange Serrano.

## 2.7 Atividades Biológicas

### 2.7.1 Modelos animais utilizados

Para este projeto foram utilizados camundongos da linhagem Swiss (*Mus musculus*), de ambos os sexos, com idade aproximada de dois meses e peso entre 34 e 41g, e ratos da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus*), machos, com idade aproximada de três meses e peso entre 250 e 350 g. Os animais foram mantidos sob condições padrão de biotério ( $21^{\circ}\text{C} \pm 2$ , foto período artificial de 12/12 horas) com livre acesso à água e ao alimento. A utilização dos animais foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Oeste do Pará (Protocolo nº 09.002/12).

### 2.7.2 Atividade hemorrágica

A determinação da atividade hemorrágica das frações resultantes de cada eluição cromatográfica foi baseada no método descrito por Kondo e colaboradores (1960), modificado por Gutiérrez e colaboradores (1985). A triagem das SVMPs foi realizada com a injeção de 10  $\mu\text{g}$  das frações cromatográficas sob a pele da região dorso-central dos camundongos por via intradérmica (i.d), em um volume final de 50  $\mu\text{L}$ , sendo que para a triagem de cada fração foram utilizados  $n=3$ . Após três horas, os animais foram eutanasiados por inalação de  $\text{CO}_2$ , a pele do dorso retirada e escaneada para a avaliação da área hemorrágica por meio de ferramentas de morfologia matemática (Dougherty, 2002). Após o isolamento das SVMPs foram testadas as doses de 2, 5, 7,5, 10, 12 e 15  $\mu\text{g}$  para a determinação da dose mínima hemorrágica (DMH), definida como a menor quantidade de peçonha capaz de induzir um halo hemorrágico de 10 mm de diâmetro (Kondo et al., 1960). Foram utilizados grupos de três animais para a determinação da DMH dos componentes purificados. A atividade hemorrágica foi expressa pela média e desvio padrão dos diâmetros da área hemorrágica ( $\text{mm}^2$ ).

#### 2.7.2.1 Determinação do diâmetro médio da lesão hemorrágica

A medida do halo hemorrágico foi realizada por meio de ferramentas de morfologia matemática de acordo com Dougherty (2002). A imagem foi digitalizada e salva no formato RGB, com a sua resolução e as dimensões do pixel conhecidas. Um Script Matlab (Gonzalez

et al., 2009) foi utilizado de forma a ler a imagem e separar as componentes RGB. Cada componente sofreu ajuste de contrastes e filtragens, de forma a destacar o objeto alvo (halo hemorrágico) em relação ao fundo (tecido e lâmina). A componente que melhor destaca o objeto em relação ao fundo foi escolhida para ser processada. A seguir um operador de Limiarização (Guerra et al., 2011) foi aplicado sobre a componente escolhida de forma a localizar e isolar os pixels que caracterizam o halo hemorrágico, e o resultado obtido foi uma imagem binária com o objeto isolado. Para eliminar pequenas partículas dispersas e corrigir a forma do objeto destacado, um operador de abertura foi aplicado sobre a imagem binária. Finalmente, o operador de gradiente morfológico é aplicado à imagem binária tratada, de forma a destacar o contorno do objeto. O contorno é colocado sobre a imagem original (formato RGB) de forma a destacar o halo. Já a área e o diâmetro maior são obtidos do objeto, na imagem binária, pela contagem de pixels e do cálculo de distâncias (Dougherty e Lotufo, 2003), e a área do halo hemorrágico é expressa em mm<sup>2</sup>.

### 2.7.3 Atividade fibrinolítica

A atividade fibrinolítica das proteínas isoladas foi avaliada em placas de fibrina-agarose de acordo com Jespersen e Astrup (1983) com algumas modificações. Aproximadamente 30 mg de fibrinogênio humano (SIGMA-ALDRICH) foram diluídos em 10 mL de tampão Tris-HCl 0,05 M, pH 7,3 com 0,2 M de NaCl e 0,05 M de CaCl<sub>2</sub>. A esta solução foi adicionada trombina bovina (SIGMA-ALDRICH) na concentração final de 2000 U/mL e 10 mL de uma solução de 2% de agarose diluída no mesmo tampão. A mistura foi depositada rapidamente em placas plásticas (100 x 20 mm), mantida em temperatura ambiente sobre uma superfície previamente nivelada até a polimerização da agarose e a formação da rede de fibrina. Em seguida, doses de 2, 5, 7,5, 10, 12 e 15 µg das proteínas isoladas foram aplicadas em orifícios previamente feitos nas placas de fibrina polimerizada. Após a incubação por 18 horas a 37°C, os diâmetros perpendiculares das áreas de lise foram mensurados, e a área dos halos determinada. A atividade fibrinolítica das proteínas foi considerada como a área de lise subtraída da área do círculo correspondente ao orifício de aplicação da amostra. Os resultados foram expressos pela média e o desvio padrão dos diâmetros da atividade fibrinolítica (mm<sup>2</sup>) de três experimentos independentes.

### 2.7.4 Atividade Coagulante

A atividade coagulante das frações isoladas foi analisada por tromboelastometria por meio do ROTEM<sup>®</sup> com quatro canais (Pentapharm GmbH). A coagulação foi mensurada por

meio da representação gráfica da formação e subsequente lise do coágulo. O sangue foi coletado pela artéria carótida de ratos machos sedados com uretana (SIGMA-ALDRICH) por via intraperitoneal, com seringas com citrato de sódio 3,8% na razão de 1/10 (v/v). No teste de coagulação, alíquotas de 300  $\mu$ L do sangue citratado foram incubadas com 10  $\mu$ g da peçonha ou frações, na presença ou ausência de 20  $\mu$ L de  $\text{CaCl}_2$  (200 mM), sendo o PBS (tampão fosfato-salino) empregado como controle negativo para ambas as condições. Cada ensaio foi realizado durante 30 min e foram medidos os seguintes parâmetros:

- **CT** (s): tempo de coagulação, é o tempo desde o início do ensaio até a formação de um coágulo com uma amplitude de 2 mm;
- **CFT** (s): tempo de formação do coágulo, é o tempo contado a partir do final do CT até o coágulo atingir uma amplitude de 20 mm;
- **$\alpha$**  ( $^\circ$ ): ângulo alfa é o ângulo da tangente quando a amplitude é de 2 mm;
- **MCF** (mm): firmeza máxima do coágulo, resultante da interação de fibrina, plaquetas ativadas e fator XIII;
- **ML** (%): lise máxima é a redução máxima da firmeza do coágulo observada após estabilização da MCF (dada como uma porcentagem do valor de MCF).

Os dados mostrados são representativos de três experimentos independentes. Esses experimentos foram realizados no Laboratório de Farmacologia do Instituto Butantan, em colaboração com o Dr. Benedito Carlos Prezoto.

#### 2.7.5 Teste de Inibição da agregação plaquetária

A capacidade de inibição da agregação plaquetária induzida por colágeno pelas frações foi avaliada com plaquetas lavadas (PL) de doadores humanos saudáveis. Aproximadamente 60 mL de sangue foram colhidos com 3,8% de citrato de sódio (1/10 v/v) e centrifugados a 130 g por 20 minutos a 24  $^\circ\text{C}$ , para a obtenção do plasma. Para obtenção das plaquetas lavadas, o plasma rico em plaquetas (PRP) foi centrifugado por 15 min a 325 g, e após a centrifugação o sobrenadante foi descartado. Ao pellet foi adicionado 10 mL de tampão de lavagem pH 6,8 (140 mM de  $\text{NaCl}$  + 10 mM de  $\text{NaHCO}_3$  + 1 mM de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  + 2,5 mM de  $\text{KCl}$  + 2 mM de  $\text{MgCl}_2$  + 25 mM de  $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$  + 0,5 mM de  $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$  + 1,75 g de BSA) e centrifugado por 15 min a 325 g, o sobrenadante foi descartado e o processo foi repetido mais uma vez. A seguir, foi adicionado ao pellet 10 mL do tampão Tyrode (10 mM de  $\text{C}_8\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_4\text{S}$  + 134 mM de  $\text{NaCl}$  + 12 mM de  $\text{NaHCO}_3$  + 0,75 mM de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  + 3 mM de  $\text{KCl}$  + 2 mM de  $\text{MgCl}_2$  + 1 mM de  $\text{CaCl}_2$  + 55 mM de  $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ ). Para os ensaios, 400  $\mu$ L das PL foram incubadas com 90  $\mu$ L frações isoladas durante 3 minutos a 37  $^\circ\text{C}$  sob agitação, após a

incubação foi adicionado 2  $\mu$ L de colágeno em uma concentração final de 2 $\mu$ g/mL. A transmissão de luz foi monitorada em agregômetro (CHRONO-LOG Corporation/ 490 2D), calibrado para 100% da transmitância com a solução Tyrode e para 0% de transmitância com as plaquetas lavadas. O percentual de agregação plaquetária mensurado após incubação das PL apenas com PBS foi considerado como 100% de agregação, enquanto que a inibição foi estimada pela diminuição da porcentagem de transmissão de luz.

## 2.8 Análise estatística

Os resultados das atividades biológicas foram apresentados graficamente por meio do programa GraphPad Prism 6.03. Os valores foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão. Para comparação das médias foi utilizado Análise de Variância (ANOVA) One-Way ou Two-Way conforme o caso, seguido do pós-teste de Tukey (para múltiplas comparações). O nível de significância adotado foi de  $p < 0,05$ .

## 3. Resultados

Os pools de peçonhas de *B. atrox* foram inicialmente fracionados em coluna de fase reversa para a comparação dos perfis cromatográficos dos seus constituintes. Para o isolamento das SVMPs de classe PIII, os pools foram fracionados em coluna de interação hidrofóbica e de troca aniônica. As sequências das proteínas resultantes foram determinadas por espectrometria de massas e suas atividades biológicas determinadas.

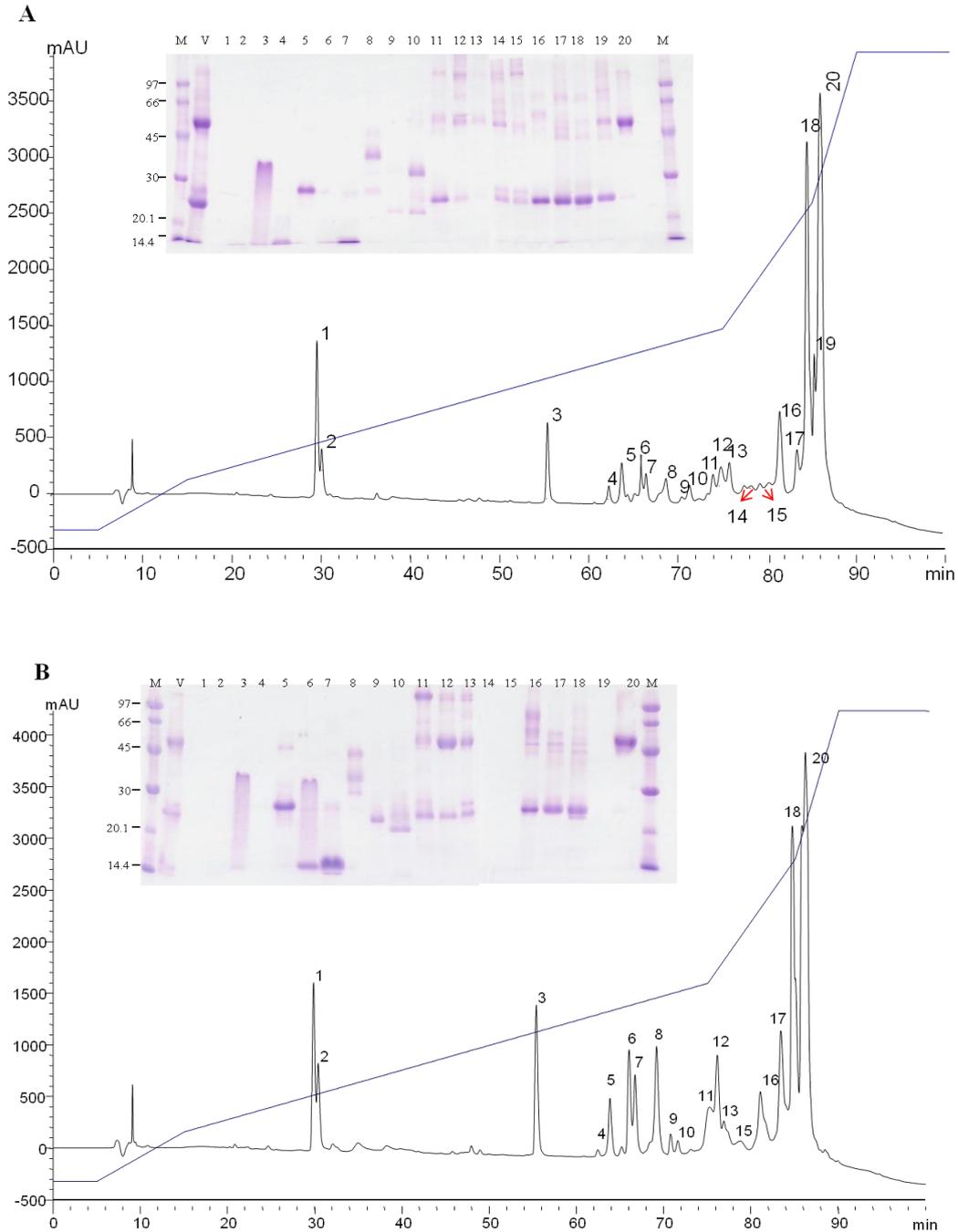
### 3.1 Comparação dos perfis cromatográficos dos *pools* de peçonha

A comparação entre os *pools* de peçonhas de *B. atrox* proveniente da Floresta Nacional do Tapajós (FLONA) e do serpentário do Instituto Butantan (IB) foi realizada por meio de cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa e por SDS-PAGE e está demonstrada na figura 1. Os perfis cromatográficos dos *pools* de peçonha analisados foram similares entre si e também com os perfis descritos na literatura para *B. atrox* (Calvete et al., 2011; Sousa et al., 2013). Entretanto, houve uma diferença marcante entre os cromatogramas na área dos picos e sua distribuição, principalmente entre os tempos de eluição de 50 a 85 min. A concentração de peçonha utilizada foi a mesma para os dois pools avaliados, no entanto, algumas frações do cromatograma do pool FLONA apresentaram uma área de absorção maior e, por conseguinte, estão em maiores concentrações na peçonha da FLONA. O perfil eletroforético das frações analisadas também foi similar entre os dois pools utilizados. A massa molecular relativa dos componentes proteicos presente nas frações variou

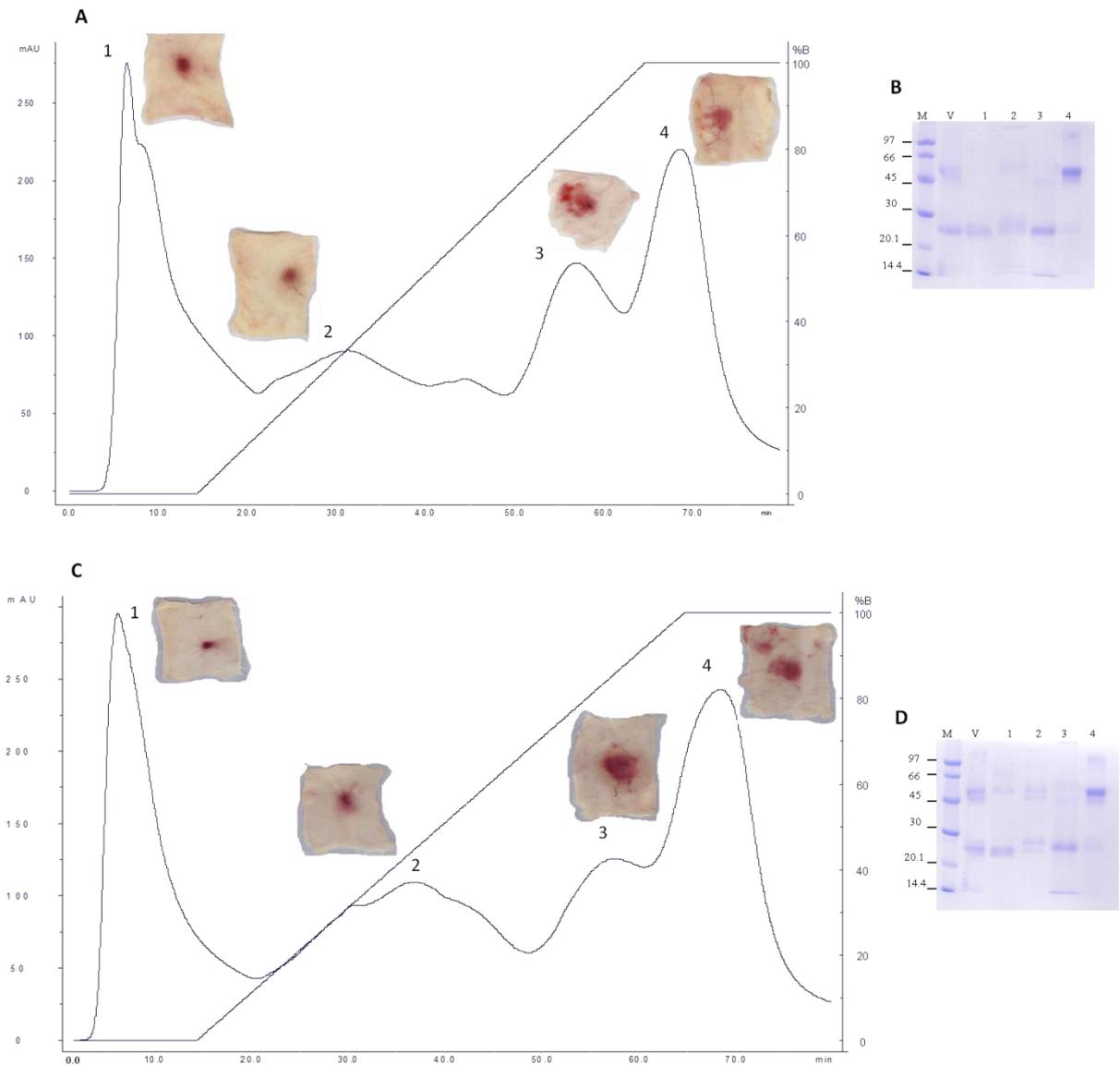
de aproximadamente 97 kDa a 14 kDa, com um predomínio de bandas na região entre 66 a 20 kDa, e bandas minoritárias em torno de 14 kDa e 97 kDa. As frações 1 e 2 dos dois *pools* não foram visualizadas no gel de poliacrilamida (Fig. 1A e 1B, já as frações 4 e 15 do pool da FLONA não foram coletadas durante a eluição cromatográfica e assim estão ausentes no perfil eletroforético apresentado (Fig. 1B). O componente majoritário (fração 20) da peçonha de *B. atrox* foi eluído em torno de 70% da concentração de acetronitrila (solução B) e pela massa molecular relativa provavelmente trata-se de uma SVMP de classe PIII.

### 3.2 Isolamento das SVMPs classe PIII

A primeira etapa de purificação das SVMPs dos *pools* de peçonhas da FLONA e do IB foi realizada em uma coluna de interação hidrofóbica e está apresentada nas figuras 2A e 2C. O perfil de eluição cromatográfica das peçonhas analisadas foi muito semelhante, e apresentaram um total de quatro frações (1-4), na qual as frações (2mL) localizadas na região central de cada pico foram reunidas para formar as 4 frações principais. As frações isoladas exibiram o mesmo padrão de massa molecular relativa. A fração 1 apresentou duas bandas em torno de 25 kDa e 50 kDa, a fração 2 exibiu bandas de aproximadamente 25 kDa, 30kDa, 45 kDa e 50 kDa, a fração 3 além da banda de 25 kDa apresentou bandas com cerca de 14kDa e 45 kDa, e a fração 4 uma banda de cerca 25 kDa, uma de 50 kDa e uma acima de 97 kDa (Fig. 2B e 2D). A hemorragia induzida por SVMPs de classe PIII é considerada a principal atividade da classe, dessa forma as frações foram monitoradas quanto à presença de atividade hemorrágica quando injetadas na região dorsal de camundongos. As frações 3 e 4 apresentaram atividade hemorrágica expressiva na dose de 10 µg em comparação com as frações 1 e 2 de ambas as peçonhas. Ao analisarmos a massa molecular relativa e a presença de atividade hemorrágica, selecionamos a fração 4 para dar prosseguimento com o processo de purificação.



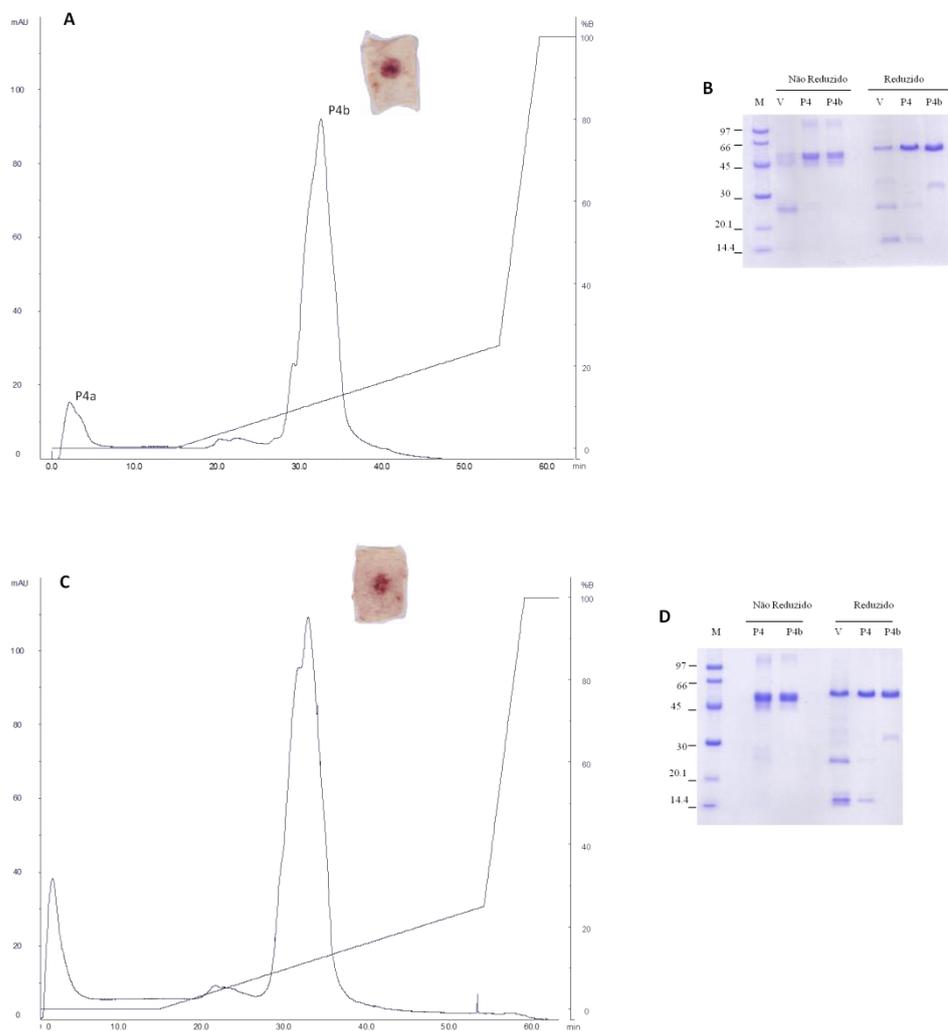
**Figura 1:** Perfil cromatográfico e eletroforético da peçonha de *Bothrops atrox* de espécimes do serpenteiro do Instituto Butantan (A) e coletados na Floresta Nacional do Tapajós (FLONA) (B), localizada na região Oeste do Pará-Brasil. Amostras de peçonha foram aplicadas em uma coluna Coluna C-18 (Vydac, 10  $\mu$ m, 4,6 mm x 250 mm), acoplada em um sistema de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência-CLAE (Shimadzu). Os parâmetros para eluição foram fluxo de 2 mL/min, detecção UV<sub>214nm</sub>, e sistema gradiente em passos de 0 a 100% da solução B (acetonitrila) e a solução A 0,1% de ácido trifluoroacético, durante 100 minutos. As frações coletadas foram analisadas por SDS-PAGE (12,5%) em condições não redutoras, M (padrões de massa molecular), V (peçonha total), os números de 1 a 20 representam 10  $\mu$ g de cada fração coletada.



**Figura 2:** Perfil cromatográfico em coluna de interação hidrofóbica (A e C) e eletroforético (B e D) da peçonha de *Bothrops atrox* proveniente do serpenteiro do Instituto Butantan (A) e da Floresta Nacional do Tapajós (FLONA) (C) localizada na região Oeste do Pará-Brasil. Foram injetados cerca de 86 mg de peçonha em coluna Hitrap Phenyl FF low sub (5 mL 1,6 x 2,5 cm), acoplada a um sistema de cromatografia líquida. Os parâmetros para eluição foram fluxo de 1 mL/min, detecção UV<sub>280nm</sub>, e sistema de eluição gradiente de 0 a 100% da solução B (20mM Tris-HCl + 1 mM CaCl<sub>2</sub> pH 7,4), durante 80 minutos. As frações foram monitoradas quanto à presença de atividade hemorrágica, por meio da injeção de 10 µg no dorso de camundongos, e analisadas por SDS-PAGE (12,5%) em condições não redutoras, M (padrões de massa molecular (kDa)), V (peçonha total (10 µg)), e os números de 1 a 4 representam as frações coletadas (10 µg).

As frações 4 do cativoiro (IB) e do ambiente natural (FLONA) foram submetidas inicialmente ao processo de diálise, para posteriormente serem aplicadas em coluna de troca aniônica. A segunda etapa de purificação está demonstrada na figura 3. A eluição cromatográfica resultou em dois picos para ambas as frações 4, um com o material da amostra

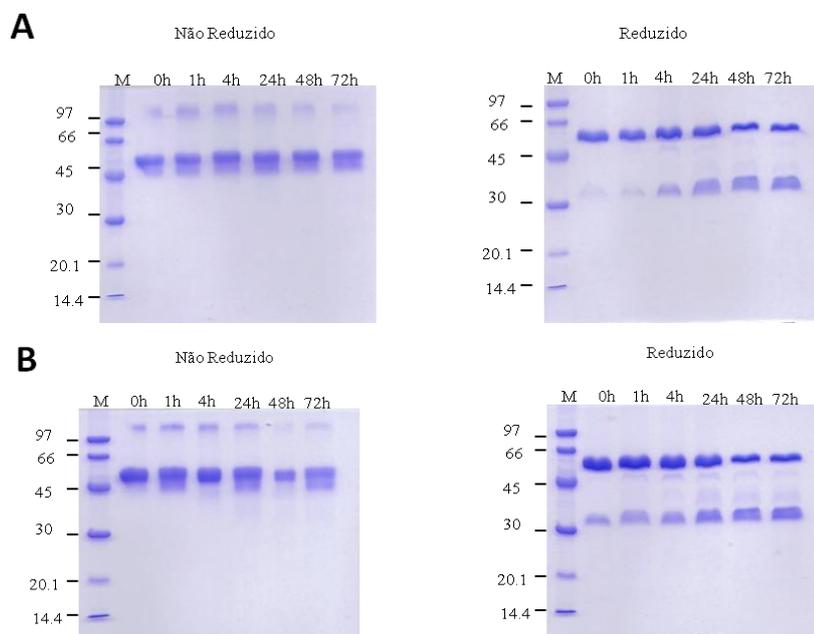
que não teve interação com a fase estacionária denominado P4a, e outro eluído com aproximadamente 150 mM de NaCl (solução B) denominado de P4b que conservou a atividade hemorrágica. O perfil eletroforético das frações P4b (Fig 3B e 3D) apresentou uma banda com massa molecular relativa de 50 kDa em condições não redutoras. Após redução, uma banda em torno de 30 kDa foi acrescentada ao perfil. O rendimento obtido com o processo de purificação das SVMPs a partir do pool do IB foi de 11,62% em relação à concentração proteica da peçonha total, e a partir do pool da FLONA obteve-se um rendimento de 16,31%.



**Figura 3:** Perfil cromatográfico em coluna de troca aniônica (A e C) e eletroforético (B e D) da fração 4 da peçonha de *Bothrops atrox* proveniente do serpentário do Instituto Butantan (A) e da Floresta Nacional do Tapajós (FLONA) (C) localizada na região Oeste do Pará-Brasil. A fração 4 (P4) obtida por cromatografia de interação hidrofóbica foi injetada em uma coluna Mono Q<sup>TM</sup> 5/50 GL (1 mL 5x50 mm), acoplada a um sistema de cromatografia líquida. Os parâmetros para eluição foram fluxo de 1 mL/min, detecção UV<sub>280nm</sub>, e sistema de eluição gradiente de 0 a 100% da solução B (20mM Tris-HCl + 1 M de NaCl + 1 mM CaCl<sub>2</sub> pH 6,8), durante 61 minutos. As frações foram monitoradas quanto à presença de atividade hemorrágica, por meio da injeção de 10 µg no dorso de camundongos, e analisadas por SDS-PAGE (12,5%) em condições redutoras e não redutoras, M (padrões de massa molecular (kDa)), V (peçonha total), fração 4 (P4) fração 4a (P4a), fração 4b (P4b).

### 3.3 Autólise das SVMPs isoladas

As SVMPs da subclasse P-IIIb sofrem autólise *in vitro* e liberaram um fragmento com cerca de 30 kDa com os domínios disintegrina e rico em cisteína (Fox e Serrano, 2005). Para analisar se as proteínas presentes nas frações P4b IB e P4b FLONA podem sofrer autólise *in vitro*, as amostras foram incubadas a temperatura de 37 °C por um período de 72 h. A reação de autólise foi interrompida com a adição do tampão de amostra com a presença ou ausência de um agente redutor, e posterior fervura das amostras. A figura 4 exibe os perfis eletroforéticos de ambas as condições analisadas. A taxa de autólise das proteínas aumenta com relação ao tempo. Em condições não redutoras os géis apresentam uma banda em torno de 50 kDa bem difusa, em todos os tempos testados, quando as amostras foram reduzidas além da banda de 50 kDa (nessa condição não está difusa) está acrescentado uma banda na região de 30 kDa (em todas os tempos). O fragmento em torno de 30 kDa tem massa molecular correspondente ao domínio tipo disintegrina e rico em cisteína das proteínas que sofreram redução das ligações dissulfeto, no qual foi confirmado a identidade pela análise de espectrometria de massas. O domínio metaloproteinase resultante, de massa molecular de aproximadamente 25 kDa não foi visualizado no gel.



**Figura 4:** Autólise dos P4b IB (A) e P4b FLONA (B). As amostras foram incubadas a 37°C por 72 h, em 20mM de Tris-HCl pH 6,8 contendo 1mM de CaCl<sub>2</sub>. A autólise foi interrompida pela adição do tampão de amostra (Fosfato de Na 1M; 10% de SDS; 50% de glicerol; 0,1% de azul de bromofenol) na presença ou ausência de agente redutor (ditiotretol-DTT) e analisadas por SDS-PAGE 12,5%. M- padrões de massa molecular (kDa).

### 3.4 Caracterização das SVMPs por espectrometria de massas

A eletroforese realizada com as frações isoladas P4b FLONA e P4b IB em condições redutoras apresentou bandas majoritárias em torno de 50 kDa, e esses fragmentos foram recortados do gel para a análise por espectrometria de massas. O sequenciamento revelou que as frações P4b FLONA e P4b IB são idênticas, e não diferiram em nenhum aminoácido nos peptídeos sequenciados (Fig. 5). Os fragmentos peptídicos sequenciados por MS/MS totalizaram 187 aminoácidos para o P4b IB e 238 para o P4b FLONA. As sequências obtidas correspondem às regiões dos domínios catalítico, tipo disintegrina e rico cisteína.

As sequências das SVMPs das frações do IB e da FLONA foram comparadas com sequências de outras SVMPs já descritas (Fig. 5), a Batroxtatin 1, 2 e 3 (EU733639, EU733640 e EU733641 números de acesso no GeneBank) caracterizadas a partir do RNAm da glândula de peçonha de um único espécime de *B. atrox* (Tavares et al., 2008). Esta análise indicou que a SVMP isolada do IB apresentou apenas 50%, 56% e 51% de identidade com Batroxtatin 1, 2 e 3 respectivamente, e a do *pool* da FLONA exibiu 54%, 59% e 54% de identidade nessa mesma ordem. Os peptídeos sequenciados também foram alinhados com a jararagina, uma SVMP de classe PIIIb isolada da peçonha de *Bothrops jararaca* (Paine et al., 1992), que revelou um alto grau de similaridade com 97% de identidade para ambas as frações (Fig. 6), com uma cobertura de 44% para a SVMP do IB e 57% para a da FLONA. As substituições encontradas nas sequências das proteínas do P4b IB e P4b FLONA em comparação com a jararagina estão destacadas em vermelho. Na posição 4 há uma substituição de arginina por lisina, posição 7 ácido glutâmico por asparagina, posição 9 tirosina por fenilalanina, posição 55 valina por alanina, e na posição 391 ácido aspártico por ácido glutâmico para ambas as proteínas isoladas. A proteína isolada do *pool* da FLONA diferiu na posição 266 da jararagina, com uma substituição de serina por treonina. Pela massa molecular relativa, a presença de atividade hemorrágica, e a similaridade com outras SVMPs, as proteínas isoladas dos pools da FLONA e IB foram caracterizadas como SVMPs da classe PIII.

```

      10      20      30      40      50      60      70
Batroxtatin1 --EQQKYLNAKRYIELVIVADNVVKKYTSNSTAIRTRIYSCVNTLNLISAFNTHIALTGVEIWSNGDKINVQS
Batroxtatin2 --EQQRYLNAKKYVKLVLVADYIMYLKYGRLTLRTRMYDIVNIIINLI FQRMNIHVALVGLIWSNRDKIIVQS
Batroxtatin3 --EQQRYLNATKYIKLVIVADNVVVRKYTHNLIDIRKRIFEIVNIIISLIYLSMNINVALVGVDIWTNGDKINVTS
P4b FLONA -----KY-NPFRY-----KNNGDLDKIKARMYELANIVNEIFRYLYMHAALVGLIWSNGDKITVKP
P4b IB -----KY-NPFRY-----KNNGDLDKIKARMYELANIVNEIFRY-----KI TVKP

      85      95      105      115      125      135      145
Batroxtatin1 NSSVTLDFFGTWRETVLLNRKRHDNAQLLTAIDL DGPVGLAYVGS MCNPKGSTGLIQDHNKLDVMVAITMAHEL
Batroxtatin2 SADVTLDLFAKWRETDLLKRKSHDNAQLLTGINFN GPTAGLAYLSGICKPMYSAGIVQDHNKVHHLVAIAMAHM
Batroxtatin3 AVEPTLASFGTWRETDLLNRKTHDNAQLLTGINLN GDTVGYAYIGSMCMKQSVGIVQDHGKTYHLVAITMAHEL
P4b FLONA DVDYTLNSFAEWRKTDLLTRKSHDNAQLLTAIDFN GPTIGYAYIGSMCHPKR-----
P4b IB DVDYTLNSFAEWRKTDLLTRK-----

      160      170      180      190      200      210      220
Batroxtatin1 GHNLGMNHDGNQCNCGGNPCIMSATLDFEPVYQFSD CSRQHWRYLIDNRPPCILNIPLRTDIVSPVCGNYFVE
Batroxtatin2 GHNLGMDHDKDTCFCGARSVMAGTSLCEPSYLFSD CSRGRHRAFLIKDMPQCILEKPLRTDVVSPVCGNYFVE
Batroxtatin3 GHNLGMDHHRDSC TCLANSCIMSATIS--PSYQFSD CSQNDHLRYLISHTPQCILNEPLRTDIVSPEVCGNYLLE
P4b FLONA -----
P4b IB -----

      235      245      255      265      275      285      295
Batroxtatin1 VGEECDGCLPANCQNCNAATCKLIPGAQCEDEGEC CERCQFKGAGTECRAARSECDIAESCTGQSPECPD DDFQ
Batroxtatin2 VGEECDGSPATCRDTCDAATCKLRQGAQCAEGLCC DQCRFKGAGTECRAAKDECDMADLCTGRSAEC--TDRFQ
Batroxtatin3 EGEECDGCLPWNCPNCCNAATCKLTPGAQCAEGLCC YQCRFIKAGNVCRRPSECDIAESCTGQSAHCPDRFH
P4b FLONA -----KLKSGSQCGHGDCCEQCKFTKSGTECRASMSECDPAEHCTGQSSECPADV FH
P4b IB -----KSGSQCGHGDCCEQCKF---GTECRASMSECDPAEHCTGQSSECPADV FH

      310      320      330      340      350      360      370
Batroxtatin1 RNGQPCLNNQGYCYNGNCPILDHQCHNLF GAGATVAPNACFDENRKGQNSYCRKQNGVTI PCARKDIKCGRLFC
Batroxtatin2 RNGQPQNNNGYCYNGTCTPIMRDQCIALFGPNAA VSDACFQFNLQGNHYGYCRKEQNTKIACEPQDVKCGRLYC
Batroxtatin3 RNGQPCLNNHG YCYNGNCPIMLYQCIALFGAGTVAEDVCFNYNLDGQFFYCRRENDRIFPCAKEDVKCGRLYC
P4b FLONA KN-----KDNQKGNYYGYCRKE--KKI PCAPEDVKCGRLYC
P4b IB KN-----KDNQKGNYYGYCRKE--KKI PCAPEDVKCGRLYC

      385      395      405      415      425
Batroxtatin1 VQGPIGNTISCQSTSSQDDPDIGMVDLGTKCGDGRVCNSNRECVDVTPPY
Batroxtatin2 FPSSPATKNPCNIHYPNDEDKGMVLPGTKCADGKAC-SNGRCVDVT---
Batroxtatin3 KVY-NDNVHPCRYQYLDN---GMVDHGTKCAVGKVC-SNRQCV DVTNP-
P4b FLONA KDNSPGQNNPCKMFYSNEDEHKGMVLPGTKC---KVC-SNGHCVDVATAY
P4b IB KDNSPGQNNPCKMFYSNEDEHKGMVLPGTKC---KVC-SNGHCVDVATAY

```

**Figura 5:** Sequência parcial das frações P4b IB e P4b FLONA obtidas por LC-MS/MS alinhadas por meio do programa CLUSTAL W (Thompson et al., 1994) com sequências de outras SVMs P-III homólogas: Batroxstatin-1, -2, e -3 (EU733639, EU733640, e EU733641 números de acesso no GeneBank) encontradas no RNAm da glândula da peçonha de *Bothrops atrox* proveniente da Serra de Itapipoca, Ceará, Brasil. Os traços (--) indicam espaços inseridos entre os peptídeos sequenciados para facilitar o alinhamento.

```

          10      20      30      40      50      60
          |      |      |      |      |      |
Jararagina  EQQRY-DPYKYIEFFVVVDQGTVTKNNGDLDKIKARMYELANIVNEIFRYLYMHVALVGL
P4b FLONA   ---KY-NPFRY-----KNGDLDKIKARMYELANIVNEIFRYLYMHAALVGL
P4b IB      ---KY-NPFRY-----KNGDLDKIKARMYELANIVNEIFRY-----

          70      80      90      100     110     120
          |      |      |      |      |      |
Jararagina  EIWSNGDKITVKPDVDYTLNSFAEWRKTDLLTRKKHDNAQLLTAIDFNGPTIGYAYIGSM
P4b FLONA   EIWSNGDKITVKPDVDYTLNSFAEWRKTDLLTRKKHDNAQLLTAIDFNGPTIGYAYIGSM
P4b IB      -----KITVKPDVDYTLNSFAEWRKTDLLTRK-----

          130     140     150     160     170     180
          |      |      |      |      |      |
Jararagina  CHPKRSVGIQDYSPINLVVAVIMAHMGHNLGIHHD TGSCSCGDYPCIMGPTISNEPSK
P4b FLONA   CHPKR-----
P4b IB      -----

          190     200     210     220     230     240
          |      |      |      |      |      |
Jararagina  FFSNCSYIQWDFIMNHNPECIINEPLGTDIISP P VCGNELLEVGEEDCGTPENCQNEC
          -----

          250     260     270     280     290     300
          |      |      |      |      |      |
Jararagina  CDAATCKLKSQCGHGDCCEQCKFKSKSGTECRASMSECDPAEHCTGQSSECPADVFHKN
P4b FLONA   -----KLKSGSQCGHGDCCEQCKFKSKSGTECRASMSECDPAEHCTGQSSECPADVFHKN
P4b IB      -----KSGSQCGHGDCCEQCKF---GTECRASMSECDPAEHCTGQSSECPADVFHKN

          310     320     330     340     350     360
          |      |      |      |      |      |
Jararagina  GQPCLDNYGYCYNGNCPIMYHQCYALFGADVYEAEDSCFKDNQKGNYYGYCRKENGKKIP
P4b FLONA   -----KDNQKGNYYGYCRKE--KKIP
P4b IB      -----KDNQKGNYYGYCRKE--KKIP

          370     380     390     400     410     420
          |      |      |      |      |      |
Jararagina  CAPEDEVKCGRLYCKDNSPGQNNPCKMFYSNDEHKGMVLPGTKCADGKVC SNGHCVDVATAY
P4b FLONA   CAPEDEVKCGRLYCKDNSPGQNNPCKMFYSNDEHKGMVLPGTKC---KVCSNGHCVDVATAY
P4b IB      CAPEDEVKCGRLYCKDNSPGQNNPCKMFYSNDEHKGMVLPGTKC---KVCSNGHCVDVATAY

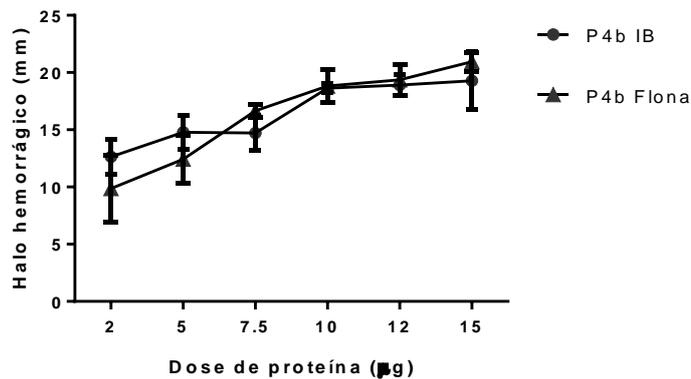
```

**Figura 6:** Sequência parcial das frações P4b IB e P4b FLONA obtidas por LC-MS/MS e alinhadas com a sequência da jararagina (X68251.1 número de acesso no GeneBank) isolada da peçonha de *Bothrops jararaca* (Paine et al., 1992), utilizando o programa CLUSTAL W (Thompson et al., 1994). As substituições de aminoácidos estão realçadas em vermelho, os traços (--) indicam espaços inseridos entre os peptídeos sequenciados para facilitar o alinhamento.

### 3.5 Determinação das atividades biológicas

#### 3.5.1 Atividade Hemorrágica

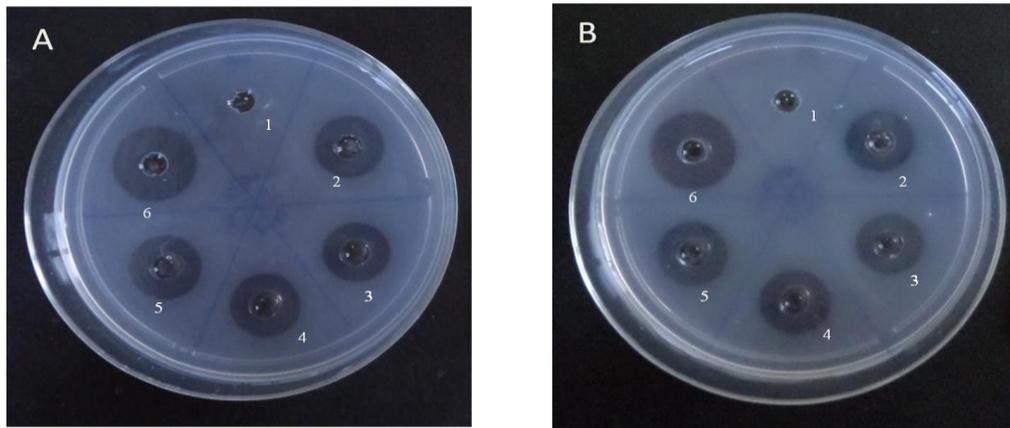
A caracterização da atividade hemorrágica das frações purificadas foi realizada por meio da injeção de diferentes doses na região dorsal de camundongos, e está apresentada na figura 7. Não houve diferença significativa entre a ação das proteínas em nenhuma das doses testadas.



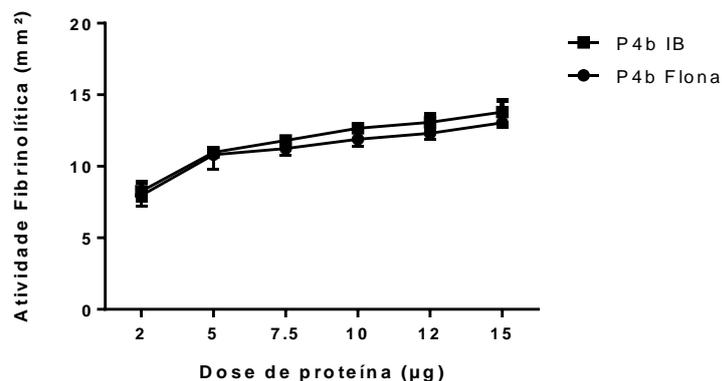
**Figura 7:** Atividade hemorrágica das frações P4b IB e P4b FLONA, isoladas da peçonha de *Bothrops atrox* proveniente do serpentiário do Instituto Butantan (IB) e da Floresta Nacional do Tapajós (FLONA), localizada na região Oeste do Pará-Brasil. Os resultados foram expressos pela média e o desvio padrão, grupos de animais com n=3 para cada dose.

#### 3.5.2 Atividade Fibrinolítica

A capacidade de hidrolisar o fibrinogênio e a fibrina já foi descrita para diversas SVMPs (Swenson e Markland, 2005). Assim, foi avaliada a atividade fibrinolítica das frações isoladas em placas de fibrina/agarose (Fig. 8). As frações P4b IB e P4b FLONA foram capazes de hidrolisar a fibrina de maneira dose dependente (Fig. 9), e quando comparadas não apresentaram diferenças significativas ( $p \leq 0,05$ ) (Fig. 10).



**Figura 08:** Comparação da atividade fibrinolítica da peçonha e frações cromatográficas (P4b FLONA e P4b IB) de *Bothrops atrox* proveniente da Floresta Nacional do Tapajós (FLONA), localizada na região Oeste do Pará-Brasil, e do serpentário do Instituto Butantan (IB). **A-** Apenas PBS (1), P4b FLONA nas doses de 7,5  $\mu\text{g}$  (2 e 3) e 10  $\mu\text{g}$  (4 e 5), e apenas 10  $\mu\text{g}$  da peçonha FLONA (6). **B-** Apenas PBS (1), P4b IB nas doses de 7,5  $\mu\text{g}$  (2 e 3) e 10  $\mu\text{g}$  (4 e 5), e apenas 10  $\mu\text{g}$  da peçonha IB (6). A atividade fibrinolítica foi realizada em placas de fibrina-agarose e avaliada pelo diâmetro ( $\text{mm}^2$ ) do halo de lise, após 18 h de incubação.

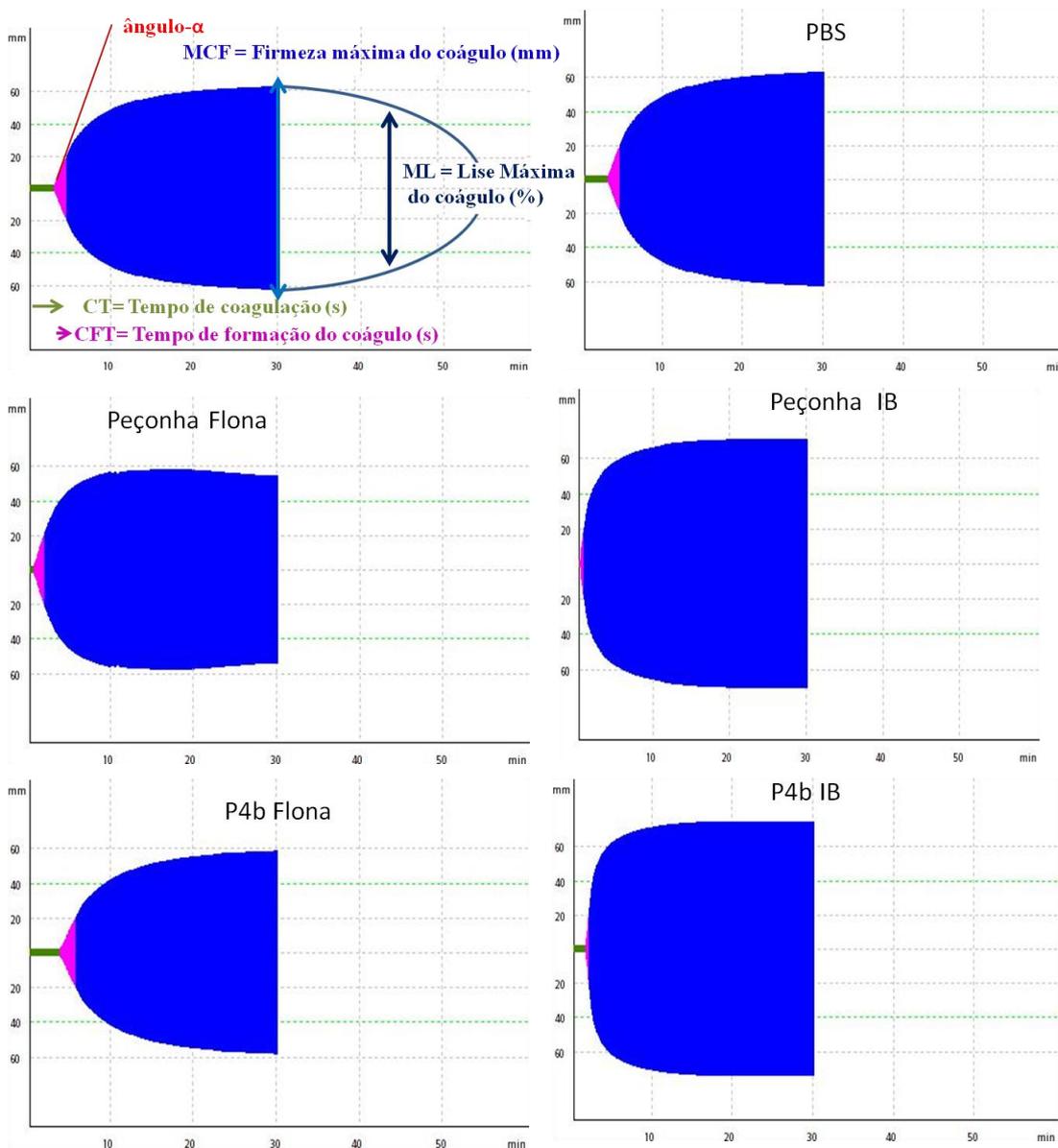


**Figura 9:** Comparação da atividade fibrinolítica dos pools 4b IB e 4b FLONA, isolados da peçonha de *Bothrops atrox* proveniente da Floresta Nacional do Tapajós (FLONA), localizada na região Oeste do Pará-Brasil, e do serpentário do Instituto Butantan (IB). A atividade fibrinolítica foi realizada placas de fibrina-agarose e avaliada pelo diâmetro ( $\text{mm}^2$ ) do halo de lise, após 18 h de incubação. Foram realizados 3 experimentos independentes. Os resultados mostram a média e o desvio padrão da triplicata de um experimento representativo.

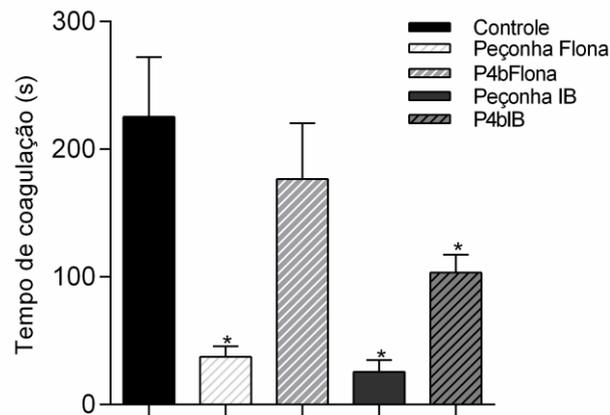
### 3.5.3 Atividade Coagulante

A tromboelastometria fornece a representação gráfica da formação e subsequente lise do coágulo sanguíneo, o que a torna uma ferramenta útil na avaliação da atividade coagulante de toxinas isoladas. Os experimentos de coagulação foram realizados em tromboelastógrafo com o sangue citratado de ratos Wistar (*Rattus norvegicus*) na presença ou

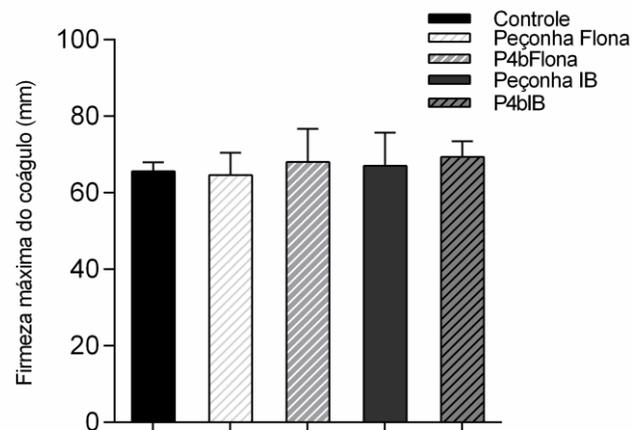
ausência de cálcio como cofator. As frações P4b IB e P4b FLONA e as peçonhas totais não foram capazes de induzir a coagulação na ausência de cálcio. Na presença de cálcio as peçonhas totais e fração P4b IB reduziram o tempo de coagulação em relação ao controle (PBS), como demonstram as figuras 10 e 11. A fração P4b FLONA na presença de cálcio, quando comparada com o controle, não apresentou diferença significativa ( $p \leq 0,05$ ) (Fig. 13). A peçonha total proveniente do serpentário do IB e sua fração isolada visualmente parecem aumentar a firmeza máxima do coágulo, mas estatisticamente os valores não foram diferentes do grupo controle (Fig. 12).



**Figura 10:** Representação gráfica do processo de coagulação induzida pela peçonha de *Bothrops atrox*, proveniente da Floresta Nacional do Tapajós (FLONA) e do serpentário do Instituto Butantan (IB) e suas frações cromatográficas (P4b FLONA e P4b IB). Ao sangue citratado de rato foi adicionado 200 mM de  $\text{CaCl}_2$ , 10  $\mu\text{g}$  das amostras ou PBS (controle). Foram avaliados os parâmetros: CT (tempo de coagulação), CFT (tempo de formação do coágulo),  $\alpha$  (ângulo), MCF (firmeza máxima do coágulo) e ML (lise máxima), durante 30 min.



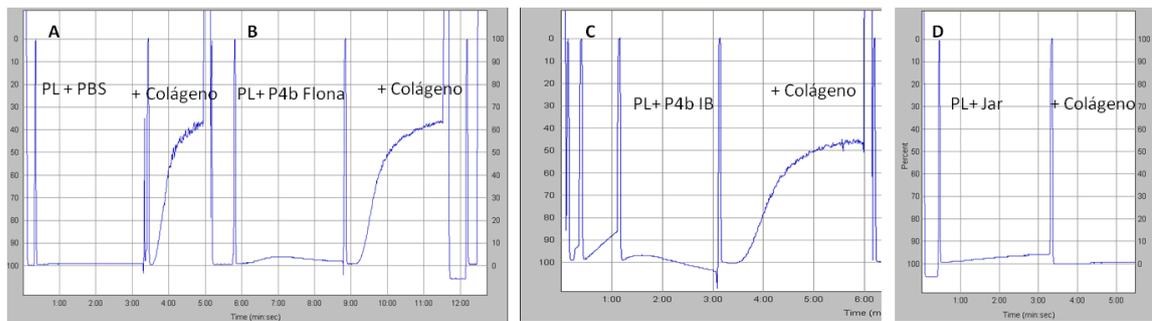
**Figura 11:** Tempo de coagulação em sangue citratado de ratos (*Rattus norvegicus*) induzido pela peçonha de *Bothrops atrox*, proveniente da Floresta Nacional do Tapajós (FLONA) e do serpentário do Instituto Butantan (IB) e suas frações cromatográficas (P4b FLONA e P4b IB). Ao sangue citratado de rato foi adicionado 200 mM de  $\text{CaCl}_2$ , 10  $\mu\text{g}$  das amostras ou PBS (controle). \* $p \leq 0,05$  vs. Controle, teste Tukey,  $n=3$ .



**Figura 12:** Firmeza máxima do coágulo em sangue citratado de ratos Wistar (*Rattus norvegicus*) induzido pela peçonha de *Bothrops atrox*, proveniente da Floresta Nacional do Tapajós (FLONA) e do serpentário do Instituto Butantan (IB) e suas frações cromatográficas (P4b FLONA e P4b IB). Ao sangue citratado de rato foi adicionado 200 mM de  $\text{CaCl}_2$ , 10  $\mu\text{g}$  das amostras ou PBS (controle),  $n=3$ .

#### .5.4 Atividade de inibição da agregação plaquetária

O teste de inibição da agregação plaquetária pelas frações isoladas P4b IB e P4b FLONA está apresentado na figura 14. A agregação plaquetária está representada por uma curva de transmitância obtida de plaquetas humanas lavadas desafiadas com colágeno (Fig. 13A). O P4b IB e P4b FLONA não foram capazes de inibir a agregação plaquetária em relação ao controle (Fig. 13B e 13C). A jararagina, utilizada como controle positivo do teste, nas mesmas doses testadas foi capaz de inibir a agregação plaquetária 100% (Fig. 13C), como já havia sido demonstrado por Kamiguti e colaboradores (1991). Foram testadas doses acima e abaixo de 50 $\mu$ g (Fig. 13), para ambas as frações e a jararagina e o resultado foi o mesmo que o citado anteriormente.



**Figura 13:** Ensaio de inibição da agregação plaquetária com as frações cromatográficas (P4b FLONA e P4b IB) da peçonha de *Bothrops atrox* proveniente da FLONA (Floresta Nacional do Tapajós) e do serpentário do Instituto Butantan (IB). A- Controle negativo (400  $\mu$ L de sangue + 90  $\mu$ L PBS + 2  $\mu$ L de colágeno (1 mg/mL)); B- P4b FLONA (400  $\mu$ L de sangue + 90  $\mu$ L de P4b FLONA (50  $\mu$ g) + 2  $\mu$ L de colágeno); C- P4b IB (400  $\mu$ L de sangue + 90  $\mu$ L de P4b IB (50  $\mu$ g) + 2  $\mu$ L de colágeno); D- Controle Positivo (400  $\mu$ L de sangue + 90  $\mu$ L de Jararagina (50  $\mu$ g) + 2  $\mu$ L de colágeno). Os gráficos representam as curvas de transmitância de luz através de uma suspensão de plaquetas após adição de colágeno.

## 4. Discussão

A composição da peçonha de *B. atrox* pode sofrer variações de acordo com o crescimento dos indivíduos (Lopez-Lozano et al., 2002; Guércio et al., 2006) e sua localização geográfica (Núñez et al., 2009; Calvete et al., 2011). Além desses fatores, a dieta das serpentes pode estar relacionada com a variação encontrada na composição de diversas peçonhas. A relação entre a produção de fosfolipases  $A_2$  e a alimentação com diferentes presas por espécies do gênero *Sistrurus* já foi relatada (Gibbs e Rossiter, 2008; Gibbs et al., 2011). No caso de *B. atrox*, os perfis cromatográficos obtidos das peçonhas de serpentes coletadas na natureza (FLONA) foram semelhantes em relação à peçonha de serpentes mantidas em biotério (IB), principalmente nas frações predominantes das peçonhas, de maior

retenção na fase estacionária, que correspondem às SVMPs da classe P-III (Sousa et al., 2013). Entretanto, nas frações eluídas entre 55 e 85 minutos foram verificadas diferenças importantes entre os cromatogramas, principalmente com relação à abundância das mesmas nas peçonhas, que predominaram nas amostras da FLONA. Nessa região do cromatograma são eluídas principalmente as SVMPs da classe P-I, serinoproteinases e as fosfolipases A<sub>2</sub> (Calvete et al., 2011), o que sugere que estas proteínas, embora em menor concentração nas peçonhas, são as que sofrem maior efeito quanto as variações ambientais. No trabalho de Gibbs e colaboradores (2011), as fêmeas adultas de *Sistrurus miliarius barbouri*, que se alimentavam apenas de camundongos apresentaram um incremento substancial na abundância relativa das principais classes de toxinas, em relação as que se alimentavam de lagartos ou rãs. As fosfolipases A<sub>2</sub>, serinoproteinases, disintegrinas e SVMPs de classe PI, foram as famílias com os maiores incrementos na concentração total da peçonha.

As SVMPs de classe PIII são os componentes majoritários da peçonha de *B. atrox* proveniente do Brasil, e respondem por cerca de 50% do conteúdo proteico (Núñez et al., 2009; Calvete et al. 2011; Sousa et al., 2013). Neste trabalho foram isoladas duas isoformas de uma SVMP de classe PIII da peçonha de *B. atrox* coletadas de espécimes da Floresta Nacional do Tapajós (Pará-Brasil) e do serpentário do Instituto Butantan. O rendimento no processo de purificação das frações isoladas foi alto, os P4b IB e P4b FLONA representaram cerca de 11 e 16% das proteínas presentes nos pools de peçonha respectivamente.

Os peptídeos aqui sequenciados, a partir das frações isoladas da peçonha de *B. atrox* demonstraram um alto nível de identidade com a jararagina. As SVMPs isoladas assim como a jararagina parecem suscetíveis a um processamento proteolítico, que libera um fragmento de cerca de 30 kDa, identificado por espectrometria de massas como o domínio tipo disintegrina e rico em cisteína. Lopez-Lozano e colaboradores (2002) demonstraram a presença de três isoformas de uma SVMP-PIII na peçonha de *B. atrox* que podem sofrer proteólise e gerar um fragmento de 27 kDa. Na peçonha de *B. jararaca* são encontradas três isoformas da jararagina, uma forma que é rapidamente processada em jararagina-C (domínios tipo disintegrina e rico em cisteína), uma forma resistente ao processamento da peçonha e autólise in vitro e uma forma que pode sofrer autólise, na qual os domínios tipo disintegrina e rico em cisteína são conectados ao domínio catalítico por ligações dissulfeto (Moura-da-Silva et al., 2003). Assim, as variações no processamento proteolítico de muitas SVMPs desempenham um papel importante na complexidade biológica das peçonhas, a partir da geração de

diferentes formas de uma mesma SVMP que contribuem para a atividade biológica (Moura-da-Silva et al., 2003; Fox e Serrano, 2008).

As frações aqui isoladas demonstraram ser capazes de hidrolisar a fibrina e foram altamente hemorrágicas, assim como diversas SVMPs de classe PIII descritas na literatura, como por exemplo, B-JussuMP-I de *Bothrops jararacussu* (Mazzi et al., 2006), BaH4 de *Bothrops asper* (Franceschi et al., 2000) e a jararagina (Moura-da-Silva et al., 2012). O processo hemorrágico desencadeado no envenenamento está diretamente relacionado com a degradação dos componentes da membrana basal, proteínas plasmáticas e de superfície celular pelas SVMPs (Bjarnason e Fox, 1994; Gutierrez e Rucavado, 2000; Gutierrez et al., 2005). No entanto, a atividade catalítica é similar em SVMPs hemorrágicas e não hemorrágicas, o que indica que a hidrólise da membrana basal não é o único mecanismo que atua no dano vascular (Baldo et al., 2008). Baldo e colaboradores (2010) demonstraram uma distribuição e acumulação tecidual particular das SVMPs-PIII na membrana basal, e sugeriram que essa acumulação está relacionada pela ligação ao colágeno. A importância da ligação com o colágeno para a ação hemorrágica das SVMP-PIII já havia sido demonstrada por Tanjoni e colaboradores (2003), quando bloquearam a ligação da jararagina com o colágeno e assim aboliram sua atividade hemorrágica. Dessa forma a acumulação particular das SVMPs-PIII hemorrágicas nos vasos capilares, por meio de propriedades adesivas dos domínios não enzimáticos, permitem a hidrólise dos componentes da membrana basal e consequente extravasamento de sangue (Baldo et al., 2010).

A capacidade de ativar componentes da cascata de coagulação, tais como o fator X e II, é uma característica de diversas SVMPs de classe PIII pró-coagulantes (Savejic, 2011). Algumas SVMPs descritas na literatura são capazes de ativar o fator X, tais como a RVV-X e VLFXA, que necessitam de cálcio para a ativação (Takeya et al., 1992; Siigur et al., 2001). Já as ativadoras de protrombina são classificadas em dois grupos A e B, baseado nas características estruturais e na presença ou ausência de um cofator para ativação da protrombina (Kini, 2005). O grupo A não necessita de cofator, enquanto que o grupo B necessita da presença de algum cofator para ativar o fator II. No presente estudo apenas a fração P4b IB foi capaz de diminuir o tempo de coagulação na presença de cálcio, e assim considerada pró-coagulante.

As plaquetas são um dos alvos principais das SVMPs na perturbação da hemostasia, e a maioria das SVMPs da classe PIII investigadas possuem atividade inibidora da agregação de

plaquetas induzida pelo colágeno (Kamiguti, 2005). A jararagina é uma das SVMP-PIII mais estudadas quanto à elucidação do mecanismo de inibição da agregação plaquetária dependente de colágeno. Apesar das frações P4b IB e P4b FLONA serem similares à sequência da jararagina, ambas não apresentaram atividade de inibição da agregação plaquetária nas doses testadas. A jararagina inibe a agregação plaquetária induzida pelo colágeno ao interagir com a integrina  $\alpha_2\beta_1$  (Kamiguti, 2005) por um motivo conformacional presente na porção C-terminal do domínio tipo disintegrina (Moura-da-Silva et al., 2008) ou via motivos estruturais presentes no domínio rico em cisteína (Serrano et al., 2007). Interessantemente, essas duas regiões tiveram cobertura nos sequenciamentos e se mostraram idênticas às regiões homólogas da jararagina, indicando que outras regiões da molécula ou o tipo/teor de glicosilação possam colaborar para essa atividade presente apenas na jararagina.

## 5. Conclusão

Neste trabalho foram isoladas duas prováveis isoformas de SVMP da classe PIII (P4b IB e P4b FLONA) da peçonha de *B. atrox* proveniente de ambiente natural e de cativeiro. As enzimas apresentaram atividade hemorrágica e atividade fibrinolítica, mas não foram capazes de inibir a agregação plaquetária induzida pelo colágeno. Apenas a isoforma isolada da peçonha proveniente do serpentário do Instituto Butantan foi considerada pró-coagulante por diminuir o tempo de coagulação em presença de cálcio. Com relação às diferenças entre peçonhas de serpentes coletadas na natureza ou provenientes de biotério, neste trabalho foram verificadas diferenças principalmente quantitativas na expressão de fosfolipases A2, SVMPs classe P-I e serinoproteases, que predominaram na peçonha da FLONA. Em ambos os casos, as SVMPs foram as toxinas majoritárias nas peçonhas de serpentes dos dois ambientes. Após o isolamento das SVMPs classe P-III e sequenciamento com mais de 50% de cobertura, não foi detectado diferenças estruturais entre elas, que foram idênticas à jararagina. Entretanto, a SVMP isolada da peçonha de serpentes do biotério se mostrou mais pró-coagulante e apenas a jararagina foi capaz de inibir a agregação plaquetária. Esses dados sugerem que apesar da identidade de estrutura primária, pode haver diferenças entre as moléculas, seja nas porções ainda não sequenciadas ou na glicosilação das mesmas, que justifique essas diferenças de atividade.

## Agradecimentos

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) (Edital Toxinologia – CAPES 063/2010 bolsa de mestrado), o Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico (CNPq) e ao Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Toxinas (INCTTox) pelo fomento. Ao Instituto Butantan (São Paulo-SP, Brasil) onde foi realizado a parte experimental do trabalho e as Faculdades Integradas do Tapajós (Santarém-PA, Brasil) pelo apoio nas coletas e extrações de peçonha.

## Conflito de interesse

Os autores declaram que não há conflito de interesse.

## Referências

- Alape-Girón, A., Sanz, L., Escolano, J., Flores-Díaz, M., Madrigal, M., Sasa, M., Calvete, J.J. 2008. Snake venomomics of the lancehead pitviper *Bothrops asper*: geographic, individual, and ontogenetic variations. *J. Proteome Res.* 7, 3556–3571.
- Balaban, N.P., Rudakova, N.L., Sharipova, M.R.. 2012. Structural and Functional Characteristics and Properties of Metzincins. *Biochemistry* 77, 119-127.
- Baldo, C., Jamora, C., Yamanouye, N., Zorn, T.M., Moura-da-Silva, A.M. 2010. Mechanisms of vascular damage by hemorrhagic snake venom metalloproteinases: tissue distribution and in situ hydrolysis. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 4 (6) e727.
- Baldo, C., Tanjoni, I., Leon, I.R., Batista, I.F., Della-Casa, Clissa, P.B., Weinlich, R., Lopes-Ferreira, M., Lebrun, I., Amarante-Mendes, G.P., Rodrigues, V.M., Perales, J., Valente, R.H., Moura-da-Silva, A.M., 2008. BnP1, a novel P-I metalloproteinase from *Bothrops neuwiedi* venom: biological effects benchmarking relatively to jararhagin, a P-III SVMP. *Toxicon* 51, 54–65.
- Bjarnason, J.B., Fox, J.W., 1994. Hemorrhagic metalloproteinases from snake venoms. *Pharmac. Ther.* 62, 325-372.
- Bradford, M.M., 1976. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 2, 248 – 254.
- Campbell, J.A., Lamar, W.W., 2004. *The Venomous Reptiles of the Western Hemisphere*. Cornell University Press: Ithaca, New York.

- Calvete, J.J., Sanza, L., Pérez, A., Borges, A., Vargas, A.M., Lomonte, B., Ângulo, Y., Gutiérrez, J.M., Chalkidis, H.M., Mourão, R.H.V., Furtado, M.F., Moura-da-Silva, A.M., 2011. Snake population venomomics and antivenomics of *Bothrops atrox*: Paedomorphism along its transamazonian dispersal and implications of geographic venom variability on snakebite management. *J. Proteomics* 74, 510–527.
- Carrasco, P.A., Mattoni, L.I., Leynaud, G.C., Scrocchi, G.J., 2012. Morphology, phylogeny and taxonomy of South American bothropoid pitvipers (Serpentes, Viperidae). *Zoologica Scripta* 41, 109–124.
- Dougherty, E.R., 2002. *An Introduction to Morphological Image Processing*. SPIE, The International Society for Optical Engineering: Bellingham.
- Dougherty E.R., Lotufo R.A., 2003. *Hands-On Morphological Image Processing*. Bellingham: SPIE, The International Society for Optical Engineering, 2003.
- Fox, J.W., Serrano, S.M.T., 2005. Structural considerations of the snake venom metalloproteinases, key members of the M12 reprotin family of metalloproteinases. *Toxicon* 45, 969–985.
- Fox, J.W., Serrano, S.M.T., 2008. Insights into and speculations about snake venom metalloproteinase (SVMP) synthesis, folding and disulfide bond formation and their contribution to venom complexity. *FEBS Journal* 275, 3016–30.
- Franceschi, A., Rucavado, A., Mora, N., Gutiérrez, J.M., 2000. Purification and characterization of BaH4, a hemorrhagic metalloproteinase from the venom of the snake *Bothrops asper*. *Toxicon* 38, 63 – 77.
- Gibbs, H.L., Rossiter, W., 2008. Rapid Evolution by Positive Selection and Gene Gain and Loss: PLA2 Venom Genes in Closely Related *Sistrurus* Rattlesnakes with Divergent Diets. *J. Mol. Evol.* 66, 151-166.
- Gibbs, H.L., Sanz, L., Chiuicchia, J.E., Farrelc, T.M., Calvete, J.J., 2011. Proteomic analysis of ontogenetic and diet-related changes in venom composition of juvenile and adult Dusky Pigmy rattlesnakes (*Sistrurus miliarius barbouri*). *J. Proteomics* 74, 2169-2179.
- Gonzalez, R.C., Woods, R.E., 2009. Eddins S.L. *Digital Image Processing Using MATLAB*. 2<sup>a</sup> Ed. Knoxville, TN: Gates mark, Publishing.
- Guerra C.E., Xavier A.R., Andrade A.J.N., 2011. Watershed Threshold and Gray Level Morfology Applied to Object Detecting in Remote Sensing and Petrographics images. 12<sup>o</sup> Intern. Cong. of the Braz. Geophysical Soc., Rio de Janeiro, Brasil.
- Guércio, R.A.P., Shevchenko, A., Shevchenko, A., López-Lozano, J.L., Jaime Paba, J., SOUSA, V.S., RICART, C.A.O., 2006. Ontogenetic variations in the venom proteome of the Amazonian snake *Bothrops atrox*. *Proteome Sci.* 4:11.

- Gutiérrez, J.M., Gené, J.A., Rojas, G., Cerdas, L., 1985. Neutralization of proteolytic and hemorrhagic activities of Costa Rican snake venoms by a polyvalent antivenom. *Toxicon* 23, 887–893.
- Gutiérrez, J.M., Rucavado, A., 2000. Snake venom metalloproteinases: their role in the pathogenesis of local damage. *Biochimie* 82, 841-850.
- Gutiérrez, J.M., Rucavado, A., Escalante, T., Díaz, C., 2005. Hemorrhage induced by snake venom metalloproteinases: biochemical and biophysical mechanisms involved in microvessel damage. *Toxicon* 45, 997-1011.
- Hanna, S.L., Sherman, N. E., Kinter, M. T., Goldberg, J. B., 2000. Comparison of proteins expressed by *Pseudomonas aeruginosa* strains representing initial and chronic isolates from a cystic fibrosis patient: an analysis by 2-D gel electrophoresis and capillary column liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Microbiology* 146, 2495-2508.
- Hege, T., Baumann, U., 2001. The Conserved Methionine Residue of the Metzincins: A Site-directed Mutagenesis Study. *J. Mol. Biol.* 314, 181-186.
- Jespersen, J., Astrup, T., 1983. A study of the fibrin plate assay of fibrinolytic agents: Optimal conditions, reproducibility and precision. *Haemostasis* 13, 301-315.
- Kamiguti, A.S., Cardoso, J.L., Theakston, R.D., Sano-Martins, I.S., Hutton, R.A., Rugman, F.P., Warrell, D.A., Hay, C.R., 1991. Coagulopathy and haemorrhage in human victims of *Bothrops jararaca* envenoming in Brazil. *Toxicon* 29, 961–972.
- Kamiguti, A.S., 2005. Platelets as targets of snake venom metalloproteinases. *Toxicon* 45, 1041–1049.
- Kini, R.M., 2005. The intriguing world of prothrombin activators from snake venom. *Toxicon* 45, 1133–1145.
- Kondo, H., Kondo, S., Ikezawa, H., Murata, R., Ohsaka, A., 1960. Studies on the quantitative method for determination of hemorrhagic activity of habu snake venom. *Jap. J. M. Sc. & Biol.* 13, 43-51.
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Lopez-Lozano, J.L., Sousa, M.V., Ricart, C.A.O., Chávez-Olortegui, C., Sanchez, E.F., Muniz, E.G., Buhnheim, P.F., Morhy, L., 2002. Ontogenetic variation of metalloproteinases and plasma coagulant activity in venoms of wild *Bothrops atrox* specimens from Amazonian rain forest. *Toxicon* 40, 997-1006.
- Markland, F.S., 1998. Snake venoms and the hemostatic system. *Toxicon* 36, 1749–1800.
- Mazzi, M.V., Magro, A.J., Amui, S.F., Oliveira, C.Z., Tieli, F.K., Stábeli, R.G., Fuly, A.L., Rosa, J.C., Braz, A.S., Fontes, M.R., Sampaio, S.V., Soares, A.M., 2006. Molecular

characterization and phylogenetic analysis of BjuusuMP-I: a RGD-P-III class hemorrhagic metalloprotease from *Bothrops jararacussu* snake venom. *J. Mol. Graph Model.* 26, 69 – 85.

Melgarejo, A.R., 2009. Serpentes peçonhentas do Brasil. In: Cardoso, J.L.C. et al. (Orgs.). *Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes*. Sarvier: São Paulo, pp.42-70.

Ministério da Saúde, 2014. Disponível em: <http://dtr2004.saude.gov.br/sinanwebr>. Acessado em: 09/01/2014.

Moura-da-Silva, A.M., Baldo, C., 2012. Jararhagin, a hemorrhagic snake venom metalloprotease from *Bothrops jararaca*. *Toxicon* v.60, p.280–289.

Moura-da-Silva, A.M., Butera, D., Tanjoni, I. 2007. Importance of snake venom metalloproteinases in cell biology: effects on platelets, inflammatory and endothelial cells. *Curr. Pharmaceut. Des.* 13, 2893–2905.

Moura-da-Silva, A.M., Della-Casa, M.S., David, A.S., Assakura, M.T., Butera, D., Lebrun, I., Shannon, J.D., Serrano, S.M.T., Fox, J.W., 2003. Evidence for heterogeneous forms of the snake venom metalloproteinase jar-arhagin: a factor contributing to snake venom variability. *Arch. Biochem. Biophys.* 409, 395–401.

Moura-da-Silva, A.M., Ramos, O.H.P., Baldo, C., Niland, S., Hansen, U., Ventura, J.S., Furlan, S., Butera, D., Della-Casa, M.S., Tanjoni, I., Clissa, P.B., Fernandes, I., Chudzinski-Tavassi, A.M., Eble, J.A., 2008. Collagen binding is a key factor for the hemorrhagic activity of snake venom metalloproteinases. *Biochimie* 90, 484-492.

Neiva, M., Arraes, F.B.M., De Souza, J.V., Rádis-Baptista, G., Da Silva, A.R.B.P., Walter M.E.M.T., Brigido, M.M., Yamane, T., Lopez-Lozano, J.L., Astolfi-Filho, S., 2009. Transcriptome analysis of the Amazonian viper *Bothrops atrox* venom gland using expressed sequence tags (ESTs). *Toxicon* 53, 427–36.

Núñez, V., Cid, P., Sanz, L., De La Torre, P., Angulo, Y., Lomonte, B., Gutiérrez, J.M., Calvete, J.J., 2009. Snake venomomics and antivenomics of *Bothrops atrox* venoms from Colômbia and the Amazon regions of Brazil, Perú and Ecuador suggest the occurrence of geographic variation of venom phenotype by a trend towards pedomorphism. *J. Proteomics* 73, 57–78.

Paine, M.J.I., Desmond, H.P., Theakston, R.D.G., 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.

Rucavado, A., Henríquez, M., García, J., Gutiérrez, J.M., 2008. Assessment of metalloproteinase inhibitors clodronate and doxycycline in the neutralization of hemorrhage and coagulopathy induced by *Bothrops asper* snake venom. *Toxicon* 52, 754–759.

- Salazar, A.M., Rodriguez-Acosta, A., Girón, M.E., Aguilar, I., Guerrero, B., 2007. A comparative analysis of the clotting and fibrinolytic activities of the snake venom (*Bothrops atrox*) from different geographical areas in Venezuela. *Thromb. Res.* 120, 95-104.
- Saldarriaga, M.M., Otero, R., Núñez, V., Toro, M.F., Díaz, A., Gutiérrez J.M., 2003. Ontogenetic variability of *Bothrops atrox* and *Bothrops asper* snake venoms from Colombia. *Toxicon* 42, 405–411.
- Sajevic, T., Leonardi, A., Krizaj, I. Haemostatically active proteins in snake venoms. *Toxicon* 57, 627-645, 2011.
- Serrano, M.T., Wang, D., Shannon, J.D., Pinto, F.M., Polanowska-Grabowska, R.K., Fox, J.W., 2007. Interaction of the cysteine-rich domain of snake venom metalloproteinases with the A1 domain of von Willebrand factor promotes site-specific proteolysis of von Willebrand factor and inhibition of von Willebrand factor-mediated platelet aggregation. *FEBS Journal* 274, 3611–3621.
- Siigur, E., Tõnismägi, K., Trummal, K., Samel, M., Vija, H., Subbi, J., Siigur, J., 2001. Factor X activator from *Vipera lebetina* snake venom, molecular characterization and substrate specificity. *Biochim. Biophys. Acta* 1568, 90–98.
- Sousa, L.F., Nicolau C.A., Peixoto, P.S., Bernadoni, J.L., Oliveira, S.S., Portes-Junior, J.A., Mourão, R.H.V., Lima-dos-Santos, I., Sano-Martins, I.S., Chalkidis, H.M., Valente, R.H., Moura-da-Silva, A.M., 2013. Comparison of Phylogeny, Venom Composition and Neutralization by Antivenom in Diverse Species of *Bothrops* Complex. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 7(9): e2442.
- Swenson, S., Markland, F.S., 2005. Snake venom fibrin(ogen)olytic enzymes. *Toxicon* 45, 1021–1039.
- Takeya, H., Nishida, S., Miyata, T., Kawada, S., Saisaka, Y., Morita, T., Iwanaga, S., 1992. Coagulation factor X activating enzyme from Russell's viper venom (RVV-X). A novel metalloproteinase with disintegrins (platelet aggregation inhibitor)-like and C-type lectin domains. *J. Biol. Chem.* 267, 14109–14117.
- Tanjoni, I., Butera, D., Bento, L., Della-Casa, M.S., Marques-Porto, R., Takehara, H.A., Gutiérrez, J.M., Fernandes, I., Moura-da-Silva, A.M., 2003. Snake venom metalloproteinases: structure/function relationships studies using monoclonal antibodies. *Toxicon* 42, 801–808.
- Tavares, N.A.C., Correia, J.M., Guarnieri, M.C., Lima-Filho, J.L., Prieto-da-Silva, A.R.B., Rádis-Baptista, G., 2008. Expression of mRNAs coding for VAP1/crotastatin-like metalloproteases in the venom glands of three South American pit vipers assessed by quantitative real-time PCR. *Toxicon* v.52, 897–907.

Thompson J.D., Higgins D.G., Gibson T.J., 1994. Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 22, 4673-4680.

Warrell, D.A. Snakebites in Central and South America: epidemiology, clinical features, and clinical management. In: Campbell, J.A., Lamar, W.W. (Eds). *The Venomous Reptiles of the Western Hemisphere*. Cornell University Press: Ithaca, New York, pp.709–761, 2004.

**ANEXOS**

**ANEXO A** - Autorização de coleta e manutenção de serpentes em cativeiro, bem como o transporte de amostras biológicas (Licença SISBio 32098).

**ANEXO B** - Autorização do Comitê de Ética no uso de Animais, do Instituto de Biodiversidade e Floresta/Universidade Federal do Oeste do Pará.

**ANEXO C** – Normas do periódico Toxicon (ISSN 0041-0101) para elaboração do artigo. Disponível em:< <http://www.journals.elsevier.com/toxicon/>>.