



UNIVERSIDADE FEDERAL DE RONDÔNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIODIVERSIDADE
E BIOTECNOLOGIA DA REDE BIONORTE



**CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DA BpirSP-39 E ISOLAMENTO E
CARACTERIZAÇÃO DA PRIMEIRA SERINOPROTEASE DO VENENO DA
SERPENTE *Bothrops brazili***

KAYENA DELAIX ZAQUEO

Porto Velho – RO

Agosto/2015

KAYENA DELAIX ZAQUEO

**CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DA BpirSP-39 E ISOLAMENTO E
CARACTERIZAÇÃO DA PRIMEIRA SERINOPROTEASE DO VENENO DA
SERPENTE *Bothrops brazili***

Tese de doutorado apresentada ao Curso de
Doutorado do Programa de Pós-Graduação
em Biodiversidade e Biotecnologia da Rede
BIONORTE, na Fundação Oswaldo Cruz
Rondônia, como requisito parcial para a
obtenção do Título de Doutor em
Biotecnologia.

Orientador: Dr. RODRIGO G. UERINO STÁBELI

Co-orientador: Dr. ANDREIMAR MARTINS SOARES

Porto Velho – RO

Agosto/2015

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Z35c Zaqueo, Kayena Delaix
Caracterização estrutural da BpirSP-39 e isolamento e
caracterização da primeira serinoprotease do veneno da serpente
Bothrops brazili / Kayena Delaix Zaqueo. 2015
154 f.: il. color; 31 cm.

Orientador: Rodrigo Guerino Stábeli
Coorientador: Andreimar Martins Soares
Tese (Doutorado em Biodiversidade e Biotecnologia da Rede
Bionorte) - Universidade Federal do Amazonas.

1. Serpente peçonhenta. 2. Enzima. 3. Biotecnologia. 4.
Trombina-símile. I. Stábeli, Rodrigo Guerino II. Universidade
Federal do Amazonas III. Título

KAYENA DELAIX ZAQUEO

**CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DA BpirSP-39 E ISOLAMENTO E
CARACTERIZAÇÃO DA PRIMEIRA SERINOPROTEASE DO VENENO DA
SERPENTE *Bothrops brazili***

Tese de doutorado apresentada ao Curso de
Doutorado do Programa de Pós-Graduação
em Biodiversidade e Biotecnologia da Rede
BIONORTE, na Fundação Oswaldo Cruz
Rondônia, como requisito parcial para a
obtenção do Título de Doutor em
Biotecnologia.

Orientador: Dr. RODRIGO GUERINO STÁBELI

Co-orientador: Dr. ANDREIMAR MARTINS SOARES

Banca examinadora

Prof. Dr. Andreimar Martins Soares
Orientador- Presidente da banca

Prof. Dr^a. Juliana Pavan Zuliani
Examinador 2 – interno

Prof. Dr. Cléberson de Freitas Fernandes
Examinador 3 – interno

Prof. Dr^a. Carla Freire Celedônio Fernandes
Examinador 4 – interno

Prof. Dr. Anderson Makoto Kayano
Examinador 5 – externo

Porto Velho – RO

Agosto/2015

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Rosmaní Loureiro Cruz Zaqueo
e Idevaldo Garcia Zaqueo, pelo constante
incentivo e apoio incondicional. Não tenho
palavras para expressar o quanto eu os amo e
sou grata.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Luiz Hildebrando Pereira da Silva (*In memoriam*), Sábio Mestre, por dedicar sua vida à arte da investigação científica, além de idealizar um centro de pesquisa no Estado de Rondônia, o que engrandeceu e continua engrandecendo nosso estado. Tenho imenso prazer e satisfação em ter sido sua aluna!

Ao meu orientador Prof. Dr. Rodrigo Guerino Stábeli que, mesmo distante, continua proporcionando o sonho de tantos aspirantes a pesquisadores de Rondônia. Sinto-me honrada em ter sido sua orientanda por todos esses anos.

Ao meu co-orientador Prof. Dr. Andreimar Martins Soares por, com sua maneira calma e serena, me auxiliar a ser uma pessoa mais tranquila e compreensiva. Creio que esses, dentre os tantos ensinamentos, sejam os de maior valor. Muito obrigada!

À Prof^a. Dr^a. Juliana Pavan Zuliani que conquistou meu carinho e admiração pela pessoa e orientadora que é.

À Prof^a. Dr^a. Carla Freire Celedônio Fernandes por ser sempre tão compreensiva; meiga e serena e pelas oportunidades já proporcionadas a mim.

Ao Prof. Dr. Spartaco Astolfi Filho por, junto com tantos outros doutores, conjecturar e criar a Rede BIONORTE, o que proporcionou o desenvolvimento dessa tese.

Ao Prof. Dr. Cléberson de Freitas Fernandes pelas contribuições no exame de qualificação e, principalmente, por estar à frente da Coordenação Estadual do PPGBIONORTE, sempre nos recebendo com um sorriso no rosto e disposto a nos auxiliar. Muito obrigada mesmo!

Ao Prof. Dr. Leonardo de Azevedo Calderon pelos diversos auxílios prestados e pelas dicas experimentais.

A todos os amigos do CEBio/IPEPATRO/FIOCRUZ, Adriana, Amy, Ana, Cláudia, Cléo, Corrêa, George, Jeane, João Gabriel, Jorge, Juliana, Kayano, Kaynara, Leandro Dill, Marjorie, Mauro, Paula, Rafaela, Rodriguinho, Roniele, Rudson, Soraya, Sulamita, Tiago, Toninho e aos vaaáarioos novos integrantes. Por mais que eu não tenha estado tão presente nos últimos meses, saibam que vocês são muito importantes para mim.

Um agradecimento especial ao Dr^o Kayano, por ser mais que um orientador para todos do CEBio.

À minha grande amiga Shirlei Ferreira da Silva Araújo pela amizade e convívio durante todos esses anos, por fazer parte da minha vida.

Ao querido ex-aluno e agora parceiro de trabalho Marcos, por ser uma pessoa muito competente e solícita.

À querida Aline Schimtz pela amizade e, sobretudo, companheirismo; desculpe minha ausência por esses últimos anos.

A todos meus amigos do doutorado pela convivência durante as disciplinas. Não citarei nomes, mas tenho todos guardados comigo.

Ao Instituto de Pesquisa em Patologias Tropicais – IPEPATRO e à Fundação Oswaldo Cruz Rondônia – FIOCRUZ/RO pelo financiamento da pesquisa.

À Universidade Federal de Rondônia (UNIR) que me acolhe desde 2005.

A todos os funcionários do IPEPATRO e da UNIR.

A todos que de forma direta ou indireta vieram a ajudar na realização deste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida durante o Doutorado.

A todos os professores de Ciências Biológicas e Gestão Ambiental da União das Escolas Superiores de Rondônia (UNIRON).

Acredito que nenhum de nós pode deixar de agradecer a todos os nossos professores, desde os primórdios, até os dias de hoje, pois muito do que somos e sabemos devemos a eles.

Aos membros das bancas (qualificação e defesa) pelas sugestões já recebidas e pelas que ainda virão.

A toda minha família por acreditarem e confiarem em mim.

Ao Paulino Filho, eterno namorado, por sempre me apoiar. Muito obrigada!

À minha irmã Kaynara Delaix Zaqueo, atualmente também doutoranda pela Rede BIONORTE, por seguir o caminho da biologia, pelos diversos trabalhos de campo e viagens, enfim, por ser minha irmã.

E por último, **e de maior importância**, aos meus pais, por tudo. Eu não encontro palavras para demonstrar o carinho e amor que sinto por vocês. Eu os amo muito... é imensurável.

Essa parte de minha tese, sem dúvidas, foi o componente mais difícil de ser escrito. Foram muitas as pessoas que fizeram parte dessa etapa de grande importância em minha vida e creio que, infelizmente, eu tenha esquecido de citar ilustres

personagens dessa trajetória, não por desmerecimento, mas sim pelo desejo insaciável de entregar os exemplares aos examinadores.

Não caberia aqui tudo que tenho a agradecer a todos, mas em síntese, bem síntese, é isso.

“
 🎵 Neste planeta que gira
 Quem vai plantando mentira
 Não pode colher verdade..... 🎵”

Pedro Paulo Mariano por Goiano & Paranaense

ZAQUEO, Kayena Delaix. CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DA BpirSP-39 E ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DA PRIMEIRA SERINOPROTEASE DO VENENO DA SERPENTE *Bothrops brazili*. 154 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade Federal de Rondônia, Porto Velho, 2015.

RESUMO

Os venenos de serpentes são constituídos por compostos orgânicos e inorgânicos, resultando em um produto biológico eficiente e de natureza complexa, que tem como principais objetivos a imobilização, morte e a promoção da digestão inicial das presas. Além disso, apresentam um enorme potencial para prospecção de moléculas com aplicação farmacológica. Dentre os compostos orgânicos destacam-se as proteínas, principalmente as proteases, pois apresentam capacidade em alterar o sistema hemostático. As serinoproteases dos venenos de serpentes (SVSPs) pertencem à classe de proteases que agem sobre diferentes fatores da cascata de coagulação. Uma das classes de SVSPs é descrita como trombina-símile (SVTLEs) por mimetizar algumas atividades da trombina, exibindo capacidade coagulante *in vitro* por intermédio da degradação das cadeias α e/ou β do fibrinogênio. Os objetivos do trabalho foram (i) caracterizar estruturalmente a BpirSP-39 isolada previamente do veneno de *Bothrops pirajai* e (ii) isolar e caracterizar a primeira serinoprotease (SP) do veneno de *B. brazili*. Estudos dessa magnitude justificam-se, pois podem trazer importantes informações sobre a participação das proteínas durante o envenenamento, podendo auxiliar no melhor conhecimento sobre os mecanismos de ações destas enzimas. As estruturas primárias, bem como, os modelos tridimensionais de ambas SPs isoladas foram elucidados. A BpirSP-39 possui 224 aminoácidos e apresenta elevada identidade com outras SVSPs. A BbrzSP-32 foi obtida do veneno de *B. brazili* após duas etapas cromatográficas (afinidade e fase reversa) e sua estrutura primária apresentou 240 resíduos de aminoácidos. Ambas as enzimas caracterizadas podem assumir a estrutura da SP de *Agkistrodon halys* (PDB ID: 4E7N), proteína utilizada como modelo para a modelagem molecular, sendo glicoproteínas monoméricas globulares com duas α -hélices e dois barris formados por folhas- β . Com relação à BbrzSP-32, por intermédio de eletroforese foi obtida a massa molecular relativa (36 kDa), sendo sua massa absoluta confirmada por espectrometria de massa como 32.520 Da. A BbrzSP-32 possui identidade de até 79,48% quando comparada a outras SVSPs e foi capaz de, em modelos *in vitro*, degradar a cadeia α do fibrinogênio, sendo considerada uma SVTLE-

A. Possui atividade dose dependente no processo de degradação de redes de fibrina, demonstrando maior especificidade por essa atividade quando comparada à sua ação trombolítica. Apresenta atividade de proteólise sobre gelatina e substratos cromogênicos, para serinoproteases e enzimas trombina-símile (S-2288 e S-2238, respectivamente), além de possuir atividade coagulante sobre o plasma humano. As atividades de proteólise sobre os substratos S-2288 e S-2238, bem como, coagulantes, foram reduzidas por PMSF e benzamidina e, em menor proporção por EDTA. A BbrzSP-32 apresenta relativa estabilidade frente a variações de pH e temperatura, demonstrando maiores atividades entre 30 e 40 °C e, em intervalo de pH 7,5 à 8,5. A enzima não induz ou interfere na coagulação de plaquetas lavadas. Quando incubada com os parasitos *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania infantum*, nas formas epimastigota e promastigota, respectivamente, e bactérias gram-positiva da espécie *Staphylococcus epidermidis*, apresentou-se citotóxica sobre os microrganismos, além disso, foi capaz de reduzir o biofilme formado pela espécie de bactéria. Ambas SPs apresentam potenciais biotecnológicos.

Palavras-chave: serpente peçonhenta; enzima; biotecnologia; Viperidae; trombina-símile.

ABSTRACT

Snake venoms are formed by organic and inorganic compounds and result in a complex product of biological nature which present as main objectives the detention, death and the promotion of initial digestion of its prey. In addition, presents a vast potential for exploration of molecules with pharmaceutical applications. Among organic compounds protease should be highlighted due its ability to cause changes on hemostatic system. Snake venoms serine proteases (SVSPs) are a class of proteases that act on different factors of the coagulation cascade. One SVSPs class is described as thrombin-like (SVTLEs) by mimicking some thrombin activities and displays coagulant ability in vitro through the degradation of fibrinogen chains α and/or β . The objectives were (i) to characterize structurally BpirSP-39 previously isolated from *Bothrops pirajai* venom and (ii) to isolate and characterize the first serine protease (SP) of *B. brazili*. Studies of this magnitude are justified because they can provide important information on the involvement of proteins during envenoming, which can contribute to a better understanding of the mechanisms of action of these enzymes. Primary and tertiary structures model of both isolated SPs were elucidated. BpirSP-39 presented 224 amino acids and has high identity when compared to other SVSPs. BbrzSP-32 was obtained from *B. brazili* venom after two chromatographic steps (affinity and reverse phase) and its primary structure showed 240 amino acid residues. Both SPs characterized are enzymes which may take the SP's structure of *Agkistrodon halys* (PDB ID: 4E7N), an enzyme used as a model for molecular modeling. The enzymes are glycoproteins globular and monomeric with two α -helices and two barrels formed by sheet- β . BbrzSP-32 showed 36 kDa of relative molecular mass and its absolute mass was confirmed by mass spectrometry as 32,520 Da. It present 79.48% identity when compared to other SVSPs and was able to degrade the α -chain of fibrinogen, in vitro models, and is considered a SVTLE-A. It showed a dose-dependent activity in the process of degradation of fibrin networks demonstrating greater specificity for this activity when compared to its thrombolytic action. BbrzSP-32 demonstrated proteolysis activity on gelatin and chromogenic substrates for serine proteases and thrombin-like enzymes (S-2288 and S-2238 respectively), besides having coagulant activity on human plasma.

After pre-incubation with PMSF and benzamidine the coagulants and proteolytic activities on S-2288 and S-2238 substrate were reduced. BbrzSP-32 shows stability against pH and temperature variations, demonstrating optimum activity between 30 and 40 °C and in the pH range 7.5 to 8.5. The enzyme does not induce or interferes with the clotting washed platelets. When incubated with parasites *Trypanosoma cruzi* or *Leishmania infantum*, promastigotes and the epimastigote forms, respectively, and *S. epidermidis* (gram positive-bacteria), the enzyme presented to cytotoxic on microorganisms, furthermore, was able to reduce the biofilm formation by the bacteria species. Both SPs present potential biotechnological.

Keywords: Snake venom; enzyme; biotechnology; Viperidae; thrombin-like.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Distribuição de serpentes peçonhentas no mundo.	21
Figura 2: Solicitações de patentes brasileiras envolvendo o desenvolvimento de produtos a partir de toxinas animais.	26
Figura 3: Esquema da cascata da coagulação sanguínea.	29
Figura 4: Local de ação das SVSPs na cascata de coagulação sanguínea.	31
Figura 5: <i>Bothrops pirajai</i>	34
Figura 6: Espécime adulto de <i>Bothrops brazili</i>	36
Figura 7: Alinhamento múltiplo da sequência de BpirSP-39 e outras SPs CLUSTAL O (1.2.1).	52
Figura 8: Alinhamento múltiplo da sequência N-terminal das serinoproteases de <i>B. pirajai</i> : BpirSP-39 com BpirSP-41 e BpirSP-27 (CLUSTAL O (1.2.1) e Cobalt RID Y27809XE211 (3 seqs).	53
Figura 9: Teste de validação do Modelo.	54
Figura 10: Avaliação do modelo da BpirSP-32.....	55
Figura 11: Modelo tridimensional final da BpirSP-39.	56
Figura 12: Cromatografia de afinidade em Benzamidine-Sepharose do veneno de <i>B. brazili</i>	57
Figura 13: Gel de eletroforese das frações oriundas da Cromatografia em coluna de Benzamidina do veneno de <i>B. brazili</i> e BrzSP-32.....	58
Figura 14: Cromatografia de fase reversa em coluna C2/C18 da fração 3 resultante da cromatografia em coluna Benzamidine-Sepharose do veneno de <i>B. brazili</i>	59
Figura 15: Determinação da massa molecular relativa da BbrzSP-32.	60
Figura 16: Determinação da massa molecular de BbrzSP-32 por Espectrometria de massa em MALDI TOF/TOF.	60
Figura 17: Alinhamento da sequência aminoterminal da BbrzSP-32 com outras SVSPs (UNIPROT).	61

Figura 18: Alinhamento múltiplo entre a sequência da BbrzSP-32 com outras serinoproteases do veneno de serpentes.	62
Figura 19: Modelo tridimensional da enzima BbrzSP-32.	63
Figura 20: Atividade fibrinogenolítica da BbrzSP-32.....	64
Figura 21: Atividade fibrinolítica da BbrzSP-32.....	65
Figura 22: Atividade trombolítica da BbrzSP-32.	66
Figura 23: Atividade gelatinolítica da BbrzSP-32.....	67
Figura 24: Efeito dos compostos químicos sobre a atividade do veneno de <i>B. brazili</i> e da BbrzSP-32 frente ao cromogênico S-2238 (para enzimas trombina-símile).....	68
Figura 25: Efeito dos compostos químicos sobre a atividade do veneno de <i>B. brazili</i> e da BbrzSP-32 frente ao cromogênico S-2288 (para serinoprotease).	69
Figura 26: Efeito do veneno de <i>B. brazili</i> e da BbrzSP-32 sobre a coagulação.	70
Figura 27: Efeito de inibidores sobre a atividade coagulante do plasma citratado induzida pelo veneno de <i>B. brazili</i> e BbrzSP-32.....	71
Figura 28: Atividade enzimática influenciada pelo pH e pela temperatura.	72
Figura 29: Atividade anti <i>Trypanosoma cruzi</i> <i>in vitro</i> do veneno e da BbrzSP-32.....	73
Figura 30: Atividade Anti promastigota de <i>Leishmania infantum</i> do veneno e da BbrzSP-32.....	74
Figura 31: Atividade do veneno de <i>B. brazili</i> e da BbrzSP-32 frente à <i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 35984 e Biofilme formado pela mesma.	75
Figura 32: Comparação da ação de antibiótico controle e da BbrzSP-32 frente à <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853 e Biofilme formado pela mesma.....	76
Figura 33: Alinhamento entre as sequências de BpirSP-39 e BbrzSP-32.	80
Figura 34: Formação de Biofilme bacteriano.	92

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Notificações de casos de acidentes ofídicos por Tipo Serpente.	23
Tabela 2: Porcentagem de similaridade entre a BbrzSP-32 e outras serinoproteases (EC:3.4.21) de serpentes.....	79
Tabela 3: Algumas das principais aplicações de serinoproteases isoladas de venenos de serpentes.	94
Tabela 4: Comparação entre as atividades biológicas da trombina com as novas serinoproteases isoladas.....	96

LISTA DE ABREVIACÕES E SIGLAS

SIGLA	SIGNIFICADO
BApNA	Na-Benzoil-DL-arginil-p-nitroanilida
BbrzSP-32	Serinoprotease de <i>Botrops brazili</i>
BpirSP-39	Serinoprotease de <i>B. pirajai</i>
DCM	Dose Mínima Coagulante
DM	Dinâmica Molecular
DMSO	Dimetilsulfóxido
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
FLA ₂	Fosfolipase A ₂
HPLC	<i>High Performance Liquide Chromatography</i> - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
PBS	Tampão fosfato-salino
PL	Plaquetas Lavadas
PMSF	Fluoreto de fenilmetilsulfonila
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
SDS-PAGE	Gel de poliacrilamida com Dodecil Sulfato de Sódio
SP	Serinoprotease
SVSP	Serinoprotease do veneno de serpente
SVTLE	Serinoprotease do veneno de serpente trombina-símile
TFA	Ácido trifluoroacético
TLE	Trombina-símile

SUMÁRIO

1	Serpentes, seus venenos e proteínas	21
1.1	Serpentes.....	21
1.2	Acidentes com Serpentes	22
1.3	Venenos de Serpentes	24
1.4	Serinoproteases	27
1.5	Serinoproteases dos Venenos de Serpentes	30
1.6	Enzimas Trombina-símile	32
1.7	<i>Bothrops pirajai</i>	34
1.8	<i>Bothrops brazili</i>	36
2	OBJETIVOS.....	38
2.1	Geral.....	38
2.2	Específicos	38
3	Material e Métodos.....	39
3.1	Determinação da Estrutura Primária da BpirSP-39	39
3.1.1	Redução e Alquilação	39
3.1.2	Digestão da Proteína.....	39
3.1.3	Sequenciamento proteico.....	39
3.2	Modelagem molecular e determinação dos sítios de N-glicosilação	40
3.2.1	Dinâmica molecular.....	40
3.2.2	A análise estrutural e validação	41
3.3	Isolamento da BbrzSP-32	41
3.4	Obtenção da Massa Relativa.....	42
3.5	Espectrometria de Massa	42
3.6	Sequenciamento N-terminal	43
3.6.1	Determinação da estrutura primária	43
3.7	Determinação do Modelo Tridimensional	43
3.8	Atividade Fibrinogenolítica (<i>in vitro</i>).....	44
3.9	Atividade Fibrinolítica	44
3.10	Atividade Trombolítica	45
3.11	Ensaio gelatinolítico	45

3.12	Efeito de Compostos Químicos sobre a Atividade Proteolítica	46
3.13	Atividade Coagulante (Determinação da Dose Mínima Coagulante)	46
3.14	Efeito de Compostos Químicos sobre a Atividade Coagulante	47
3.15	Ensaio de Estabilidade frente à variação de pH	47
3.16	Ensaio de Estabilidade Térmica	47
3.17	Ensaio de Agregação Plaquetária	48
3.18	Cultura de Parasitos	48
3.18.1	<i>Trypanosoma cruzi</i>	48
3.18.2	<i>Leishmania infantum</i>	49
3.18.3	Teste de Susceptibilidade de Epimastigotas de <i>Trypanosoma cruzi</i>	49
3.18.4	Teste de Susceptibilidade de Promastigota de <i>Leishmania infantum</i>	49
3.19	Condições de culturas bacterianas e Ensaio antibacterianos e antibiofilmes	50
3.20	Análises Estatísticas	51
4	RESULTADOS	52
4.1	Determinação da estrutura primária e modelo da BpirSP-39	52
4.2	Isolamento da Serinoprotease de <i>B. brazili</i>	57
4.3	Determinação da Massa Molecular	59
4.4	Determinação da Sequência e modelagem da BbrzSP-32	61
4.5	Atividade Fibrinogenolítica	63
4.6	Atividade Fibrinolítica	64
4.7	Atividade Trombolítica	65
4.8	Degradação de gelatina	66
4.9	Efeito de Compostos Químicos sobre a Atividade Proteolítica	67
4.10	Atividade Coagulante	69
4.11	Efeito de Compostos Químicos sobre a Atividade Coagulante	70
4.12	Ensaio de Estabilidade frente à variação de pH e Temperatura	72
4.13	Agregação Plaquetária	73
4.14	Teste de Susceptibilidade de Epimastigotas de <i>Trypanosoma cruzi</i>	73
4.15	Teste de Susceptibilidade de Promastigota de <i>L. infantum</i>	74
4.16	Atividades antibacterianas e antibiofilme <i>in vitro</i>	75
5	DISCUSSÃO	77
5.1	Isolamento e Caracterização bioquímica e Estrutural	78
5.2	Caracterização Enzimática	82

5.3	Prospecção Biotecnológica	87
5.3.1	BbrzSP-32 x Protozoonoses	88
5.3.2	Atividade Antibacteriana e Antibiofilme da BbrzSP-32	90
5.4	Bioprospecção.....	94
6	CONCLUSÕES	97
7	ARTIGOS PUBLICADOS RELACIONADOS À TESE	98
8	REFERÊNCIAS	124
	Apêndices	148
	Apêndice 1.....	148
	Apêndice 2.....	149
	Anexos.....	150
	Anexo 1	150
	Anexo 2	153

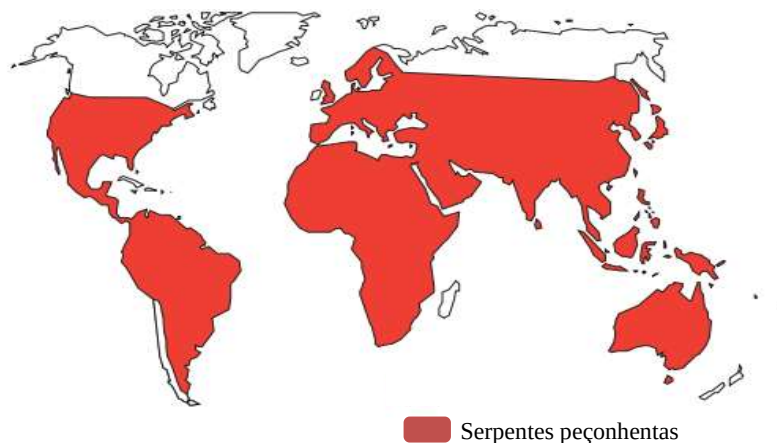
1 SERPENTES, SEUS VENENOS E PROTEÍNAS

1.1 Serpentes

As serpentes são animais com ampla distribuição geográfica, não havendo registros apenas para algumas ilhas, ambientes congelados ou de elevadas altitudes. No mundo já foram catalogadas 3.496 espécies de serpentes (UETZ; HOŠEK, 2013) e, com frequência, novas são descritas. O Brasil é o segundo país no ranque de riqueza de répteis, com 721 espécies, naturalmente ocorrentes e se reproduzindo no território nacional. Destas, 371 (51,46%) correspondem às serpentes (HERPETOLOGIA et al., 2013).

A fauna ofídica brasileira é representada por dez famílias, no entanto, apenas duas são consideradas de relevância médica, sendo elas as famílias Viperidae e Elapidae (ÁVILA-PIRES; HOOGLMOED; VITT, 2007), pois os indivíduos que as compõem possuem veneno e aparato inoculador especializado (JACKSON, 2003; FRY et al., 2012). Ambas as famílias possuem representantes distribuídos pelo mundo (Figura 1).

Figura 1: Distribuição de serpentes peçonhentas no mundo.



Em vermelho estão destacadas as áreas onde ocorrem registros de serpentes peçonhentas (excluindo-se as serpentes que vivem em ambientes marinhos) ("World Health Organization", 2007).

A fauna brasileira de Elapídeos consta com 30 espécies, perfazendo um total de 37 táxons. Os Viperídeos totalizam 30 espécies (36 táxons) (BÉRNILS; COSTA, 2012; HERPETOLOGIA et al., 2013). Mesmo apresentando uma proximidade com relação ao

número de espécies, os viperídeos participam de 226 vezes mais acidentes ofídicos que os elapídeos. Devido a diversos fatores, dentre os quais destacam-se: (i) o hábito sinantrópico de algumas espécies do gênero *Bothrops*, (ii) a presença da denticção solenóglifa que facilita o processo de inoculação de veneno e (iii) as diferenças de comportamentos agonísticos.

1.2 Acidentes com Serpentes

Envenenamentos com participação de serpentes constituem um problema de saúde pública mundial afetando, especialmente, os países de regiões tropicais, como África, Ásia, Oceania e América Latina (GUTIÉRREZ; THEAKSTON; WARRELL, 2006; ALIROL et al., 2010; GUTIÉRREZ et al., 2010; HIFUMI et al., 2015). Em 2009, os acidentes com serpentes foram inseridos na lista de Condições Negligenciadas da Organização Mundial da Saúde (OMS). Estima-se que cerca de 2,5 milhões de pessoas/ano são acometidas por acidentes ofídicos, o que resulta em aproximadamente 100 mil mortes envolvendo serpentes peçonhentas, além de 250 mil pacientes com sequelas (KASTURIRATNE et al., 2008; HARRISON et al., 2009; WARRELL, 2010).

Apesar do alto impacto desta condição, a mesma tem recebido pouca atenção dos órgãos nacionais e internacionais de saúde, fundações, agências de pesquisa e empresas farmacêuticas, (GUTIÉRREZ; THEAKSTON; WARRELL, 2006; WILLIAMS et al., 2010), justificando os estudos dos venenos desses animais (WARRELL, 2010).

No Brasil, a epidemiologia destes acidentes aponta para um perfil que se mantém inalterado há mais de 100 anos (BOCHNER; STRUCHINER, 2003), no qual as serpentes pertencentes à família Viperidae participam de aproximadamente 99,6% dos acidentes ofídicos registrados em território nacional, subdivididos da seguinte maneira: (i) gêneros botrópicos (*Bothrops* e *Bothrocophias* – Vulgarmente denominadas jararacas) correspondendo a 90,5%; seguidos pelas (ii) *Crotalus* (popularmente chamadas de cascáveis) com 7,7% e (iii) *Lachesis* (surucucus) com 1,4% dos acidentes notificados. Com menor representatividade, as serpentes dos gêneros *Micrurus* e *Leptomicrurus* (corais verdadeiras), ambos pertencentes à família Elapidae, totalizando

os 0,4% remanescentes (CHIPPAUX, 1998; WARRELL, 2002, 2010; CARDOSO et al., 2003).

Tais acidentes ocorrem com maior frequência no início e no final do ano, envolvendo trabalhadores rurais do sexo masculino, em faixa etária produtiva (15 a 49 anos), atingindo principalmente os membros inferiores (CARDOSO et al., 2003; DE AZEVEDO-MARQUES et al., 2003), e geralmente estão relacionados ao não uso de equipamentos de proteção individual no momento de trabalho. Situação semelhante é observada também em outros continentes (CHIPPAUX, 1998; 2011; 2012; GUTIÉRREZ et al., 2010).

A frequência e a gravidade destes acidentes acarretam sérios problemas à saúde humana, e no Brasil, em cumprimento à legislação específica (BRASIL, 2010), todos os casos de acidentes ofídicos são de notificação compulsória ao Ministério e as Secretarias Estaduais de Saúde (CARDOSO et al., 2003).

De acordo com os dados do Sinan Net (Sistema de Informação de Agravos de Notificação), até o início do mês de Agosto de 2015, no Brasil foram registrados 7.731 casos de acidentes botrópicos, sendo destes, 155 ocorrentes em Rondônia (Tabela 1) (BRASIL, 2015). Pode ainda haver subnotificação dos casos, talvez quantidade de acidentes seja superior aos dados registrados.

Tabela 1: Notificações de casos de acidentes ofídicos por Tipo Serpente.

Até Agosto de 2015	<i>Bothrops</i>	<i>Crotalus</i>	<i>Lachesis</i>	<i>Micrurus</i>	Não Peçonhenta
Brasil	7.731	839	288	75	511
Rondônia	155	3	6	2	10

Número de casos de acidentes ofídicos registrados na plataforma SinanWeb no período de janeiro à agosto de 2015 (BRASIL, 2015).

Em Rondônia, os dados epidemiológicos se mantêm em consonância com os demais estados do Brasil, mostrando que 95,6% de acidentes tem participação de serpentes do gênero *Bothrops*, seguido por 2,2% de *Lachesis* e o mesmo percentual para *Micrurus* (RORIZ et al., 2015), sofrendo modificações no que concerne às serpentes do gênero *Crotalus* que possuem descrição apenas para a região do cone sul do estado (BERNARDE et al., 2012), não havendo registros de acidentes no período de estudo.

1.3 Venenos de Serpentes

Organismos venenosos e peçonhentos têm gerado tanto fascínio quanto repugnância desde o início da história registrada (NELSEN et al., 2013; WEINSTEIN, 2015).

Os venenos de serpentes atraem a atenção há anos e suas ações resultam da interação de vários fatores, levando a um produto biológico eficiente e de natureza complexa, que tem como principais objetivos a imobilização, a morte e a promoção da digestão inicial de presas. Além disso, apresentam um enorme potencial para prospecção de moléculas com aplicação farmacológica (VONK et al., 2011).

Esses venenos são formados por uma combinação de compostos orgânicos e inorgânicos. Geralmente, os componentes inorgânicos agem como cofatores dos compostos orgânicos. Estes, por sua vez, podem ser subdivididos em carboidratos, lipídios, nucleotídeos e principalmente peptídeos e proteínas, sendo que os dois últimos perfazem mais de 90% do peso seco do material presente nos venenos de serpentes. Dentre esses componentes destacam-se as: (i) neurotoxinas, as mais estudadas são as α -neurotoxinas, capazes de bloquear reversivelmente a transmissão nervosa através da ligação competitiva aos receptores nicotínicos da acetilcolina; (ii) proteínas que afetam o sistema muscular, as miotoxinas: fosfolipases e metaloproteases e (iii) proteínas que afetam a coagulação sanguínea: desintegrinas e serinoproteases, destacam-se as do segundo grupo (MATSUI; FUJIMURA; TITANI, 2000; GUTIÉRREZ, 2002; KOH; ARMUGAM; JEYASEELAN, 2006). É importante ressaltar que a composição do veneno apresenta variações intra e interespecíficas, as quais estão relacionadas a fatores geográficos e/ou ontogenéticos (GUTIÉRREZ, 2002).

A maior parte das proteínas e polipeptídios que compõem os venenos de serpentes são monômeros. Alguns desses componentes possuem tendência de organizarem-se em complexos proteicos que, por sua vez, exibem níveis mais elevados de atividade farmacológica quando comparados aos componentes individuais. Esses agrupamentos proteicos são formados por interações covalente e/ou não covalentes e desempenham importantes papéis patofisiológicos durante o envenenamento (DOLEY; KINI, 2009).

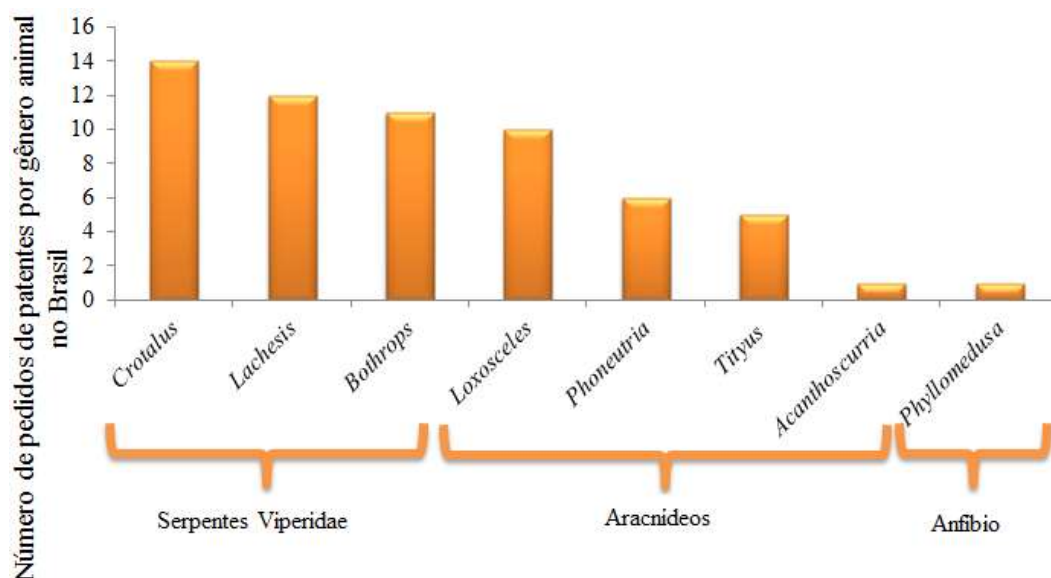
Devido às inúmeras propriedades bioquímicas, funcionais e estruturais, os venenos mostram-se úteis para o entendimento de diversos processos fisiológicos, bem como, para a prospecção de novas ferramentas biotecnológicas. Diversos trabalhos já foram publicados comprovando que os venenos de serpentes e/ou toxinas isoladas possuem efeitos terapêuticos (COMINETTI et al., 2004) contra o HIV (FENARD et al., 1999), o vírus da dengue e o da febre amarela (MULLER et al., 2012); reduzindo a viabilidade de *Leishmania* (TEMPONE et al., 2001; PASSERO et al., 2007), *Trypanosoma brucei* (MERKEL et al., 2007), *Plasmodium falciparum* (KAYANO et al., 2015); inibem o crescimento de *Escherichia coli* e *Candida albicans* (STÁBELI et al., 2006); de bactérias Gram-negativas (*Xanthomonas axonopodis pv passiflorae*) e Gram-positivas (*Streptococcus mutans*) (TOYAMA et al., 2006; SAMY et al., 2007, 2012; P. SAMY et al., 2011; SUDARSHAN; DHANANJAYA, 2014); contra células tumorais (CORREA et al., 2002; GOMES et al., 2010; BRADSHAW et al., 2014; CALDERON et al., 2014), dentre outras atividades (DOOLITTLE, 1988; KOH; ARMUGAM; JEYASEELAN, 2006; HODGSON; ISBISTER, 2009; VONK et al., 2011).

Embora um número representativo de proteínas de venenos animais tenham sido isolados e caracterizados de diferentes maneiras (PAL et al., 2002; YAMAZAKI; MORITA, 2004; KOH; ARMUGAM; JEYASEELAN, 2006; RAMOS; SELISTRE-DE-ARAUJO, 2006; DOLEY; KINI, 2009; ZULIANI et al., 2009; VONK et al., 2011; STÁBELI et al., 2012; FOX, 2013; SERRANO, 2013; ZAQUEO et al., 2014; KAYANO et al., 2015), o conhecimento em relação ao potencial microbicida destes ainda é reduzido. A cada pesquisa desenvolvida, novas possibilidades de utilização dessas proteínas são elucidadas, podendo resultar na elaboração de futuros medicamentos que induzam a menores efeitos colaterais e/ou alternativas promissoras para o tratamento de várias doenças negligenciadas, como a leishmanioses, Doença de Chagas, dentre outras.

Isolar os elementos que compõem o veneno está entre os requisitos essenciais para o esclarecimento dos mecanismos de ação dessas toxinas, auxiliando até mesmo na elucidação de antagonistas. De outra maneira, a compreensão estrutural desses pode permitir modificações na estrutura na tentativa de produção de agentes terapêuticos mais efetivos e específicos (PAL et al., 2002; REEKS; FRY; ALEWOOD, 2015).

Em todo o mundo há um número expressivo de pedidos de patentes envolvendo o isolamento de produtos a partir de toxinas animais. No Brasil, dentre os pedidos de patentes envolvendo esses bioprodutos, entre os anos 2000 a 2013, destacam-se os oriundos do veneno de serpentes da família Viperidae, com maior representatividade as serpentes do gênero *Crotalus*, seguidos por aracnídeos, principalmente *Loxosceles* (popularmente conhecidas como aranhas marrom) e, em menor número, anfíbios do gênero *Phyllomedusa* (Figura 2).

Figura 2: Solicitações de patentes brasileiras envolvendo o desenvolvimento de produtos a partir de toxinas animais.



Pedidos de patentes brasileiras envolvendo toxinas animais entre os anos 2000 a 2013. Adaptado de De Marco Almeida e Colaboradores (2015).

Dentre as patentes envolvendo o gênero *Crotalus*, destacam-se: drogas antimicrobianas, medicamentos para o tratamento do câncer, fármacos analgésicos, drogas para o tratamento da AIDS, do estrabismo, agentes anti-inflamatórios dentre outros. Pedidos de patente para produtos do gênero *Lachesis* envolvem principalmente preparações antioxidantes e antienvelhecimentos, formulações antimicrobianas, imunomoduladores, formulações para a reabsorção e a profilaxia de hemorragia em doenças oftálmicas vasculares, dentre outros. E com relação ao gênero *Bothrops*, há

pedidos que envolvem drogas para o tratamento de doenças degenerativas crônicas, moduladores de receptores de acetilcolina, anticoagulante, formulações hipotensivas, vasodilatadoras, trombolíticas e bactericidas (CALVETE; JUÁREZ; SANZ, 2007; NELSEN et al., 2013). Nos venenos de serpentes destacam-se proteínas com atividade enzimática sobre o sistema hemostático, dentre essas, as serinoproteases.

1.4 Serinoproteases

As serinoproteases encontram-se amplamente distribuídas na natureza, sendo descritas para vírus, células procarióticas e para organismos eucariotos. Participando de diversos processos, tais como: digestão, inflamação, diferenciação e proliferação celular (BARRETT; RAWLINGS, 2001; CASTRO et al., 2001; KINI, 2005).

São enzimas multifuncionais que possuem uma tríade catalítica característica com a presença dos resíduos de Histidina, Ácido aspártico e Serina (His⁵⁷, Asp¹⁰² e Ser¹⁹⁵)¹, onde as cadeias laterais destes aminoácidos estabilizam o sítio ativo da proteína por intermédio de pontes de hidrogênio. Neste ambiente, a serina interage com a histidina e, essa, com o aspartato; ambas por intermédio de pontes de hidrogênio. Dessa forma, o resíduo Ser atua como nucleófilo, o His como doador/aceptor de prótons e, o Asp como um indutor-eletronegativo (PRADNIWAT; ROJNUCKARIN, 2013). A serina é o principal aminoácido responsável pela atividade proteolítica da enzima (SERRANO; MAROUN, 2005; COSTA et al., 2010) e, em virtude disso, auxilia na nomenclatura da referida protease.

Além da tríade catalítica, as serinoproteases apresentam outras características em comum, sendo elas: (i) a presença de, em média, 235 resíduos de aminoácidos; (ii) cadeia única de aminoácidos; (iii) massa molecular de 28 à 60 kDa; (iv) região glicídica (com quantidade variável de carboidrato, o que corrobora as diferenças de massa molecular para as proteínas já descritas); (v) 12 cisteínas, que estabelecem 6 pontes dissulfeto² conferindo uma elevada estabilidade e proporcionando resistência às variações de pH e temperatura; (vi) atividade sobre substratos sintéticos específicos da

¹ Os números que seguem as siglas dos aminoácidos correspondem à frequente localização dos mesmos nas moléculas de serinoproteases, tomando como base a quimiotripsina.

² Frequentemente, as pontes dissulfeto ocorrem entre os pares 22-157, 42-58, 91-250, 136-201, 168-182 e 191-220 (cisteínas).

trombina; (vii) elevada similaridade, aproximadamente de 60 a 68% (CASTRO et al., 2004).

As famílias de serinoproteases são agrupadas de acordo com as similaridades estruturais e funcionais, dentre essas enzimas, as melhores caracterizadas pertencem ao grupo das tripsinas e quimiotripsinas (BARRETT; RAWLINGS, 2001; SERRANO; MAROUN, 2005).

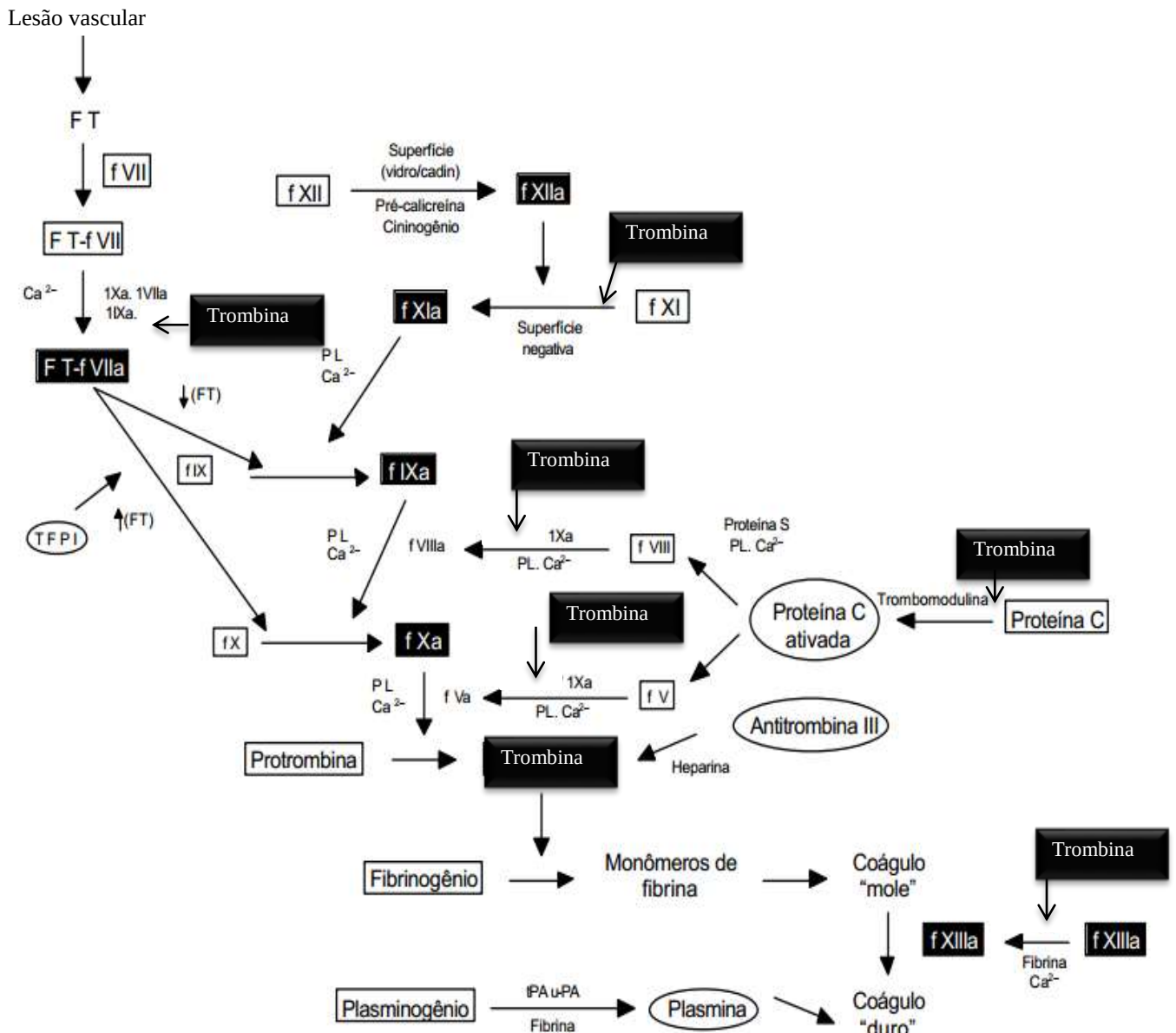
Em seres humanos, as enzimas dessa classe são sintetizadas como zimogênios³, que posteriormente, são ativadas por proteólise e inativadas por diferentes grupos de inibidores, particularmente as SERPINAS, com as quais formam complexos irreversíveis (BRAUD; BON; WISNER, 2000).

Uma serinoprotease clássica é a trombina, enzima multifuncional (Figura 3) que possui importante papel na hemostasia e na trombose de mamíferos e que tem por principal função a liberação de monômeros de fibrina, além disso, a trombina ativa vários fatores de coagulação, tais como os fatores V, VIII, XI e XIII, assim como as plaquetas, induzindo processos de coagulação. Por outro lado, quando complexada com a trombomodulina, ativa a proteína C, que por sua vez inibe a coagulação (BODE; TURK; KARSHIKOV, 1992). Em condições fisiológicas normais, as reações da cascata de coagulação induzem à produção equilibrada de trombina e coágulo de fibrina, em resposta à injúria vascular existente. Por outro lado, a perda do equilíbrio dinâmico das reações da coagulação tem, como consequência clínica, o aparecimento de distúrbios hemorrágicos ou trombóticos (FRANCO, 2001).

Uma vez que a trombina apresenta elevada importância na manutenção da hemostasia, as serinoproteases com atividades similares às da mesma merecem elevada atenção das indústrias farmacêuticas.

³ Precursores inativos transformados em enzimas ativas através da ação de outras substâncias

Figura 3: Esquema da cascata da coagulação sanguínea.



Os zimogênios estão mostrados nas caixas brancas e os fatores ativados nas caixas em preto. Os fatores que não possuem atividade enzimática estão em negrito. Os fatores anticoagulantes (TFPI, proteína C ativada e antitrombina) e a plasmina estão mostrados nos círculos. Adaptado de (CIPRANDI et al., 2006).

1.5 Serinoproteases dos Venenos de Serpentes

Mais de 50 serinoproteases isoladas de venenos de serpentes já foram descritas, principalmente oriundas de representantes da família Viperidae. Estas enzimas são abundantes em venenos podendo chegar a constituir 20% do total das proteínas do veneno de algumas serpentes (SERRANO; MAROUN, 2005). O grupo de enzimas em questão destaca-se por estar entre as que causam alterações no sistema hemostático em caso de acidentes ofídicos, atuando de diferentes maneiras (MATSUI; FUJIMURA; TITANI, 2000; WHITE, 2005). Essas proteases apresentam menos de 40% de similaridade com a trombina endógena humana (MARKLAND, 1998) e pertencem à uma família de peptidases conhecidas como Tripsina S1 (LESK; FORDHAM, 1996; SILVA; DE-SIMONE, 2004). As serinoproteases do veneno de serpentes⁴ são conhecidas pela sigla SVSPs.

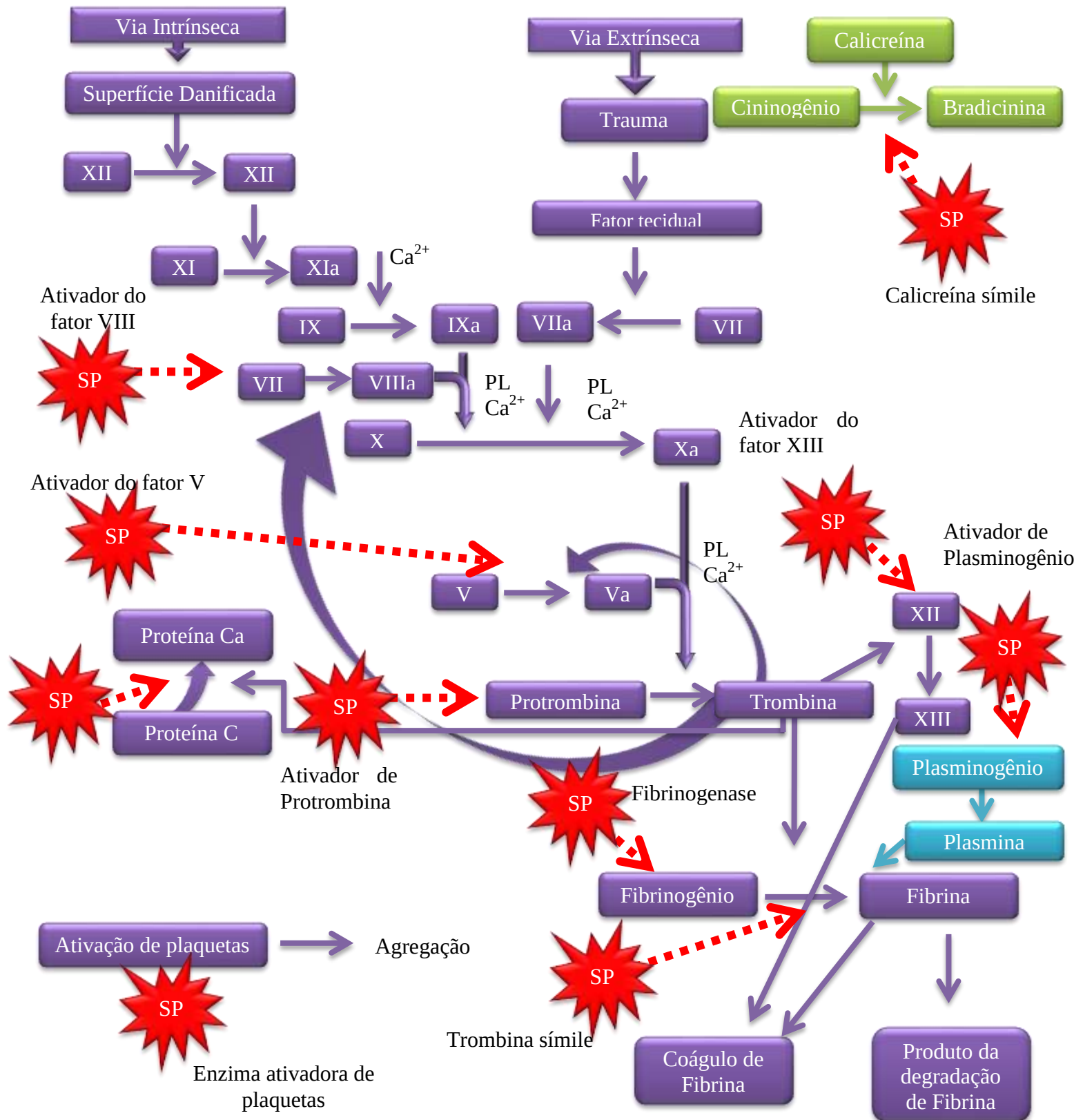
Apesar da semelhança estrutural compartilhada pelas serinoproteases, não se pode dizer o mesmo quanto à especificidade pelos substratos (DUFTON, 1990; ZELANIS et al., 2015). Já foram descritas SVSPs com habilidade em: (i) ativar os seguintes fatores da cascata de coagulação: V em Va (forma ativa), VIII em VIIIa; XIII em XIIIa que induz a formação de coágulos estáveis; (ii) ativar: plaquetas, plasminogênio, proteína C, protrombina; (iii) agir de maneira fibrinogenolítica; (iv) atuar de maneira análoga a calicreína e a trombina, sendo as do último grupo descritas como trombina-símile, conhecida por sua sigla SVTLEs – enzimas trombina-símile do veneno de serpentes⁵ (Figura 4).

⁴ Sigla do inglês “Snake Venom Serine Proteases”.

⁵ Sigla do inglês “Snake Venom Thrombin-Like Enzymes”.

INTRODUÇÃO

Figura 4: Local de ação das SVSPs na cascata de coagulação sanguínea.



Esquema de coagulação sanguínea/via fibrinolítica e agregação plaquetária. Em vermelho são mostrados os locais de ação das SVSPs Adaptado de (SERRANO, 2013).

1.6 Enzimas Trombina-símile

As SVTLEs apresentam semelhanças em suas ações proteolíticas, apresentando especificidade pela clivagem entre os aminoácidos Arginina-Glicina e homologia com as demais representantes do grupo. Essas enzimas são designadas como trombina-símile por mimetizam algumas funções da trombina (Figura 3 e Figura 4). As SVTLEs possuem capacidade de converter o fibrinogênio humano em um coágulo de fibrina, por intermédio da clivagem de fibrinopeptídeos A e/ou B (PIRKLE, 1998; CASTRO et al., 2004), o que ocasiona uma atividade coagulante “*in vitro*” (uma vez que o coágulo formado não sofrerá ação de substâncias endógenas) já “*in vivo*”, essas enzimas deflagram processos de incoagulabilidade sanguínea.

A incoagulabilidade, umas das mais importantes alterações hemostáticas evidenciadas no quadro de acidentes por serpentes peçonhentas (KINI, 2005), ocorre porque os monômeros de fibrina formados pelas trombinas-símile não formam coágulos semelhantes aos gerados pela trombina. Devido à restrita proteólise, os fibrinopeptídeos instáveis, não convertem o fator XIII da cascata de coagulação em XIIIa⁶ e, sofrem polimerização limitada, não sendo estabilizados. Por esse motivo, sofrem fácil dissolução pelo organismo do animal (BRAUD; BON; WISNER, 2000). Existem algumas SVTLEs que pelo fato de ativarem o Fator XIII são exceções, sendo estas até o momento descritas para os gêneros *Agkistrodon*, *Bitis*, *Bothrops*, *Cerastes* e *Trimeresurus* (PIRKLE, 1998; ZAQUEO et al., 2014). Sob ação destas SVTLEs há a formação de redes de fibrina estáveis que podem ocasionar processos de coagulação “*in vivo*”.

As trombina-símile também podem mimetizar os processos de ativação de outros fatores da cascata de coagulação; interferências nas atividades de agregação plaquetária, possivelmente de maneira distinta das trombinas de mamíferos (MATSUI; FUJIMURA; TITANI, 2000), ativação de plasminogênio, proteína C, fatores V e X, fibrinólise (Figura 4) (BRAUD; BON; WISNER, 2000; HUNG; CHIOU, 2001).

As SVTLEs são classificadas de acordo com a prioridade de degradação das cadeias de uma importante proteína hexamérica envolvida com os processos de coagulação, o fibrinogênio (que possui 2 cadeias de cada tipo: α , β e γ). Quando a

⁶ Forma ativada do fator XIII da cascata de coagulação, que catalisa a união dos monômeros de fibrina.

preferência proteolítica se dá pela cadeia α são denominadas SVTLE-A; SVTLE-B quando degradam preferencialmente a cadeia β e SVTLE-AB àquelas que agem sobre as cadeias α e β do fibrinogênio (CASTRO et al., 2004). Poucos relatos foram publicados com relação às serinoproteases que atuam exclusivamente sobre a cadeia γ (MARKLAND, 1998). Este comportamento foi evidenciado após longo período de exposição e elevada concentração de enzima (LOBO DE ARAÚJO; DONATO; BON, 1998; SELISTRE; GIGLIO, 1987; VILCA-QUISPE et al., 2010).

No processo de envenenamento ofídico, as serinoproteases contribuem no quadro patológico observado, no entanto, isoladamente não são consideradas letais.

1.7 *Bothrops pirajai*

A espécie *B. pirajai* (Figura 5) vulgarmente conhecida como jararacuçu-da-Bahia, possui distribuição geográfica restrita ao sudoeste da Bahia, sendo uma espécie de difícil encontro. Em virtude dos desmatamentos para plantações de cacau ocorrentes na região, a *B. pirajai* encontra-se na lista de espécies ameaçadas de extinção (MACHADO, 2005).

Figura 5: *Bothrops pirajai*



A imagem demonstra um indivíduo macho, juvenil. A diagnose pode ser realizada pela presença do padrão dos desenhos na região dorsal do animal. (Foto gentilmente cedida por Marco Antônio de Freitas, Amargosa – Bahia, 2008).

Com relação aos estudos com o veneno de *B. pirajai*, os seguintes trabalhos encontram-se disponíveis:

✓ Diferentes Fosfolipases A₂ (FLA₂) (MP-III 4R D49, PirTX-I, PirTX-II e PirTX-III e fosfolipase A₂-Lys49) foram descritas (MANCUSO et al., 1995a, 1995b; CANDURI et al., 1998; DE AZEVEDO et al., 1998; LEE et al., 1998; TOYAMA et al., 1999, 2000; WEN-HWA et al., 1999; SOARES et al., 2001, 2003; RIGDEN et al., 2003; DOS SANTOS et al., 2010; TEIXEIRA et al., 2011). As Piratoxinas (PrTX) I e III, por exemplo, são FLA₂ homólogas que induzem mionecrose e apresentam atividade

bactericida contra *Escherichia coli* (SOARES et al., 2001). A estrutura terciária da Piratoxina-I foi elucidada por cristalografia e difração de raio-X (CANDURI et al., 1998; DE AZEVEDO et al., 1998). No mesmo ano, a Piratoxina-II foi cristalizada e estudos de difração de raio-X foram realizados (LEE et al., 1998) e, no ano seguinte, a Piratoxina-II foi cristalografada (WEN-HWA et al., 1999). Treze anos depois de isolada, Dos Santos e colaboradores (2011) testaram a influência do ácido rosmarínico sobre as atividades da PrTX-I demonstrando que o mesmo foi hábil em reduzir drasticamente o dano muscular e o bloqueio neuromuscular exercida por essa FLA₂ (DOS SANTOS et al., 2011).

✓ Izidoro e colaboradores (2006) descreveram o isolamento da primeira L-aminoácido oxidase (LAAO), denominada BpirLAAO-I, uma proteína homodimérica ácida (IZIDORO et al., 2006). Em 2013, Burin e colaboradores demonstraram que a mesma foi capaz de induzir de maneira dose-dependente, a apoptose das linhagens de células leucêmicas HL-60 e HL-60 BCR-ABL, porém sem efeito citotóxico sobre as células mononucleares do sangue periférico (PBMC) e em BCR-ABL (+) (PBMC) e em BCR-ABL (+) (BURIN et al., 2013).

✓ Em 2005 a BPL, uma Lectina tipo C com especificidade para galactose, foi isolada a partir do veneno de *B. pirajai* e sua nefrotoxicidade, bem como, a do veneno foram testadas, demonstrando serem capazes de ocasionar os mesmos efeitos renais, provavelmente pela liberação de mediadores inflamatórios (HAVT et al., 2005).

✓ A primeira metaloprotease (BpirMP-I) foi descrita em 2013. Trata-se de uma proteína que apresenta atividade proteolítica sobre azocaseína, possuindo fraca atividade hemorrágica. É uma enzima fibrino(geno)lítica com ação trombolítica, tendo suas atividades reduzidas por agentes quelantes e redutores (BERNARDES et al., 2013).

✓ Três serinoproteases BpirSP27; BpirSP41 (MENALDO et al., 2012) e BpirSP-39 (ZAQUEO et al., 2014). Os efeitos das duas primeiras enzimas sobre o sistema complemento humano foram avaliados demonstrando um reduzido efeito inflamatório (MENALDO et al., 2013).

✓ Com relação à serinoprotease isolada por Zaqueo e colaboradores (2014), a presente tese apresenta sua estrutura primária, bem como, traz informações que tangem à estrutura terciária obtida por modelagem por homologia.

1.8 *Bothrops brazili*

A espécie *Bothrops brazili* (Figura 6) é uma serpente de porte mediano, podendo atingir cerca de 1,4 metros. Apresenta pupilas verticais, dentição solenóglifa. Apresenta padrão de coloração com fundo cinza-claro-avermelhada, com trapézios pretos bem marcados e nítidos. Possui corpo robusto e hábitos terrestre, noturno, alimentando-se principalmente de roedores. Sua distribuição geográfica compreende toda bacia amazônica, existindo poucos exemplares em coleção, além das florestas equatoriais do sul da Colômbia, leste do Peru, leste do Equador, sul e leste da Venezuela, Guiana, Guiana Francesa, Suriname, norte da Bolívia e Brasil (PIZZATTO; ALMEIDA-SANTOS; MARQUES, AUGUSTO, 2006).

Figura 6: Espécime adulto de *Bothrops brazili*.



As imagens deixam evidente a coloração da região dorsal do espécime, característica da espécie ((a) Foto: Phillipe J. R. Kok), bem como, a coloração da íris ((b) Foto: ©2008 German Chavez).

É uma serpente rara e, comparada a outras dos gêneros botrópicos, pouco a respeito do seu veneno encontra-se descrito, restringindo-se à:

- ✓ Miotoxinas denominadas MTX-I, MTX-II isoladas por Costa e colaboradores que demonstraram ainda dois peptídeos C-terminais com efeito citotóxico sobre a células JURKAT (linhagem tumoral), além de ação microbicida sobre bactérias,

leveduras e protozoários (*L. amazonensis* e *L. braziliensis*) (COSTA et al., 2008). Após um ano, Huancahuire-Vega e colaboradores isolaram as fosfolipases BbTX-II K49 e BbTX-III N49 com atividade neurotóxica (HUANCAHUIRE-VEGA et al., 2009). Fernandes e colaboradores cristalizaram e elucidaram, por difração de raio X, as estruturas das miotoxinas MTX-II, BbTX-II e BbTX-III (FERNANDES et al., 2013). Além disso, foi demonstrado que os soros antibotrópicos comerciais apresentam baixa eficácia para efeitos miotóxicos locais ocasionados pelo veneno da serpente *B. brazili* (MUNIZ et al., 2000).

✓ Uma LAAO, assim como o veneno de *B. brazili*, apresenta ação citotóxica sobre as culturas de *Staphylococcus aureus*, *Vibrio cholerae* e *Streptococcus faecalis* (SOLIS et al., 1999).

✓ Uma hemorragina (Islada), isolada e caracterizada por Isla e colaboradores (2003), que demonstraram que o soro botrópico polivalente utilizado em Lima (Perú) foi capaz de neutralizar o veneno bruto, porém não apresentou ação sobre a proteína hemorrágica purificada.

✓ E uma metaloprotease, a BbrzMP-I, com atividade antiplasmodial (KAYANO et al., 2015).

É válido destacar que, até o presente momento, nenhuma serinoprotease havia sido descrita para o veneno da serpente *Bothrops brazili*.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Caracterizar estruturalmente a BpirSP-39, previamente isolada do veneno de *B. pirajai* e isolar e caracterizar, bioquímica e funcionalmente, uma serinoprotease do veneno da serpente *Bothrops brazili*.

2.2 Específicos

- ✓ Elucidar as estruturas, primária e terciária, da BpirSP-39;
- ✓ Isolar a serinoprotease do veneno da serpente *B. brazili*;
- ✓ Determinar as massas moleculares: relativa e absoluta;
- ✓ Elucidar a sequência primária de aminoácidos da nova serinoprotease;
- ✓ Determinar o modelo tridimensional da mesma;
- ✓ Avaliar a atividade proteolítica sobre fibrinogênio bovino;
- ✓ Mensurar a capacidade da proteína em degradar fibrina e trombos;
- ✓ Caracterizar a atividade proteolítica da proteína frente a diferentes substratos, bem como, a ação de inibidores sobre essas capacidades.
- ✓ Determinar a influência da variação do pH e da temperatura sobre ação enzimática;
- ✓ Avaliar a influência da enzima sobre agregação plaquetária;
- ✓ Verificar as ações citotóxicas da nova enzima isolada frente a diferentes microrganismos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Determinação da Estrutura Primária da BpirSP-39

3.1.1 Redução e Alquilação

A serinoprotease, previamente obtida conforme descrito por Zaqueo e colaboradores (2014), foi reduzida por tratamento com solução de ditioneitol (DTT) 20 mM em bicarbonato de amônio 50 mM, por período de 1 hora a 30°C. Para alquilação dos grupos tiol dos resíduos de cisteína, a proteína reduzida foi incubada com iodoacetamida 150 mM em bicarbonato de amônio 50 mM por 1 hora, a 30°C e ao abrigo da luz.

3.1.2 Digestão da Proteína

A amostra foi previamente reduzida e alquilada, conforme descrito anteriormente, foi submetida à digestão com uso de tripsina modificada (*Sequencing grade modified*®), por período de 18 horas, a 37°C e ao abrigo da luz. O excesso de reagentes e eletrólitos foi retirado com uso de resina C-18 (*Proxeon Stage tip*®) e eluídas com acetonitrila 70 %/Ácido trifluoroacético (TFA) 0,1 % (v/v). As amostras foram liofilizadas, ressolubilizadas em ácido fórmico 1 % (m/v) (KAYANO et al., 2015).

3.1.3 Sequenciamento proteico

A análise espectrométrica foi realizada em um *Nano Acquity* (Waters) *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC) acoplado a um espectrômetro *Orbitrap Velos* (Thermo Scientific). Uma alíquota do digesto trípico foi injetado e separado em coluna C18 (75 µm Oi, 10 cm, nano Acquity, 1,7 µm BEH column, Waters). Os peptídeos foram eluídos com gradiente: 1 a 40 % B em 20 minutos, seguido por gradiente de 40 % a 60 % de B em 5 minutos sob fluxo de 250 nL/minuto. A solução A consistia de ácido fórmico 0,1 % (v/v) em água e a solução B de ácido fórmico 0,1 % (v/v) em acetonitrila. A massa dos peptídeos (m/z: 300 – 1700) foram medidos no *Orbitrap* à resolução de 60.000 a m/z 400. Os peptídeos mais abundantes foram selecionados e fragmentados em célula de colisão HCD com energia de colisão

MATERIAL E MÉTODOS

normalizada (NCE) de 40 % com nitrogênio sendo usado como gás de colisão. Os fragmentos foram detectados no *Orbitrap* com resolução de 7500FWHM a 400 m/z. Os dados foram coletados com *Thermo Xcalibur* (v.2.1.0.1140) (KAYANO et al., 2015).

3.2 Modelagem molecular e determinação dos sítios de N-glicosilação

O modelo estrutural da BpirSP-39 foi gerado utilizando o método usando o software HHpred, disponível em <<http://protevo.eb.tuebingen.mpg.de/toolkit>> (SÖDING; BIEGERT; LUPAS, 2005). Inicialmente, foram gerados 112 alinhamentos obtidos utilizando o modo global. Os *Gaps* resultantes do sequenciamento por LC-MS/MS foram preenchidos por homologia com uma serinoprotease isolada do veneno de *Agkistrodon halys* (PDB ID: 4E7N) (selecionado para construir o modelo da BpirSP-39). Os dois primeiros *Gaps* foram confirmados por degradação de Edman (EDMAN, 1950) (dados não mostrados) e os terceiro e quarto são justificados pela grande quantidade de lisina que gera pequenos fragmentos que não foram detectados por LC-MS/MS. O modelo escolhido foi o que apresentou melhor pontuação do alinhamento (286,73) e, a identidade entre a sequência da BpirSP-39 e o modelo foi de 67%. Potenciais sítios de N-glicosilação de serinoprotease foram previstos utilizando NetNGlyc v.1.0, disponível em <http://www.cbs.dtu.dk/> (BLOM et al., 2004).

3.2.1 Dinâmica molecular

Após a obtenção do modelo tridimensional inicial da BpirSP-39, foi realizada uma simulação de dinâmica molecular (DM) com o intuito de refinar a estrutura obtida. As simulações de DM foram realizadas empregando o programa GROMACS 4.5.4 (BERENDSEN; VAN DER SPOEL; VANDRUNEN, 1995; LINDAHL; HESS; VAN DER SPOEL, 2001; VAN DER SPOEL et al., 2005) em um processador Intel Xeon com 8GB de RAM, operando no sistema operacional Linux CentOS 5.5. Foi empregado o modelo de solvatação explícita utilizando o modelo de água Single Point Charge (SPC) para representar as moléculas de água. Os estados de protonação dos grupos carregados foram ajustados de acordo com o pH 7,0 e contra-íons foram adicionados para neutralizar o sistema. O campo de força GROMOS (VAN GUNSTEREN et al., 1996), uma caixa periódica cúbica com distância mínima de 1 nm entre todos os átomos da proteína e as paredes da caixa e pressão e temperatura constantes foram empregados

MATERIAL E MÉTODOS

para a realização das simulações de DM. A partir da estrutura inicial da proteína com as configurações mencionadas, foi realizada uma minimização de energia utilizando o algoritmo *steepest descent*. A seguir, foi realizada uma dinâmica de 10 ps mantendo as posições dos átomos da cadeia principal restritas à 298 K para relaxar o sistema. Uma simulação de DM de 10 ns, com todos os átomos livres, foi realizada para avaliar a estabilidade da estrutura. Durante a simulação, temperatura e pressão (1,0 bar) e foram mantidas por um banho externo para controlar o calor e a pressão isotrópica (CHOTHIA; LESK, 1986; HOLM; SANDER, 1993).

3.2.2 A análise estrutural e validação

O modelo gerado após a simulação DM foi verificado por diversas análises estruturais GROMACS 4.5.4, bem como, o mapa de Ramachandran gerado pelo servidor Rampage (LOVELL et al., 2003). O perfil de pseudo-energia dos modelos foi analisado com Verify 3D disponível em <http://nihserver.mbi.ucla.edu/Verify_3D> e prosa-web (SIPPL, 1993; WIEDERSTEIN; SIPPL, 2007).

3.3 Isolamento da BbrzSP-32

A enzima de interesse foi isolada do veneno de *B. brazili* por duas etapas cromatográficas: (i) afinidade em Benzamidina Sepharose e (ii) Fase reversa em coluna C-2/C-18. Aproximadamente 150 mg de veneno de *Bothrops brazili* foi solubilizado em 1 mL de Tris-HCl 20 mM pH 8,1 (Solução I), sendo após, clarificado por centrifugação a $9,3 \times 10^3$ g por 10 minutos, à temperatura ambiente. Depois de centrifugado, o sobrenadante foi aplicado em coluna de Benzamidina (70cm x 0,9cm) (GE), pré-equilibrada com o mesmo tampão de dissolução da amostra. A eluição das proteínas ocorreu após lavagens sucessivas da resina com a Solução I, seguida pela Solução II (Tris-HCl 20 mM pH 8,1 acrescido de 1 M de NaCl) em seguida, a amostra de interesse foi eluída com a aplicação da Solução III (Glicina 20 mM pH 3,0). A cromatografia foi desenvolvida sob fluxo de 1 mL/min, as frações coletadas manualmente e concentradas por liofilização. As frações foram então submetidas a ensaio coagulante, como descrito em 3.4.12. As amostras com atividade coagulante, resultante da cromatografia em coluna de afinidade, após dessalinização, foram solubilizadas em 0,1% de ácido trifluoroacético (TFA) e recromatografadas em coluna de Fase Reversa C2/C18 (10mm

MATERIAL E MÉTODOS

x 4,6 mm, 3 μ m, 120Å) (GE), previamente equilibrada com TFA 0,1%. A eluição das amostras foi realizada em gradiente linear de 20 a 50% de acetonitrila 99,9% acrescido de TFA 0,1%. As frações foram eluídas a um fluxo constante de 0,750 mL/minuto. As corridas cromatográficas foram realizadas em equipamento de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (Akta *Purifier*10, GE) e a eluição das frações foi monitorada em 280 nm. As frações foram liofilizadas e estocadas a -20°C. Após uma alíquota ser ressuspensa, foi constatado que suas atividades, coagulante e sobre substrato BAPNA, foram preservadas (ZAQUEO et al., 2014).

3.4 Obtenção da Massa Relativa

A massa molecular relativa (M_r) da proteína foi estimada por eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), em sistema de pH descontinuo, com 12,5% de poliacrilamida (LAEMMLI, 1970). A proteína (20 μ g) foi desnaturada por aquecimento (100 °C por 5 minutos) na presença do reagente desnaturante β -mercaptoetanol e SDS (detergente aniônico). O padrão de massa molecular utilizado foi o V849A (PROMEGA). As amostras foram aplicadas em gel (8,6 cm X 6,7cm) e separada sob tensão constante de 150V por 75 minutos. A corrida eletroforética foi realizada em equipamento *Electrophoresis Power Supply* – EPS610 (*General Electric*). Posteriormente, o gel foi corado com *Coomassie Blue R-250* a 0,25% em ácido acético, etanol, água destilada na proporção de 1:5:5 (v/v/v), durante 20 minutos sob agitação. A descoloração do gel foi feita por imersão em solução de etanol, ácido acético, água destilada na proporção de 1:2:20 (v/v/v), durante 3 horas. Três trocas da solução foram efetuadas durante este período. A M_r foi determinada pela distância de migração da proteína comparada aos padrões moleculares.

3.5 Espectrometria de Massa

Para a determinação da massa molecular e controle de pureza da serinoprotease, foi realizada espectrometria de massa por dessorção assistida, pela ionização a laser da matriz, com dois analisadores TOF (AXIMA TOF-TOF- *Shimadzu Biotech*).

Para isso, 100 ng de proteína liofilizada foi solubilizada em 1 μ L de solução de ácido trifluoroacético (TFA) 0,1% e homogeneizada com 3 μ L de matriz de ionização (solução saturada de ácido sinapínico em TFA 0,05 % com acetonitrila 50% em uma

MATERIAL E MÉTODOS

proporção de 1:1, v/v), sendo então, 1µL dessa mistura aplicado na placa de amostras do aparelho. Após a co-cristalização da amostra e matriz na superfície da placa, esta foi levada à câmara de vácuo do aparelho AXIMA TOF² e após as devidas calibrações as amostras foram analisadas. As análises foram operadas em modo linear e o espectro de massa foi obtido pela média dos pulsos de laser. O experimento foi realizado em triplicata e seguindo os manuais do fabricante.

3.6 Sequenciamento N-terminal

A sequência de aminoácidos da porção N-terminal foi obtida por degradação de Edman em sequenciador automatizado em aparelho PPSQ-33A (*Shimadzu Biotech*), seguindo recomendações do fabricante.

A sequência foi comparada por alinhamentos múltiplos utilizando o BLASTP on-line (Básico Local Alignment Search Tool) programa do Centro Nacional de Informações sobre Biotecnologia (www.ncbi.nlm.nih.gov). Vários alinhamentos de sequências homólogas foram realizados utilizando COBALT (Alinhamento múltiplo à base de restrição; NCBI) (EDMAN, 1950). O resultado foi expresso em uma tabela com o nome das serpentes, seguida pelas serinoproteases, os alinhamentos das sequências e a identidade apresentadas entre elas.

3.6.1 Determinação da estrutura primária

Foi realizada conforme descrito nos subitens 3.1.1 e 3.1.2.

3.7 Determinação do Modelo Tridimensional

Para investigar as características estruturais da BbrzSP-32 foi realizada modelagem por homologia, utilizando como molde a estrutura de cristal da AhV_TL-I, uma serinoprotease glicosilada isolada da serpente *Agkistrodon halys* (código PDB: 4E7N) com uma resolução de 1.75Å (ZENG et al., 2013). Para a busca e recuperação da estrutura modelo usando *Protein Blast* (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) (ALTSCHUL et al., 1990) e *Protein Data Bank* (PDB) (<http://www.pdb.org>) [Accessed 06 Feb 2015]. Os alinhamentos de sequências foram realizadas usando os softwares MODELLER

MATERIAL E MÉTODOS

v9.10 (SALI; BLUNDELL, 1993) e ClustalW (THOMPSON; HIGGINS; GIBSON, 1994). A construção do modelo foi realizada em MODELLER v9.10. Um total de 1000 modelos foram gerados e o modelo final foi selecionado com base nas pontuações DOPE mais baixas calculados pelo software MODELLER. A qualidade química estéreo global do modelo final para BbrzSP-32 foi avaliada pelo PROCHECK (LASKOWSKI et al., 1993). A visualização interativa e análise comparativa das estruturas moleculares foram realizadas em visualizador Swiss-PDB (GUEx; PEITSCH, 1997) e a estrutura das imagens foram realizadas com *Persistence of Vision Raytracer* (POV-ray) 3.62 (<http://www.povray.org>).

3.8 Atividade Fibrinogenolítica (*in vitro*)

Foi determinada segundo metodologia descrita por Rodrigues e colaboradores (2000) com modificações, no qual, as amostras de 50 µL de solução de fibrinogênio bovino (10 mg/mL Tampão fosfato-salino - PBS pH 8,0) foram incubadas com 5,0 µg de enzima a 37 °C por (5, 10, 30 e 60 minutos) e PBS como controle. A reação foi interrompida pela adição de 25 µL de tampão TRIS-HCl 0,05 M, pH 8,0 contendo 10 % (v/v) 2-mercaptoetanol, 2 % de SDS (v/v) e 0,05 % azul de bromofenol (m/v) seguida por incubação por 12 horas. As amostras foram aplicadas em gel (8,6 cm X 6,7cm) e separada sob tensão constante de 150V por 75 minutos. A corrida eletroforética foi realizada em equipamento *Electrophoresis Power Supply* – EPS610 (General Electric). Posteriormente, o gel foi corado com *Coomassie Blue* R-250 a 0,25% em ácido acético, etanol, água destilada na proporção de 1:5:5 (v/v/v), durante 20 minutos sob agitação. A descoloração do gel foi feita por imersão em solução de etanol, ácido acético, água destilada na proporção de 1:2:20 (v/v/v), durante 3 horas. Duas trocas desta solução foram efetuadas durante este período (RODRIGUES et al., 2000).

3.9 Atividade Fibrinolítica

O ensaio foi realizado por meio da copolimerização de fibrinogênio bovino (0,3%) e agarose (0,95%), todas as soluções preparadas em tampão barbital (CaCl₂ 1,66 mM, MgCl₂ 0,68 mM, e NaCl 94 mM) 50 mM pH 7,8. O ensaio foi preparado para um volume final de 10 mL. A solução de agarose foi aquecida até a formação de um colóide transparente e reservada até seu resfriamento à aproximadamente 40 °C, quando então,

MATERIAL E MÉTODOS

foi adicionado à solução de fibrinogênio 1:1 (v/v). À essa mistura foi adicionado 100 µg de trombina (1 µg/µL) e vertida em placa de Petri. Após 30 minutos a 4 °C foram feitos orifícios para a aplicação das amostras nas concentrações desejadas (1, 2, 4,8, 16 e 32 µg de BbrzSP-32) ajustadas para um volume final de 30 µL de água MilliQ. A análise foi realizada visualmente e quantificada pelos halos de degradação da rede de fibrina preestabelecida (em cm), comparados com o controle negativo (água milliQ) e positivo (40 µg de veneno de *B. brazili*) (LEITÃO; POLIZELLO; ROTHSCILD, 2000).

3.10 Atividade Trombolítica

Para a avaliação da atividade trombolítica o sangue humano foi coletado de doadores sadios, em conformidade com a autorização CAAE: 14204413.5.0000.0011 (anexo), na ausência de anticoagulante. Para o ensaio, em placas de 24 poços, coágulos sanguíneos foram obtidos por meio da incubação de 500 µL de sangue por uma hora e em temperatura ambiente. Após este período, os coágulos foram incubados por 24 e 48 horas a 37 °C com diferentes quantidades de BbrzSP-32 (25, 50 e 100 µg em 300 µL), veneno de *B. brazili* (50 µg/300 µL) e água MilliQ (300 µL) (amostras; controle positivo e negativo, respectivamente) (PRASAD et al., 2006). Decorrido o período de incubação, o coágulo resistente foi retirado e o volume resultante foi mensurado em volume (mL). Os dados foram expressos como média ± desvio-padrão de três experimentos independentes. Decorrido o período de incubação, o coágulo resistente foi retirado, o volume resultante foi mensurado e o gráfico expresso em volume.

3.11 Ensaio gelatinolítico

Foi realizado conforme descrito por Cominetti e colaboradores (2007), o gel de poliacrilamida a 12,5% foi confeccionado com 0,3% de gelatina copolimerizada ao mesmo. A amostra de serinoprotease foi preparada em condições desnaturante e não redutoras, aplicada em gel (8,6 cm X 6,7 cm) e separada sob tensão constante de 150V por 75 minutos. A corrida eletroforética foi realizada em equipamento *Electrophoresis Power Supply – EPS610 (General Electric)*. Posteriormente, o gel foi cuidadosamente lavado por duas vezes em solução de Triton X-100 a 0,5%, por períodos de 30 minutos para a remoção do SDS. O gel foi então incubado em tampão do substrato (Tris-HCl 50 mM pH 8,0 e CaCl₂ 5 mM), a 37°C durante 20 horas. Após o gel foi corado com

MATERIAL E MÉTODOS

Coomassie Blue R-250 a 0,25% em ácido acético, etanol, água destilada 1:5:5 (v/v/v), durante 20 minutos sob agitação. A descoloração do gel foi feita por imersão em solução de etanol, ácido acético, água destilada na proporção de 1:2:20 (v/v/v), durante 3 horas. Várias trocas desta solução foram efetuadas durante este período. O resultado foi expresso pela avaliação do halo de degradação evidenciado pela ausência de coloração (COMINETTI et al., 2007).

3.12 Efeito de Compostos Químicos sobre a Atividade Proteolítica

A capacidade da serinoprotease de *B. brazili* em hidrolisar substratos cromogênicos S-2238 (para enzimas trombina-símile) e S-2288 (para serinoprotease) (0,5 mM, concentração final) foi realizada em um leitor de microplacas Thermomax (*Molecular Devices*, EUA) monitorado a 405 nm durante 20 minutos a 37 °C. Os inibidores fluoreto de fenilmetilsulfonila (PMSF) 5 mM e 10 mM, benzamidina 1 mM e 3 mM, e ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) 5 mM ou 10 mM foram incubados durante 30 minutos à temperatura ambiente com veneno de *B. brazili* e a serinoprotease e, em seguida, a reação enzimática foi ensaiada com substratos cromogênicos S-2238 e S-2288. Os controles foram realizados por incubação do veneno *B. brazili* e da serinoprotease com Dimetilsulfóxido (DMSO) (1% v/v, concentração final) ou solução salina. Os dados foram expressos como média $\pm$ desvio-padrão de três experimentos independentes. Este experimento foi realizado em colaboração com o Prof. Dr. André L. Fuly da Universidade Federal Fluminense (DE ANDRADE MOURA et al., 2014).

3.13 Atividade Coagulante (Determinação da Dose Mínima Coagulante)

As atividades coagulantes do veneno de *Bothrops brazili* e da enzima purificada foram determinadas por incubação de diferentes concentrações (0,3-4,8 $\mu\text{g/mL}$) de veneno e da enzima purificada (0,6-9,6 $\mu\text{g/mL}$) com plasma humano citratado (doados pelo banco de sangue do Hospital Universitário Antônio Pedro, UFF), sendo o tempo de coagulação monitorado utilizando um Coagulômetro modelo Amelung KC4A (Labcon, Alemanha). As quantidades mínimas de veneno e da BbrzSP-32 ($\mu\text{g/mL}$) que coagularam o plasma em 60 segundos são consideradas como Dose Mínima Coagulante (DCM). Os dados foram expressos como média $\pm$ desvio-padrão de três experimentos

MATERIAL E MÉTODOS

independentes. Este experimento foi realizado em colaboração com o Prof. Dr. André L. Fuly da Universidade Federal Fluminense (DE ANDRADE MOURA et al., 2014).

3.14 Efeito de Compostos Químicos sobre a Atividade Coagulante

A inibição da atividade coagulante foi avaliada pela incubação da DCM do Veneno de *Bothrops brazili* e da SP isolada, durante 30 minutos à temperatura ambiente com as seguintes substâncias: benzamidina 5 mM e 10 mM; ou PMSF 1 mM e 3 mM (inibidores de serinoproteases); ou EDTA 5 mM e 10mM (inibidor de metaloprotease). Em seguida, a mistura foi adicionada ao plasma e o tempo de coagulação mensurado. Os controles foram realizados por incubação da protease ou veneno com DMSO ou uma solução salina, em vez de inibidores. Os dados foram expressos como média $\pm$ desvio-padrão de três experimentos independentes. Este experimento foi realizado em colaboração com o Prof. Dr. André L. Fuly da Universidade Federal Fluminense (DE ANDRADE MOURA et al., 2014).

3.15 Ensaio de Estabilidade frente à variação de pH

O estudo de estabilidade BbrzSP-32 foi analisado pela pré-incubação de 2 μ g de BbrzSP-32 durante 30 minutos à temperatura ambiente, com tampões de diferentes valores de pH (5,0 a 11,0) e, em seguida, a reação foi desencadeada pela adição de substrato cromogênico S-2238 em Tris-HCl 50 mM pH 8,0. A variação da atividade proteolítica foi mensurada e o resultado expresso em porcentagem de atividade sobre o substrato cromogênico S-2238 (para enzimas trombina-símile) por valor de pH. Os dados foram expressos como média $\pm$ desvio-padrão de três experimentos independentes. Este experimento foi realizado em colaboração com o Prof. Dr. André L. Fuly da Universidade Federal Fluminense seguindo a metodologia aplicada pelo laboratório (SANT' ANA et al., 2008).

3.16 Ensaio de Estabilidade Térmica

O teste de estabilidade térmica de BbrzSP-32 foi mensurado após a pré-incubação de 2 μ g de BbrzSP-32, diluída em tampão Tris-HCl 50 mM, pH 8,0, durante 30 minutos a valores que variam da temperatura de incubação (20, 30, 37, 40, 50, 60 e

MATERIAL E MÉTODOS

70 °C). A atividade amidolítica foi ensaiada em 500 µL de solução contendo 1% de Na-Benzoil-DL-arginil-p-nitroanilida (BApNA) em Tris-HCl 50 mM, pH 8,0, em temperatura ambiente. O produto da reação foi analisado a 405 nm, utilizando um valor de $8800\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ como coeficiente de extinção molar da p-nitroanilida. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima capaz de libertar 1 µmol de p-nitroanilida/min., correspondente ao aumento de 0,009 unidades de absorbância medidos a 405 nm. Os resultados foram expressos em porcentagem de atividade enzimática sobre o substrato cromogênico BApNA por temperatura de incubação e representam a média $\pm$ desvio-padrão de três experimentos independentes, seguindo os manuais do fabricante.

3.17 Ensaio de Agregação Plaquetária

A avaliação da atividade sobre plaquetas foi analisada de acordo com Fuly e colaboradores (2012) com algumas modificações. A agregação plaquetária foi monitorada turbidimetricamente utilizando Agregômetro (modelo Chrono Log 490 2D, Havertown, EUA) utilizando Plaquetas Lavadas (PL). As PL foram obtidas a partir de sangue total humano de doadores voluntários (CAAE: 14204413.5.0000.0011). Foram testadas diferentes concentrações de BbrzSP-32 incubadas com PL durante 5 minutos a 37 °C, sob agitação. Em seguida, a agregação de plaquetas foi desencadeada pela adição de colágeno (24 µg/mL). Os ensaios foram realizados a 37 °C em cubetas de vidro num volume final de 300 µL. Os dados foram expressos como média $\pm$ desvio-padrão de três experimentos independentes. Este experimento foi realizado em colaboração com o Prof. Dr. André L. Fuly da Universidade Federal Fluminense (DE ANDRADE MOURA et al., 2014).

3.18 Cultura de Parasitos

3.18.1 *Trypanosoma cruzi*

Para o ensaio antitripanossomas *in vitro*, foram utilizados *Trypanosoma cruzi*, transfectados com o gene de *E. coli* β -galactosidase (lacZ) gentilmente cedidas pelo Dr. F. Buckner do Instituto Conmemorativo Gorgas (Panamá). Os epimastigotas foram cultivados a 28°C em caldo de infusão de fígado de triptose (LIT) com 10% de soro

MATERIAL E MÉTODOS

fetal bovino (FBS), penicilina e estreptomicina, e colhidos durante a fase de crescimento exponencial.

3.18.2 *Leishmania infantum*

Para os estudos *in vitro* da atividade leishmanicida, foi usado *Leishmania infantum* (MCAN/ES/92/BCN83). Os parasitos no estágio promastigota foram cultivados a 28 °C em meio de Schneider, suplementado com 10% (v / v) de soro fetal bovino.

3.18.3 Teste de Susceptibilidade de Epimastigotas de *Trypanosoma cruzi*

O ensaio foi realizado em microplacas de fundo plano de 96 poços com culturas que não atingiram a fase estacionária. Resumidamente, epimastigotas foram semeadas a $2,5 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$ em 200 μL de meio de caldo fígado e triptose (LIT). As culturas foram então incubadas com diferentes concentrações da serinoprotease (3,12; 6,25; 12,5; 25 e 50 μg) e de veneno (3,12; 6,25; 12,5; 25 e 50 μg) a 28 °C durante 72 horas, momento em que 50 μL de solução de vermelho de clorofenol- β -D-galactopiranosídeo (CPRG) foi adicionado para concentração final de 200 μM . As placas foram incubadas a 37 °C durante 6 horas e, em seguida a densidade óptica (D.O.) foi determinada a 595 nm. Cada concentração foi testada em triplicata. Controles contendo apenas parasitas também foram incluídos. A eficácia de cada amostra foi demonstrada através do cálculo da porcentagem de atividade antiepimastigota (%AE) (VEGA et al., 2005). Os dados foram expressos como média $\pm$ desvio-padrão de três experimentos independentes. Este experimento realizado em colaboração com a Prof^a Dr^a. Maria Celeste Vega Gómez da Universidade Católica Nossa Senhora de Assunção - Paraguai.

3.18.4 Teste de Susceptibilidade de Promastigota de *Leishmania infantum*

O ensaio foi realizado utilizando *L. infantum* (Leishmaniose visceral). Promastigotas, na fase logarítmica de crescimento $1 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$ parasitas, foram cultivadas em microplacas de 96 poços. As amostras de proteína isolada (3,12; 6,25; 12,5; 25 e 50 μg) e veneno (1,62; 3,12; 6,25; 12,5; 25; 50 e 100 μg) foram adicionadas

MATERIAL E MÉTODOS

às culturas de parasitas ajustados para um volume final de 200 µL. Cada concentração foi ensaiada em triplicata. Controles contendo apenas parasitas também foram incluídos. Após 72 horas a 26 °C, 20 µL de uma solução 2,5 mM de resazurina foi adicionado e a redução-oxidação foi quantificada a 570 e 595 nm para calcular a inibição do crescimento de promastigotas (%AP). Os dados foram expressos como média ± desvio-padrão de três experimentos independentes. Este experimento realizado em colaboração com a Prof^a Dr^a. Maria Celeste Vega Gómez da Universidade Católica Nossa Senhora de Assunção - Paraguai.

3.19 Condições de culturas bacterianas e Ensaios antibacterianos e antibiofilmes

Staphylococcus epidermidis (ATCC35984) e *Pseudomonas aeruginosa* (PA14) foram cultivadas em meio Luria Bertani (LB) a 37 °C sob agitação constante de 150 RPM (*Incubator Shaker Série Excella E25; New Brunswick Scientific*). Uma suspensão bacteriana ajustada para 10⁸ UFC/mL foi utilizada nos ensaios.

Para indução de biofilme, foram realizados ensaios individuais utilizando-se *P. aeruginosa* e *S. aureus*. Para tanto, 20 µL do inóculo bacteriano (10⁸ UFC/mL) foram incubadas com 180 µL de caldo tríptico de soja (TSB) e BrzSP-32 (500 µg/mL). Gentamicina (6 µg / mL) e Rifampicina (6 µg / ml) (*Sigma-Aldrich*) foram utilizados como controle do crescimento de *P. aeruginosa* e *S. epidermidis*, respectivamente e TSB (200 µL), como controle negativo. As amostras foram mantidas a 30 °C, sob agitação contínua de 50 rpm até a formação do biofilme. A formação do biofilme foi avaliada em placas de microtitulação de poliestireno pelo método de Cristal Violeta (STEPANOVIĆ et al., 2007).

Para a avaliação da ação da enzima sobre a formação de biofilme, a camada aderente de biofilme formada foi corada com cristal de violeta 0,4% durante 15 minutos. Em seguida, o corante aderido ao biofilme foi ressuspenso com DMSO 99,5% (*Sigma-Aldrich Co.*) e a absorbância determinada em 570 nm (*Spectramax M2e multimodo Leitor de Microplacas; Molecular Devices*) (TRENTIN et al., 2011). O controle de formação de biofilmes foi considerado como 100% da formação de biofilme e/ou do crescimento bacteriano (ANTUNES et al., 2010).

Em paralelo, o crescimento bacteriano foi avaliado após 24 horas e definido pela diferença das densidades ópticas (600 nm) (MUSK; BANKO; HERGENROTHER, 2005). Os dados foram expressos como média ± desvio-padrão de três experimentos

MATERIAL E MÉTODOS

independentes. Este experimento foi realizado em colaboração com o Prof. Dr. Alexandre José Macedo da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

3.20 Análises Estatísticas

Os resultados são expressos como médias $\pm$ desvio padrão obtidos com o número indicado de experimentos realizados. A significância estatística das diferenças entre os grupos experimentais foi realizada por análise de variância (ANOVA) seguida por comparações múltiplas pelo método de *Tukey* (programa PAST), sendo os valores de $p \leq 0,05$ considerados estatisticamente significativos.

4 RESULTADOS

4.1 Determinação da estrutura primária e modelo da BpirSP-39

A BpirSP-39 isolada por Zaqueo e colaboradores (2014) foi reduzida, alquilada e tripsinizada. Os digestos trípticos foram separados por HPLC *Nano Acquity* acoplado a um espectrômetro *Orbitrap Velos* e os fragmentos determinados (Apêndice 1) foram submetidos a busca por similaridade usando algoritmo BLAST e o alinhamento múltiplo foi realizado com os softwares MODELLER v9.10 e ClustalW. A sequência deduzida apresenta elevada similaridade com serinoproteases do veneno de serpentes de diferentes espécies (Figura 7 – os retângulos vermelhos identificam os resíduos de aminoácidos que compõem a tríade catalítica das SPs).

Figura 7: Alinhamento múltiplo da sequência de BpirSP-39 e outras SPs CLUSTAL O (1.2.1).

BpirSP-39	VIGGDECNINEHRFLVALYGSRGYFCGLTTLINQEWVLTAAHCDRKNFRIYLGHIHTRKVLN
D_acutus	VIGGDECNINEHRFLVAFFNTTGFFCGGTLINPEWVVTAHCDSTNFMQLGVHSHKVLN
AaV-SP-II	VIGGNECDINEHRFLVAFFNTTGFFCGGTLINPEWVVTAHCDSTNFMQLGVHSHKVLN
B_jussuSP-1	VLGGDECNINEHPFLA-FLYSHGYFCGLTTLINQEWVVTAAHCDSTNFMQLGVHSHKVLN
B_insularis Q8QG86.1	VVGGDECNINEHPFLA-FLYSHGYFCGLTTLINQEWVLTAAHCDRRFMRIYLGHIHARSVAN
BthaTL	VIGGDECNINEHRFLA-FLYPGRFFCSGTLINQEWVLTVAHCDTISMRIYLGHLHTRSVPN
	::*:*:*:* * * : : * * . * * * * * : * * * : * : * * : * * *
BpirSP-39	EDEQTR-----FLCPNGKKDDVLDKDIMLIRLDSVSNSEHIAPLSLPSSPPSVGVSVCRI
D_acutus	EDEQTRNPKEKFICPNKNNNEVLDKDIMLIKLDSPVNNSAHIAPISLPSNPPSVGVSVCRI
AaV-SP-II	EDEQTRNPKEKFICPNKNNNEVLDKDIMLIKLDKPISNSKHIAPLSLPSSPPSVGVSVCRI
B_jussuSP-1	EDEQTRNPKEKFICPNKNNMEVLDKDIMLIKLDKPISNSKHIAPLSLPSNPPSVGVSVCRI
B_insularis Q8QG86.1	DDEVIRYPKEKFICPNKNMSEVLDKDIMLIRLNRPVKNSTHIAPIISLPSNPPSVGVSVCRI
BthaTL	DDEEIRYPMEKFICPNRKRSYLDKDIMLIRLNRPVNDSPHIAPLSLPSNPPSVGVSCHV
	: * * * * * : . * * * * * : * : * * * : * * * : * * * : * * * : * * *
BpirSP-39	MGWGTISPT-KTNPDPVPHCANINLLDDAVCRAAYPELPAEYRTLCAGILQGGIDSCKGIS
D_acutus	MGWGSITSPNVTIPGVPHCANINILDYEVCRATKPELPAKSRTLCAGILEGGKSGCDGIS
AaV-SP-II	MGWGSITPVKETFPDVPYCANINLLDHAVCQAGYPELLAEYRTLCAGIVQGGKDTCCGIS
B_jussuSP-1	MGWGSITIPNETYPDVPYCANINLVDEYVCQAGAYNGLPA-KTTLCAVLEGGKDTCCGIS
B_insularis Q8QG86.1	MGWGSITIPNDTYPDVPYCANINLVNDTVCRGAYKRFPAKSRTLCAGVLQGGKDTCCGIS
BthaTL	MGWGTTSPSKATYPDVPYCANINLVNDTMCHGAYNGLPVTSRKFCAGVLQGGIDTCVGIS
	* * * * : : * * * * * : : : : : : : * * * * : * * *
BpirSP-39	----LCNGQFQGLLSWGSKVCAQPRPKPALYTKVSDYTEWIKSIIAGNTDVTCP
D_acutus	GGPLICNGEIQGIIVSWGGDICAQPH-EPGHYTKVYDYTDWINSIIAGNTSATC
AaV-SP-II	GGPLICNGQFQGIIVSYGAHPCQGGP-KPGIYTNVFDYTDWIQRNIAGNTDATC
B_jussuSP-1	GGPLICNGQFQGIIVSYGAHSCGQGP-KPGIYTNVFDYTDWIQRNIAGNTDATC
B_insularis Q8QG86.1	GGPLICNGTFQGIIVSWGGKVCARPR-KPALYTKVFDYLPWISIIAGNKTATC
BthaTL	GGPLICNGQFQGIIVSWGGKVCARLP-RPALYTKVFEYLPWISIIAGNTTATC
	: * * * : * * : * * . * : : . * . * * : * * : * * * . * * *

A sequência de aminoácidos da BpirSP-39, determinada por MS/MS, foi alinhada com diferentes serinoproteases de venenos de serpentes (B_insularis|Q8QG86.1: *Bothrops insularis*/ BthaTL|Q6IWF1.1: *Bothrops alternatus*/ AaV-SP-II|IOP2_A|PDBID: *Agkistrodon acutus*/ D_acutus|AAK52506.2: *Deinagkistrodon acutus*/ e B_JUSSU|Q2PQJ3.1 *Bothrops jararacussu*) Resultado de clustal I20150731-225318-0084-20494014-es CLUSTAL OMEGA (1.2.1) Asterisco (*) indica aminoácidos idênticos; dois pontos (:) indica conservação entre grupos de propriedades fortemente semelhantes; espaço () conservação entre grupos de propriedades fracamente semelhantes. "X" significa um resíduo de aminoácido desconhecido. Os retângulos vermelhos identificam os resíduos de aminoácidos que compõem a tríade catalítica das SPs.

A Figura 8 apresenta o alinhamento N-terminal da BpirSP-39 com duas serinoproteases também isoladas do veneno de *B. pirajai* (BpirSP-41 e BpirSP-27). A identidade da BpirSP-39 foi de 82% com BpirSP-41 e 67,35% com BpirSP-27.

Figura 8: Alinhamento múltiplo da sequência N-terminal das serinoproteases de *B. pirajai*: BpirSP-39 com BpirSP-41 e BpirSP-27 (CLUSTAL O (1.2.1) e Cobalt RID Y27809XE211 (3 seqs).

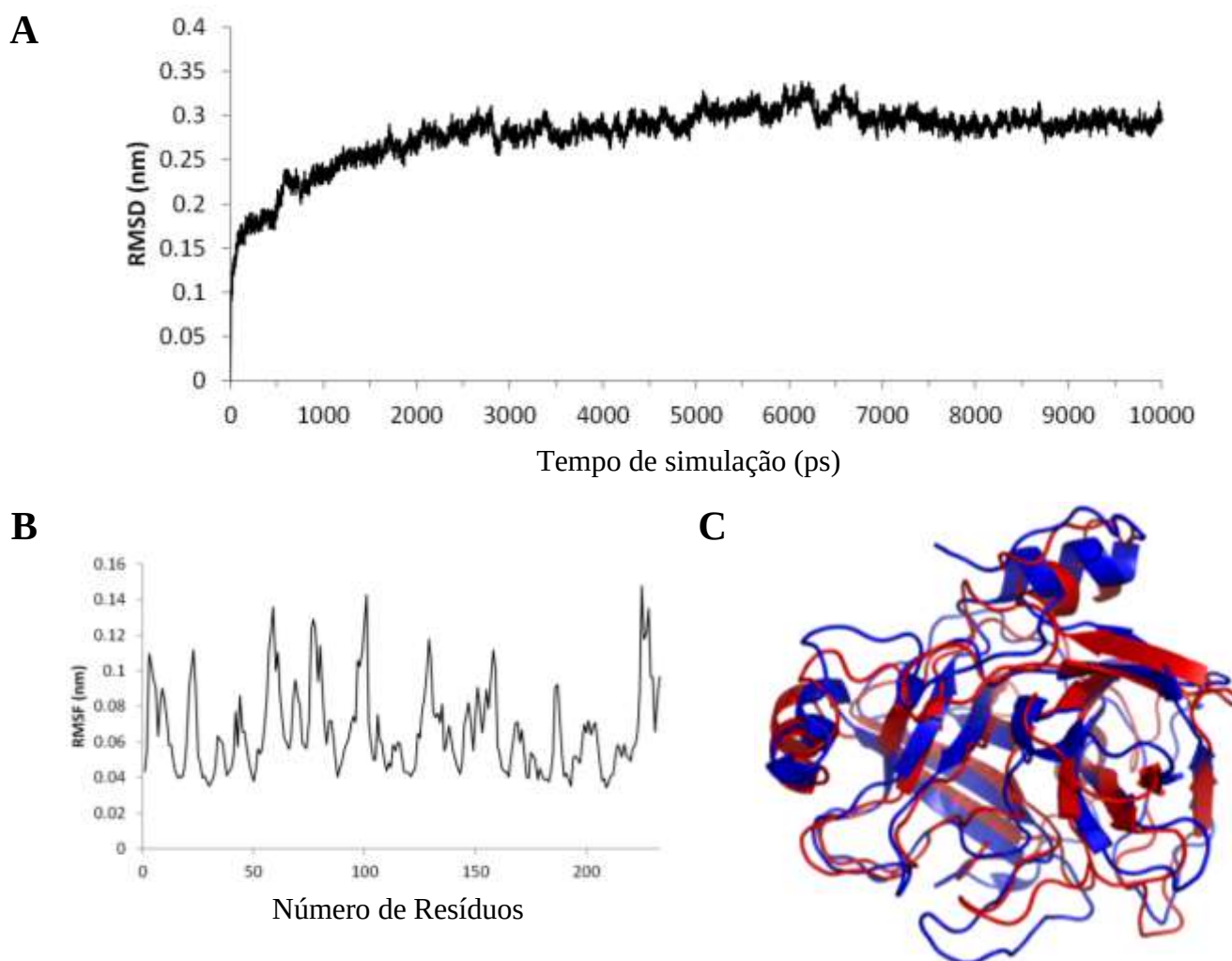
BpirSP-39	VIGGDECNINEH RL VALYGS RGYFCGLT LNQEWVLTA AHCD RKNFRIY L [171]	222
BpirSP-41	VVG G DEC D INEH P FLAFLY-SHG YFCGLT LNQEWVLTA AHCD RRFMRIY L	50
BpirSP-27	VVG G DEC N INEH RS LVAIF NSTG FC SGI LLNQEWVLTA SHCD STNFQ MK -	50
	*:*****:***** *. :.: *:*.* *:*****:*** :.:	

A cor vermelha indica colunas altamente conservadas, azul indica as menos conservadas e em cinza são destacadas as regiões com colunas contendo lacunas. (*) indica aminoácidos idênticos; dois pontos (:) indica conservação entre grupos de propriedades fortemente semelhantes; espaço () conservação entre grupos de propriedades fracamente semelhantes.

O resultado do sequenciamento por LC-MS/MS apresentou quatro regiões em que os resíduos de aminoácidos não puderam ser identificados. Estes foram preenchidos por homologia com base na serinoprotease isolada do veneno de *Agkistrodon halys* (PDB ID: 4E7N) (selecionado para construir o modelo da BpirSP-39). A sequência das duas primeiras regiões foram identificadas por degradação de Edman (EDMAN, 1950) (dados não mostrados) e o terceiro e quarto são justificados pela grande quantidade de lisina que gera pequenos fragmentos dificultando a análise por LC-MS/MS.

O modelo tridimensional da BpirSP-39 foi confeccionado pelo método de modelagem por homologia utilizando como molde a serinoprotease que apresentou melhor pontuação do alinhamento (286,73). A identidade entre a sequência da BpirSP-39 e o modelo foi de 67%. Os valores de deslocamento quadrático médio (*root mean square deviation* – RMSD) foram consolidados após 7500 ps (Figura 9 A) e a variação dos átomos da cadeia lateral ficaram entre 7500 e 10000 ps (Figura 9 B). A Figura 9 C apresenta a sobreposição do modelo final da BpirSP-39 (em vermelho) com a serinoprotease isolada do veneno de *Agkistrodon halys* (em azul) onde pode-se perceber a presença das estruturas secundárias características às serinoproteases, indicando que a estrutura terciária prevista foi preservada durante a simulação de DM.

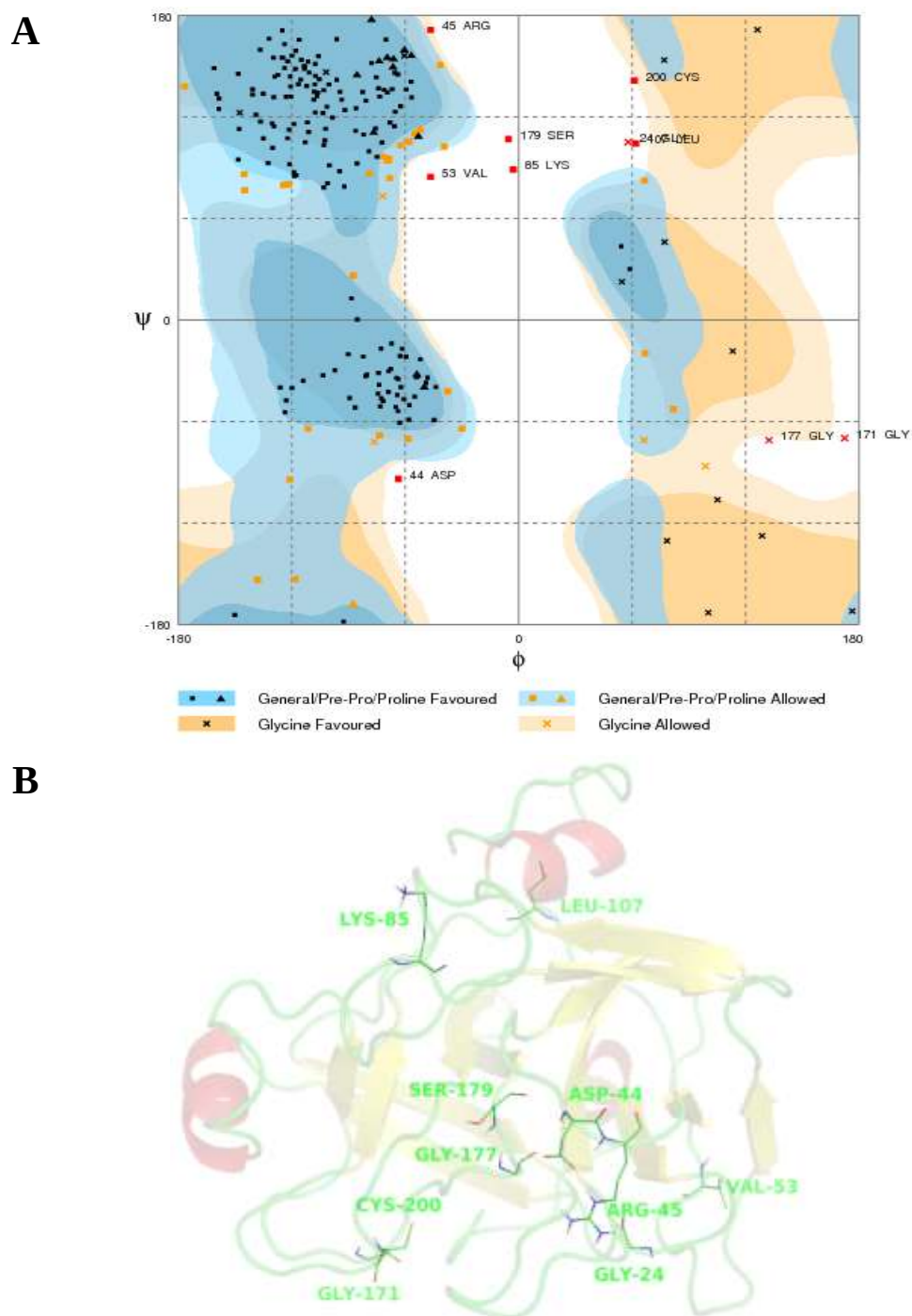
Figura 9: Teste de validação do Modelo.



A) RMSD x tempo de simulação da cadeia dinâmica molecular para o modelo gerado; (B) **Valores de RMSF dos átomos de carbono alfa** (RMSF) do modelo e BpirSP39 (entre 7,5 e 10 ns de simulação MD); (C) Alinhamento entre BpirSP-39 modelo (vermelho) e serinoprotease isolada a partir de veneno de *Agkistrodon halys* (PDB ID: 4E7N) a enzima usada como modelo (azul).

Após a simulação de DM, o modelo final apresentou contagens *Verify3D* acima de zero para todos os resíduos, o que sugere que a conformação dos resíduos individuais foi adequada. Analisando o gráfico de Ramachandran, a estrutura da BpirSP-39 mostra 81,3% dos resíduos localizados em regiões permitidas e apenas 4,3% em regiões de baixa característica estereoquímica (Figura 10 A). Além disso, todos os resíduos com predição desordenada estão localizados em regiões de alça (Figura 10 B), sugerindo que a conformação do modelo final tem boa qualidade estereoquímica.

Figura 10: Avaliação do modelo da BpirSP-32.

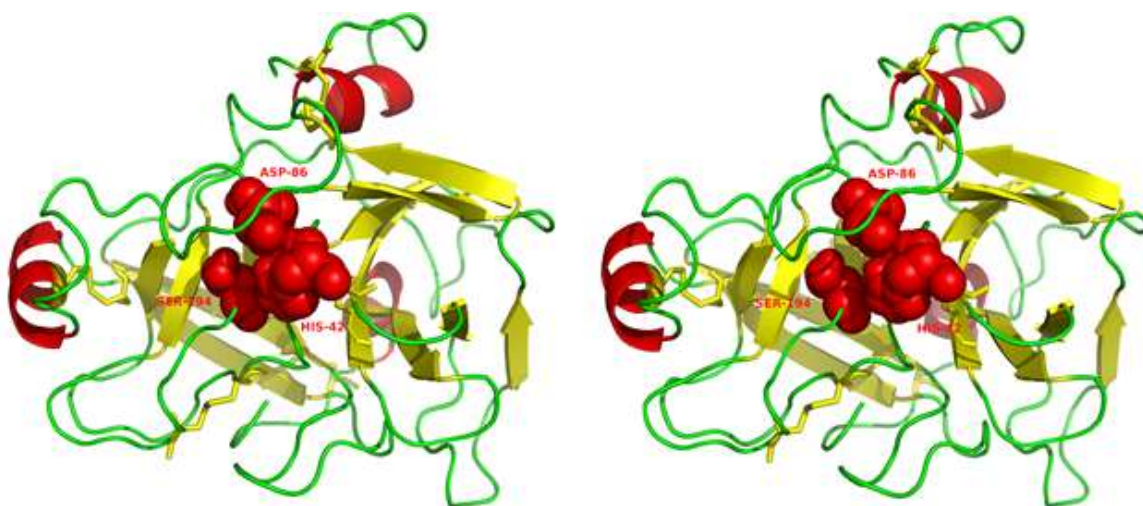


A imagem (A) apresenta o Gráfico de Ramachandran do modelo final da BpirSP-39, onde 81,3% dos resíduos estão localizados em regiões permitidas e apenas 4,3% em regiões de baixa característica estereoquímica. A imagem (B) demonstra que todos os resíduos com predição desordenada estão localizados em regiões de alça, sugerindo que a conformação do modelo final tem boa qualidade estereoquímica.

RESULTADOS

A BpirSP-32 é uma proteína monomérica (ZAQUEO et al., 2014) de estrutura tridimensional globular que apresenta dois arcabouços secundários de α -hélice (vermelho), dois β -barris formado por folhas β antiparalelas e as 6 pontes dissulfeto (amarelo), além de 14 regiões de alças (verde). A tríade catalítica da enzima é composta por uma histidina, uma aspartato e uma serina (His⁴², Asp⁸⁶ e Ser¹⁹⁴), respectivamente (Figura 11) (Apêndice 2). Dois sítios de glicosilação foram identificados, usando o software NETNGlyc, nas posições N5 e N74.

Figura 11: Modelo tridimensional final da BpirSP-39.

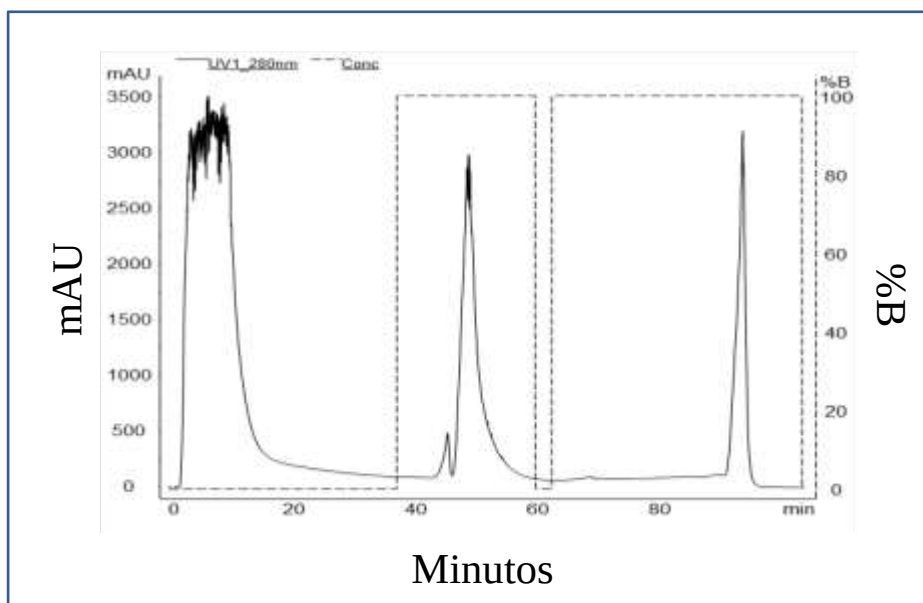


A imagem apresenta o modelo da BpirSP-39 demonstrando suas estruturas secundárias e, em vermelho, a tríade catalítica (His42, Asp86 e Ser194). As simulações foram realizadas empregando MD GROMACS (Groningen máquina para Chemical Simulation) de software v.4.5.4 no processador Intel Xeon com 8GB de RAM, operando em um sistema operacional Linux CentOS 5.5.

4.2 Isolamento da Serinoprotease de *B. brazili*

Para a obtenção da serinoprotease de *B. brazili*, foi realizada cromatografia em coluna de bioafinidade com resina *Benzamidine Sepharose*. A coluna foi submetida à lavagem por 38 minutos com a solução I (Tris-HCl 20 mM pH 8,1), resultando na eluição de uma fração com compostos que não apresentaram interação com a mesma. Após esse período, foi realizada a inserção de 100% de solução II (Tris-HCl 20 mM pH 8,1 acrescido de 1 M de NaCl), resultando na segunda fração, que quando testada quanto à sua capacidade proteolítica sobre substrato cromogênico BApNA, não demonstrou atividade amidolítica considerável. Posteriormente, foi realizada a introdução de solução de glicina 20 mM pH 3,0 na coluna, e, posteriormente, a eluição do material que interagiu de maneira específica com a coluna (Figura 12).

Figura 12: Cromatografia de afinidade em Benzamidine-Sepharose do veneno de *B. brazili*.



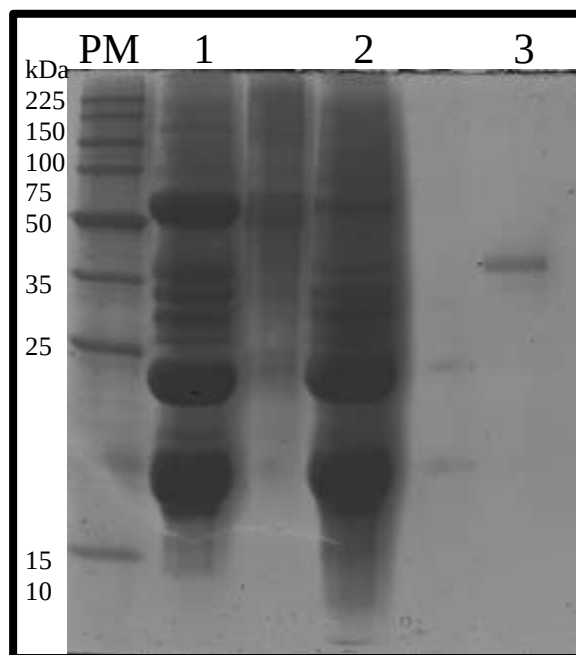
A coluna foi pré-equilibrada com tampão I (Tris-HCl 20 mM, pH 8,1). Aproximadamente 150 mg de veneno de *Bothrops brazili* foi solubilizado em 1 mL de tampão I. Após clarificação, o sobrenadante foi aplicado em coluna de Benzamidina (70 cm x 0,9 cm) (GE), pré-equilibrada com o mesmo tampão de dissolução da amostra. A eluição do material com menor interação com a resina foi efetuada após lavagens sucessivas da resina com o tampão de solubilização da amostra seguida por alteração na concentração iônica da solução com a inserção de 1M de NaCl (primeiro retângulo de linhas tracejadas). A amostra de interesse (fração 3) foi eluída após a acidificação da solução (Glicina 20 mM pH 3,0) (segundo retângulo de linhas tracejadas). As corridas cromatográficas foram realizadas em equipamento de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (Akta Purifier10, GE) e a eluição das frações foram monitorada em 280nm (linha contínua).

O material foi submetido à eletroforese em gel monodimensional SDS-PAGE 12,5%. Sendo apresentado na Raia (1) o perfil eletroforético do Veneno de *B. brazili*, na

raia (2) a fração 1 da cromatografia de bioafinidade e na raia (3) 20 µg da BbrzSP-32 sob condições redutoras (Figura 13).

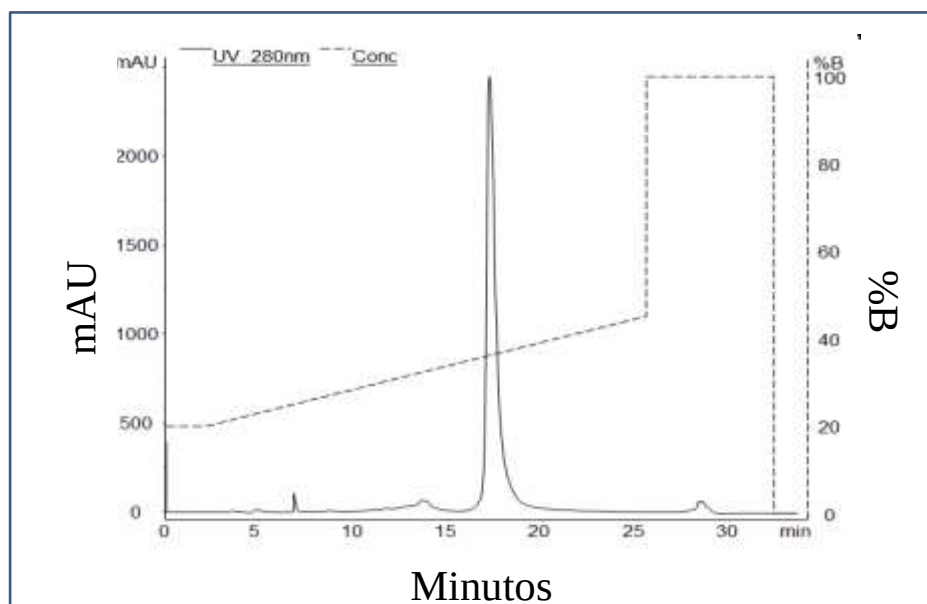
As atividades coagulantes sobre plasma citratado e, proteolítica sobre substrato cromogênico BApNA foram observadas somente na terceira fração. Após dessalinizada e liofilizada, a amostra da terceira fração foi ressuspensa em 1 mL de 0,1% de ácido trifluoroacético (TFA) e submetida à cromatografia de fase reversa em coluna C-2/C-18. O perfil cromatográfico evidencia uma fração majoritária (Figura 14) que manteve a atividade enzimática. As amostras foram liofilizadas e estocadas a -20°C. O procedimento utilizado resultou em 1,2 mg de serinoprotease isolada, o que corresponde a 0,8% (m/m) do veneno de *Bothrops brazili*.

Figura 13: Gel de eletroforese das frações oriundas da Cromatografia em coluna de Benzamidina do veneno de *B. brazili* e BrzSP-32.



Foi realizada análise eletroforética em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (SDS-PAGE – 12,5%). Amostras: (PM) Padrões de massa molecular relativa V849A. Raia (1) Veneno de *B. brazili*, Raia (2) Fração 1 da cromatografia de bioafinidade e Raia (3) BbrzSP-32 sob condições redutoras (20 µg). As amostras foram aplicadas em gel (8,6 cm X 6,7cm) e separadas sob tensão constante de 150V por 75 minutos. O gel foi corado com Coomassie Brilliant G250.

Figura 14: Cromatografia de fase reversa em coluna C2/C18 da fração 3 resultante da cromatografia em coluna Benzamidina-Sepharose do veneno de *B. brazili*.



A fração com atividade coagulante, resultante da cromatografia em coluna de afinidade, após dessalinização, foi solubilizada em 1 mL de 0,1% de ácido trifluoroacético (TFA) e recromatografada em uma coluna de Fase Reversa C2/C18 (10mm x 4,6mm, 3µm, 120Å) (GE), previamente equilibrada com TFA 0,1%. A corrida efetuada em gradiente linear de 20 a 50% de TFA 0,1% acrescido de Acn 99,9% (linhas tracejadas) sob fluxo constante de 0,750 mL/minuto. As corridas cromatográficas foram realizadas em equipamento de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (Akta Purifier10, GE) e a eluição das frações foram monitorada em 280 nm. As frações foram liofilizadas e estocadas a -20°C.

4.3 Determinação da Massa Molecular

Analizada por SDS-PAGE, a proteína de interesse demonstrou ser uma proteína monomérica, apresentar elevado grau de pureza e possuir massa molecular aproximada de 36 kDa (Figura 15), sendo sua massa molecular igual a 32.520 Da (Figura 16) confirmada por espectrometria de massa em MALDI TOF². A serinoprotease passa a ser denominada BbrzSP-32.

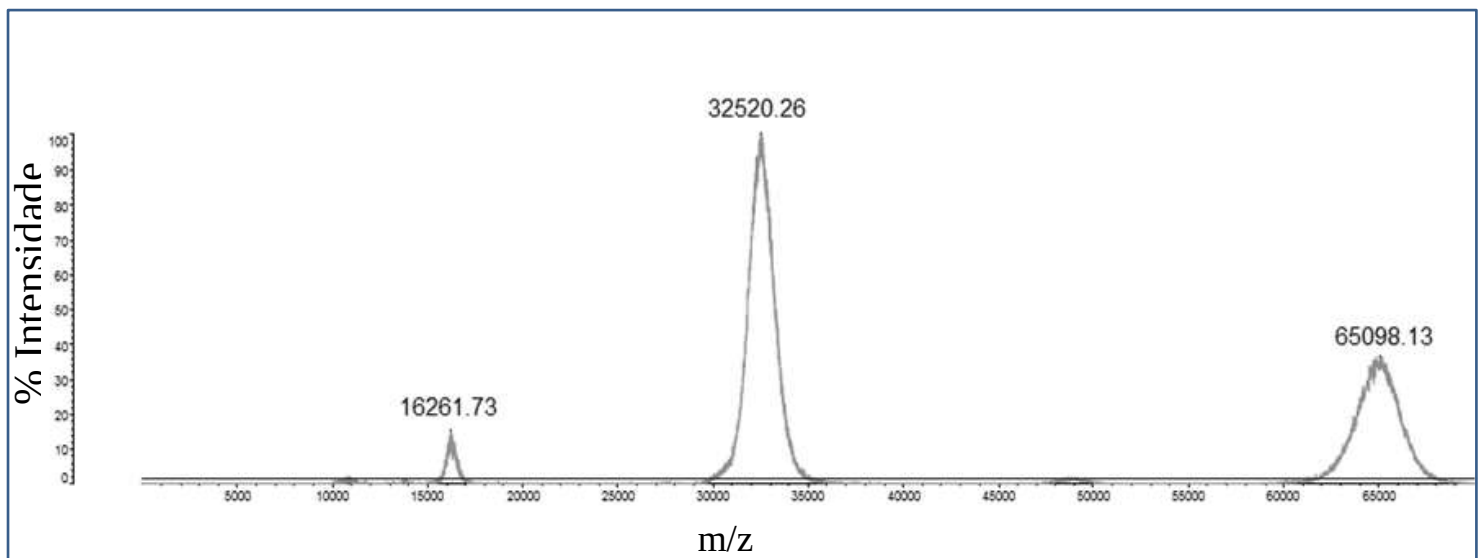
RESULTADOS

Figura 15: Determinação da massa molecular relativa da BbrzSP-32.



Foi realizada análise eletroforética em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (SDS-PAGE – 12,5%). Amostras: (1) Padrões de massa molecular relativa V849A (2) BbrzSP-32 sob condições redutoras (20 µg). As amostras foram aplicadas em gel (8,6 cm X 6,7cm) e separadas sob tensão constante de 150V por 75 minutos. O gel foi corado com Coomassie Brilliant G250.

Figura 16: Determinação da massa molecular de BbrzSP-32 por Espectrometria de massa em MALDI TOF/TOF.



Espectro de massa mostrando a proteína nativa (32520,25 Da), sua dupla carga (16261,73 Da) e seu dímero (65098,13 Da). O espectro de massa foi adquirido por Ionização de matriz assistida a laser (MALDI) em espectrômetro de massa Axima-ToF² (Shimadzu Biotech, Japão).

4.4 Determinação da Sequência e modelagem da BbrzSP-32

A sequência N-terminal obtida por degradação de Edman mostrou que os primeiros 49 aminoácidos possuem alta identidade quando comparada com outras enzimas trombina-símile isoladas de venenos botrópicos (Figura 17). A identidade chegou a 98% com a bothrobina, uma serinoprotease isolada do veneno de *Bothrops jararaca*, dentre as serinoproteases utilizadas para comparação, a que mostrou menor identidade foi a BthaTL, isolada da serpente *Bothrops alternatus*.

Figura 17: Alinhamento da sequência aminoterminal da BbrzSP-32 com outras SVSPs (UNIPROT).

		1	52	IDENTITY (%)
<i>Bothrops brazili</i>	BbrzSP	VIGGDECNINEHPFLAFMYSPQYFCGMTLINQEWVLTAAHCDKTYMRI---		--
<i>Bothrops jararaca</i>	bothrobin	VIGGDECNINEHPFLAFMYSPQYFCGMTLINQEWVLTAAHCDKTYMRIYLG		98
<i>Bothrops leucurus</i>	leucurobin	VIGGDECNINEHPFLAFMYSPRYFCGMTLINQEWVLTAAHCNRRFMRIXXX		88
<i>Bothrops atrox</i>	batroxobin	VIGGDECNINEHPFLAFMYSPRYFCGMTLINQEWVLTAAHCNRRFMRIHLG		88
<i>Bothrops pirajai</i>	BpirSP41	VVGDECNINEHPFLAFLY-SHG YFCGLTLINQEWVLTAAHCDRRFMRIYL-		80
<i>Bothrops insularis</i>	BITS01A	VVGDECNINEHPFLAFLY-SHG YFCGLTLINQEWVLTAAHCDRRFMRIYLG		80
<i>Bothrops barnetti</i>	Barnettobin	VIGGDECNINEHPFLAFLY-SRGNFCGLTLINQEWVLTAAHCDRRFMPIYLG		78
<i>Bothrops jararacussu</i>	BjussuSP-1	VLGGDECNINEHPFLAFLY-SHG YFCGLTLINQEWVLTAAHCDSTNFQMQLG		73
<i>Bothrops andianus</i>	TLBan	VIGGDECNINEHPFLVALYYS-TFFCGMTLINQEWVLTAAHESEK-----		73
<i>Bothrops jararaca</i>	HS112	VIGGDECNINEHRFLAFLY-AGGYCGGTLINQEWVLSAAHCDKRIIRIYLG		73
<i>Bothrops alternatus</i>	BthaTL	VIGGDECNINEHRFLAFLY-PGRFFCSGTLINQEWVLTVAHCDTISMRIYLG		71
		*:*****:***** ** . : * : * . *****: : . ** .		

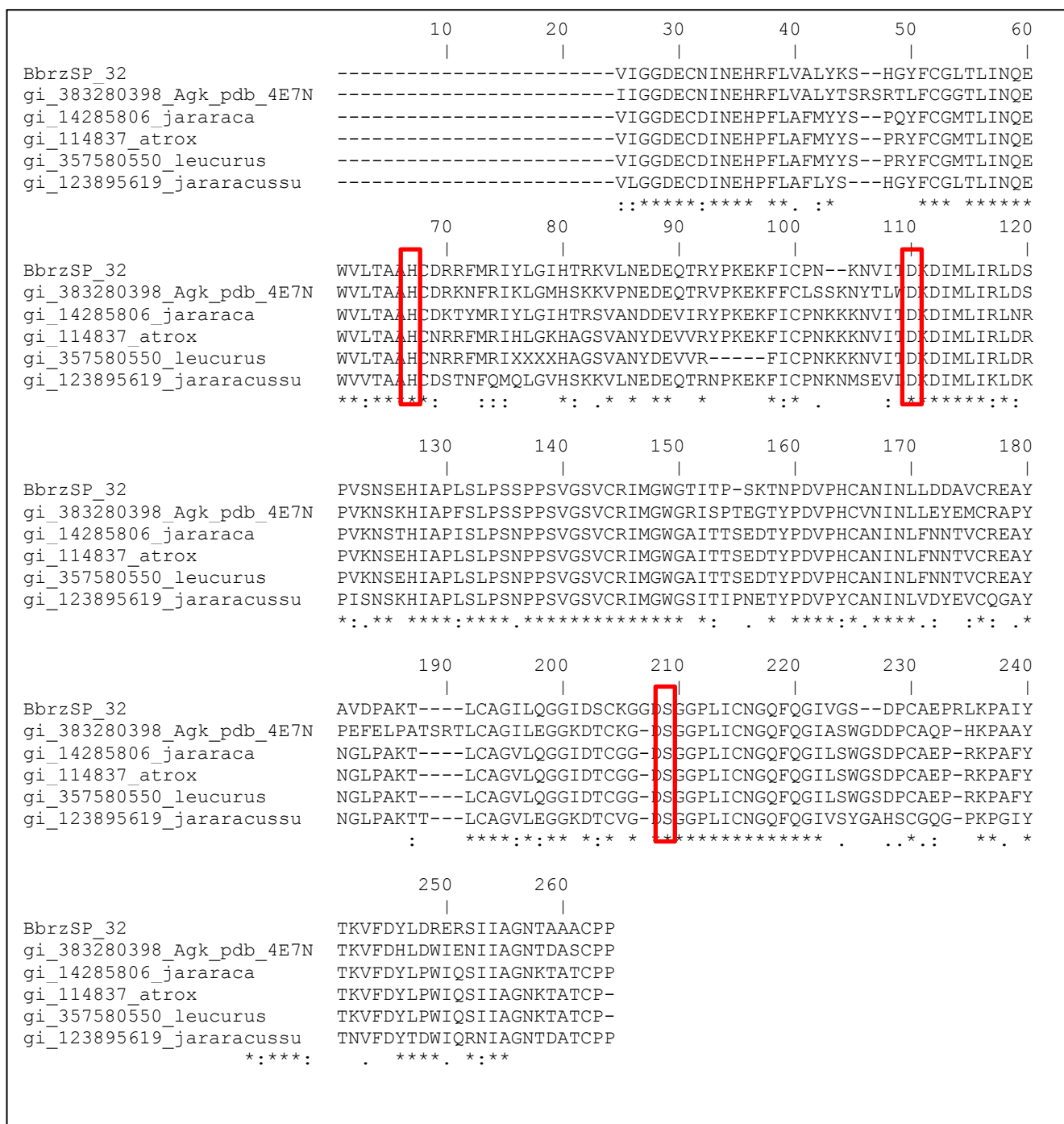
O alinhamento múltiplo foi feito com o programa Clustal W 2.1. Asteriscos (*) indicam as posições que têm um único resíduo, totalmente conservado; Dois pontos (:) indicam conservação entre os grupos de forte semelhança. Ponto (.) indica a conservação entre os grupos de propriedades de fraca semelhança e espaço () regiões com aminoácidos variados.

Após a elucidação da sequência N-terminal, a estrutura primária de aminoácidos da BbrzSP-32 foi identificada por intermédio de análises dos peptídeos trípticos dos espectros de MS/MS utilizando a ferramenta MASCOT, confrontada com bancos de dados no NCB InrSerpentes (Figura 18).

A técnica de modelagem por homologia foi utilizada para a elucidação da estrutura tridimensional da BbrzSP-32 (Figura 19), bem como, para a predição dos Gaps resultantes da técnica de sequenciamento. O alinhamento de BbrzSP-32 produziu 73,36% de identidade com a enzima molde.

RESULTADOS

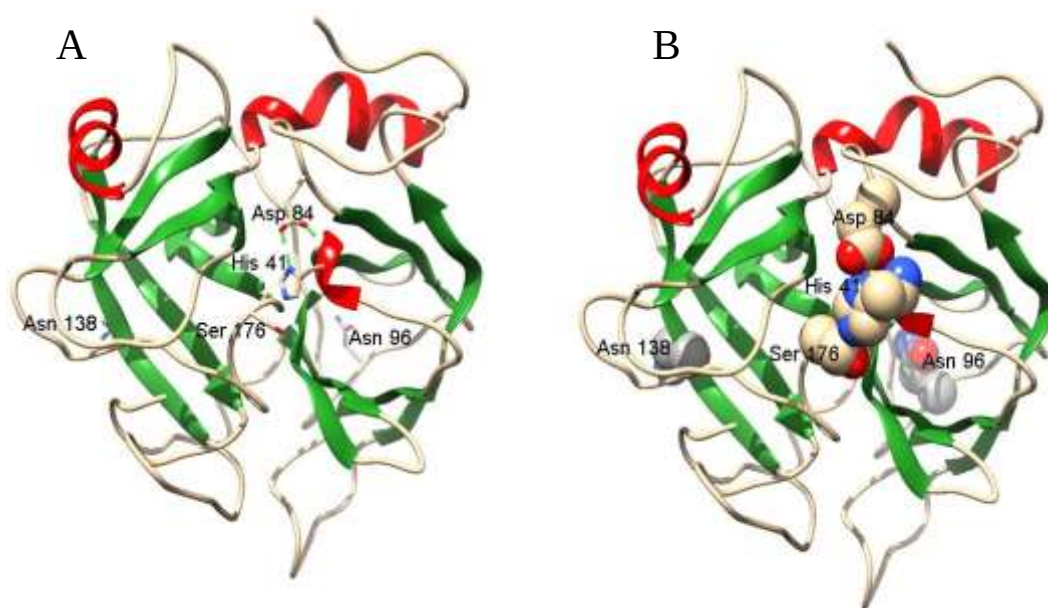
Figura 18: Alinhamento múltiplo entre a sequência da BbrzSP-32 com outras serinoproteases do veneno de serpentes.



Para o alinhamento foram utilizadas as serinoproteases das serpentes a seguir: *Agkistrodon halys* (gi_383280398) *B. jararaca* (gi:14285806), *B. atrox* (gi:114837), *B. leucurus* (gi:357580550) and *B. jararacussu* (gi:123895619). Asterisco (*) indica aminoácidos idênticos; dois pontos (:) indica conservação entre grupos de propriedades fortemente semelhantes; espaço () conservação entre grupos de propriedades fracamente semelhantes. "X" significa um resíduo de aminoácido desconhecido. Os retângulos vermelhos identificam os resíduos de aminoácidos que compõem a tríade catalítica das enzimas.

Os resultados de modelagem sugerem que a BbrzSP-32 é uma proteína de estrutura globular que apresenta: (i) duas estruturas secundárias externas em α -hélice (representadas em vermelho), (ii) dez folhas- β uniformemente distribuídas, formando dois barris de folhas antiparalelas (verde) e (iii) vários *loops* (branco). A imagem também enfatiza a presença dos sítios de glicosilação (asparaginas 96 e 138) e a tríade catalítica His⁴¹, Asp⁸⁶ e Ser¹⁷⁶ (Figura 19).

Figura 19: Modelo tridimensional da enzima BbrzSP-32.



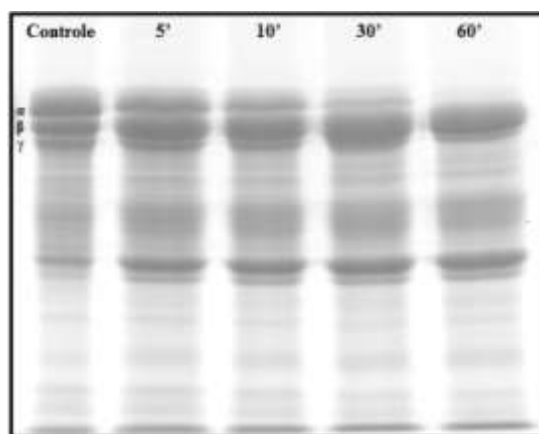
Modelagem realizada no *Swiss-PDB Viewer* e reverificado com *POV-ray*. A BbrzSP-32 apresenta duas estruturas secundárias externas em α -hélice (representadas em vermelho); dez folhas- β uniformemente distribuídas, formando dois barris de folhas antiparalelas (verde) e vários *loops* (branco). A imagem também enfatiza a presença dos sítios preditos de oligossacarídeos (Asn⁹⁶ e Asn¹³⁸ – em cinza) e a tríade catalítica His⁴¹, Asp⁸⁶ e Ser¹⁷⁶ (na imagem **A** os resíduos estão destacados e em **B** a tríade e os sítios de glicosilação são representados de maneira globular, as diferentes cores correspondem aos átomos que os compõem).

4.5 Atividade Fibrinogenolítica

Após a incubação de fibrinogênio com a BbrzSP-32 pode-se verificar que a proteína possui atividade preferencial sobre a cadeia α do fibrinogênio, sendo possível a visualização da degradação desde o primeiro tempo avaliado (5 minutos), porém, de maneira mais evidente a partir dos 10 minutos de incubação (Figura 20). Na quinta raia do gel, onde é apresentado o resultado referente ao tempo máximo de incubação (60

minutos) é possível perceber a completa degradação da cadeia α , com a liberação de fibrinopeptídeos A. Dessa forma, a enzima pode ser classificada como uma *snake venom thrombin like enzyme A* (SVTLE-A). Não foi possível visualizar alterações significativas de degradação da cadeia β mesmo após o tempo máximo de incubação (1 hora).

Figura 20: Atividade fibrinogenolítica da BbrzSP-32.

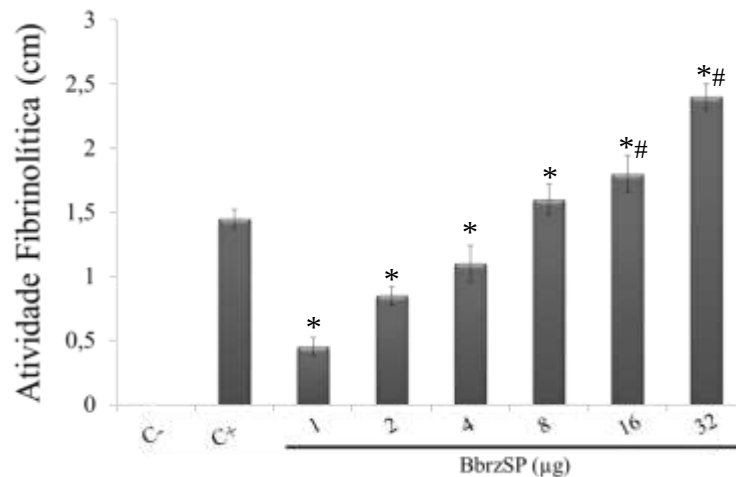


A BpirSP-32 (5 μ g) foi incubado com 100 μ L de solução de fibrinogênio bovino (5 mg/mL) por 37 °C em diferentes tempos (5, 10, 30 e 60 minutos). A visualização é permitida por meio de eletroforese monodimensional em gel 12,5%.

4.6 Atividade Fibrinolítica

Além da capacidade de degradar o fibrinogênio, pode-se comprovar que a BbrzSP-32 possui atividade fibrinolítica dose-dependente (Figura 21). 8 μ g da SP foi capaz de criar um halo com mais de 1,5 cm de degradação, quantidade superior ao controle positivo, 40 μ g de veneno de *Bothrops brazili*.

Figura 21: Atividade fibrinolítica da BbrzSP-32.

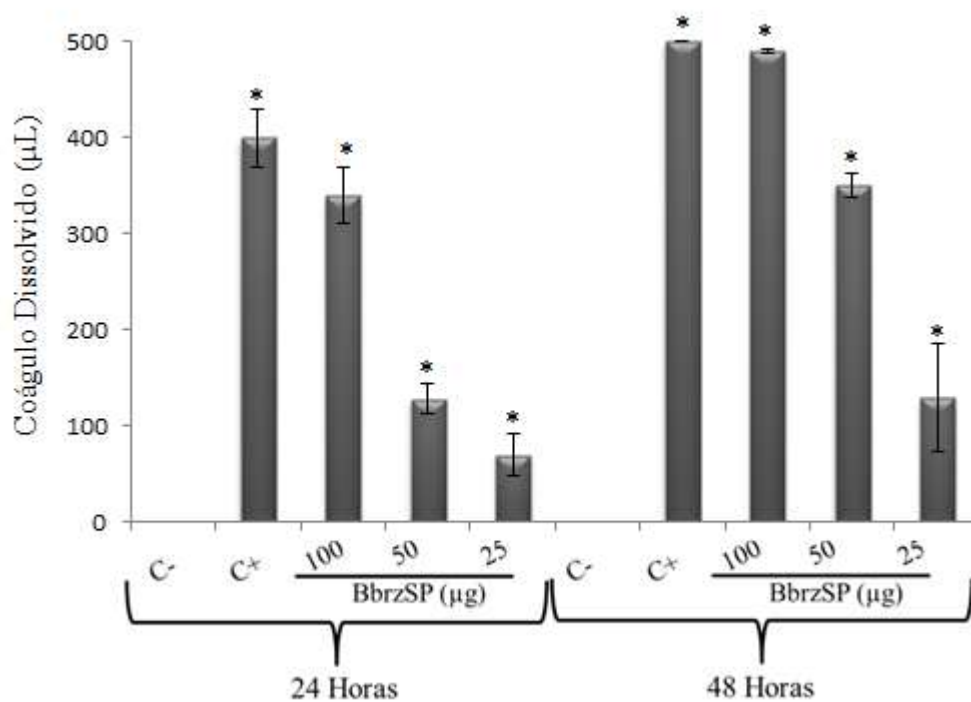


Foi avaliada pela medição dos halos de degradação de fibrina (em cm) resultante após incubação de diferentes quantidades de BbrzSP-32 (1, 2, 4, 8, 16 e 32 µg) ou 40 µg de veneno de *B. brazili* (C+) ou água milliQ (C-) com a solução de fibrinogênio e trombina copolimerizados com agarose * $p \leq 0,05$ em relação ao controle negativo e # $p \leq 0,05$ em relação ao controle positivo (ANOVA).

4.7 Atividade Trombolítica

A atividade trombolítica mostrou-se dose e tempo-dependente. Após a incubação dos trombos com as diferentes quantidades de BbrzSP-32 ou com os controles, foram subtraídos os 300 µL correspondentes à solução de diluição da amostra e a degradação dos trombos foi mensurada. Desde o primeiro período de incubação, o controle positivo apresentou maior atividade trombolítica, sendo capaz de degradar completamente o coágulo após 48 horas de incubação. 100 µg de BrzSP-32 apresentou valores similares ao controle positivo, principalmente após 48 horas de incubação (Figura 22).

Figura 22: Atividade trombolítica da BbrzSP-32.

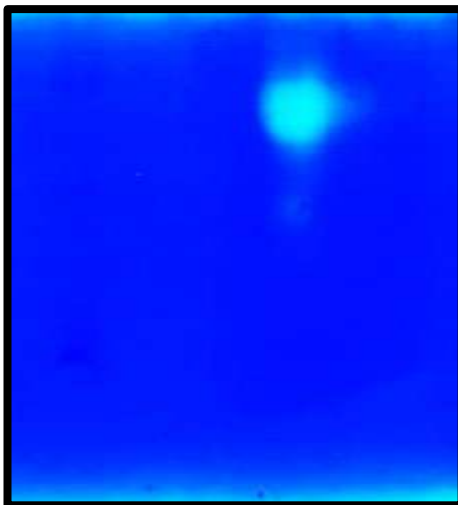


O ensaio de atividade trombolítica foi realizado com sangue humano incubado por 24 e 48 horas a 37 °C com diferentes doses de BbrzSP-32 (25, 50 e 100 µg em 300 µL), veneno de *B. brazili* (50 µg/300 µL) (C+) e água MilliQ (300 µL) (C-) * $p \leq 0,05$ em relação ao controle negativo.

4.8 Degradação de gelatina

A serinoprotease isolada possui atividade gelatinolítica, como mostrado no zimograma (Figura 23). A figura demonstra que a BbrzSP-32 possui capacidade de clivar as ligações peptídicas dos resíduos de aminoácidos que compõem a proteína utilizada como substrato, resultando em um halo de degradação da gelatina.

Figura 23: Atividade gelatinolítica da BbrzSP-32.



Gelatina 0,3% foi copolimerizada com poliacrilamida 12,5% e uma corrida eletroforética convencional foi realizada. Após a remoção do SDS o gel foi incubado com tampão (Tris-HCl 50mM pH 8,0 e CaCl₂ 5mM), a 37°C, durante 20 horas. Após este período o gel foi corado com Coomassie R-250.

4.9 Efeito de Compostos Químicos sobre a Atividade Proteolítica

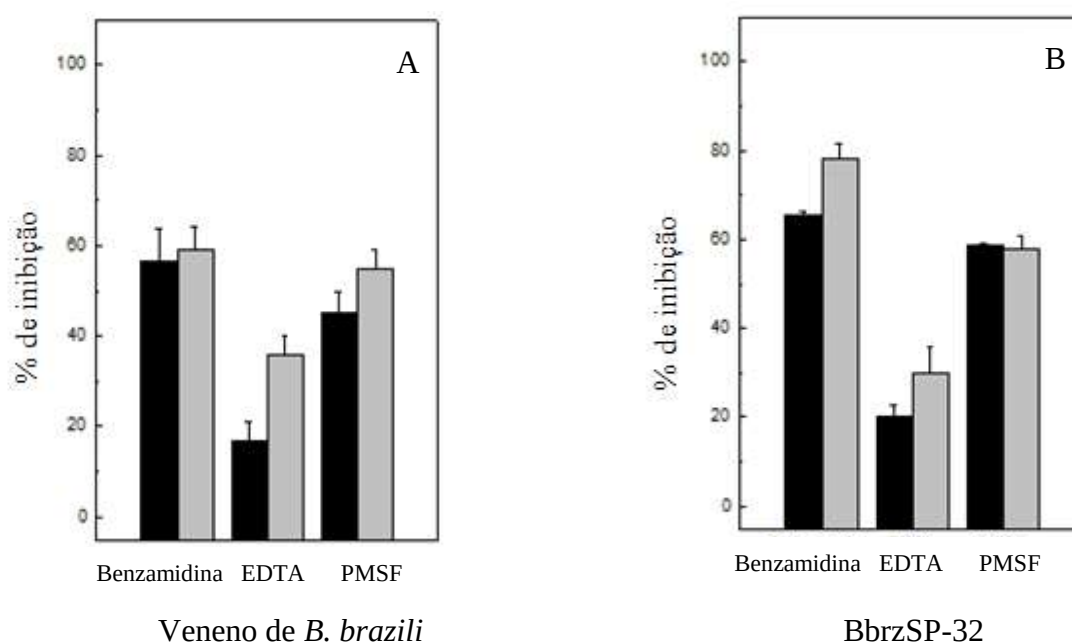
Com a intenção de se avaliar a capacidade de proteólise da BbrzSP-32, foram realizados ensaios de atividade enzimática sobre os substratos S-2238 (para enzimas trombina-símile) e S-2288 (para serinoproteases), os resultados de atividades sobre os substratos foram utilizados para a padronização de 100 % de atividade da BbrzSP-32 e serviram como base para os cálculos de inibição de atividade pelos compostos químicos utilizados.

O maior percentual de inibição da atividade trombina-símile do veneno de *B. brazili* foi de aproximadamente 62% e ocorreu após a incubação com benzamidina 5 mM (coluna preta) ou 10 mM (coluna cinza). O inibidor menos efetivo foi o EDTA, atingindo o máximo 39% de inibição. O PMSF, mesmo em concentração inferior à dos demais compostos, reduziu em aproximadamente 60% a ação trombina-símile do veneno (Figura 24 A).

Resultados similares foram observados com a BbrzSP-32, no entanto, as proporções de inibição da benzamidina sobre a ação proteolítica foram ainda mais

acentuadas, alcançando uma redução de aproximadamente 81%. O EDTA, nas maiores concentrações, interferiu na atividade da enzima isolada apresentando inibição de aproximadamente 36%. O PMSF foi hábil em reduzir até 60% da ação da SP sobre o substrato específico para as enzimas trombina-símile (Figura 24 B).

Figura 24: Efeito dos compostos químicos sobre a atividade do veneno de *B. brazili* e da BbrzSP-32 frente ao cromogênico S-2238 (para enzimas trombina-símile).

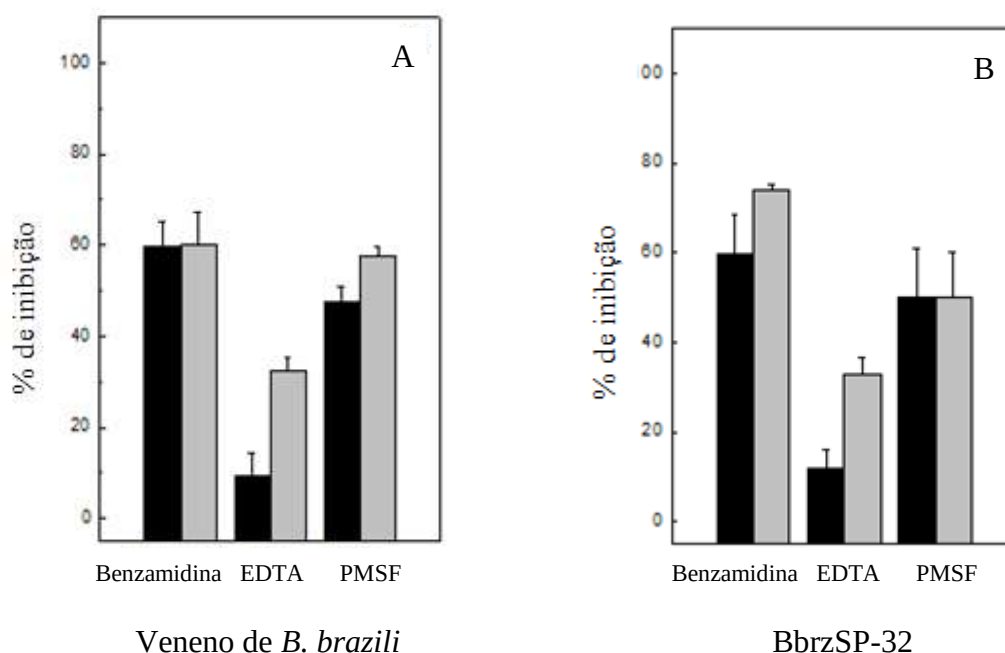


Os compostos químicos (Benzamidina, EDTA e PMSF) foram incubados durante 30 minutos à temperatura ambiente com veneno de *B. brazili* (6 µg/mL) ou com a serinoprotease (25 µg/mL), e, em seguida, a atividade enzimática sobre S-2238 (gráfico A para Veneno e gráfico B para BrzSP-32) foi realizada. Benzamidina: 5 mM (coluna preta) ou 10 mM (coluna cinza), EDTA: 5 mM (coluna preta) ou 10 mM (coluna cinza), PMSF: 1 mM (coluna preta), ou 3 mM (coluna cinza). Dados expressos como média ± DP de duas experiências individuais (n = 3).

A benzamidina foi hábil em inibir a atividade enzimática do veneno de *B. brazili* sobre o substrato cromogênico específico para serinoproteases em aproximadamente 67%. De maneira análoga aos experimentos com substrato para enzimas trombina-símile, o composto com menor influência sobre a atividade proteolítica foi o EDTA, com redução de 35% (na maior quantidade testada). O PMSF reduziu em aproximadamente 57% a ação do veneno sobre o S-2288 (Figura 25 A). A BbrzSP-32

apresentou taxas de inibição de até 77% após incubação com benzamidina, aproximadamente 60% por PMSF e em menor escala, por EDTA que inibiu em 37% a atividade enzimática (Figura 25 B).

Figura 25: Efeito dos compostos químicos sobre a atividade do veneno de *B. brazili* e da BbrzSP-32 frente ao cromogênico S-2288 (para serinoprotease).



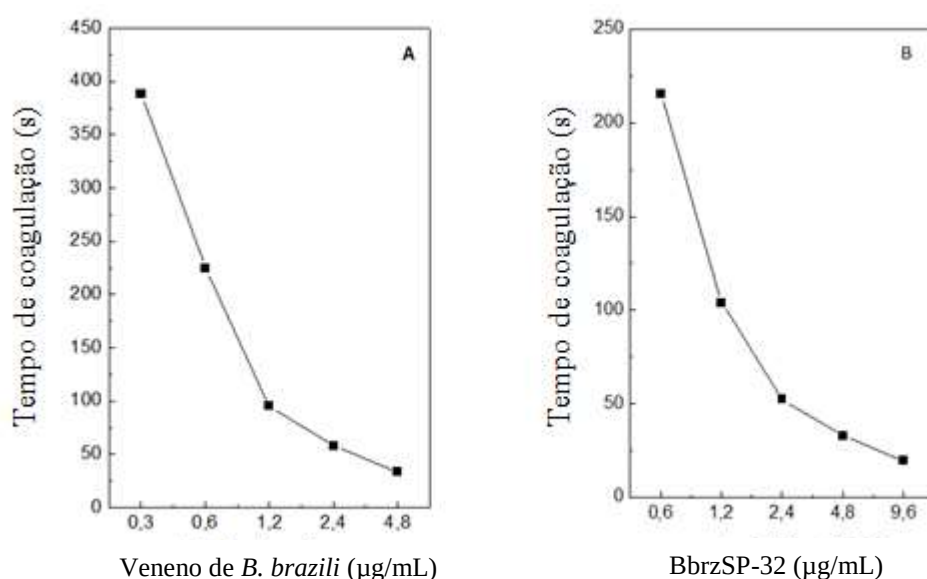
Os compostos químicos (Benzamidina, EDTA e PMSF) foram incubados durante 30 minutos à temperatura ambiente com veneno de *B. brazili* (6 µg/mL) ou com a serinoprotease (25 µg/mL), e, em seguida, a atividade enzimática sobre S-2288 (gráfico A para Veneno e gráfico B para BrzSP-32) foi realizada. Benzamidina: 5 mM (coluna preta) ou 10 mM (coluna cinza), EDTA: 5 mM (coluna preta) ou 10 mM (coluna cinza), PMSF: 1 mM (coluna preta), ou 3 mM (coluna cinza). Dados expressos como média ± DP de duas experiências individuais (n = 3).

4.10 Atividade Coagulante

Os resultados mostram que tanto o veneno (Figura 26 A) como a BbrzSP-32 (Figura 26 B) apresentam atividade pró-coagulante sobre plasma humano citratado, observado de maneira dose-dependente. O gráfico é expresso em concentração de veneno ou SP e tempo de coagulação e demonstra que a DMC, definida como a

quantidade mínima de veneno/proteína necessários para coagular 200µL de plasma humano citratado em 60 segundos foi de 2,4 µg/mL para veneno de *B. brazili* e, 1,2 µg/mL para a BbrzSP-32.

Figura 26: Efeito do veneno de *B. brazili* e da BbrzSP-32 sobre a coagulação.



Diferentes concentrações (0,3-4,8 µg/mL) de veneno e da enzima purificada (0,6-9,6 µg/mL) foram testadas sobre com plasma humano citratado o tempo de coagulação foi monitorado utilizando Coagulômetro. As quantidades mínimas de veneno e da BbrzSP-32 (µg/mL) que coagularam o plasma em 60 segundos são consideradas como o Dose Mínima Coagulante (DCM). Os dados são expressos como média $\pm$ DP de dois experimentos individuais (n = 3).

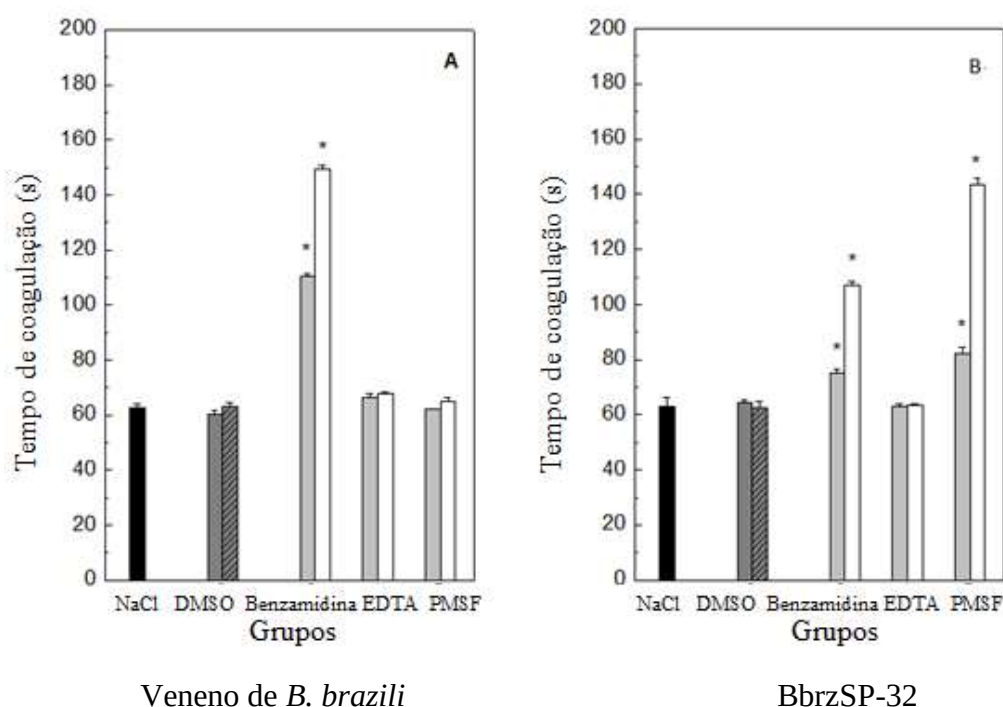
4.11 Efeito de Compostos Químicos sobre a Atividade Coagulante

Após determinada a DCM, foram realizados testes para avaliar a ação de interferência da benzamidina, EDTA e PMSF sobre a capacidade de coagulação. Para tanto, 2,4 µg/mL de veneno de *B. brazili* e 1,2 µg/mL de BbrzSP-32 foram pré-incubados por 30 minutos à temperatura ambiente com: 5 mM ou 10 mM de benzamidina e 1 mM ou 3 mM de PMSF (inibidores de serinoproteases), ou com 5 mM e 10mM de EDTA (inibidor de metaloprotease). Apenas a benzamidina foi capaz de

RESULTADOS

retardar o processo de coagulação sobre o plasma citratado ocasionado pelo veneno de *B. brazili* (Figura 27 A), aumentando o tempo de coagulação de 60 segundos para 110 segundos quando incubada com 5 mM e, para 150 segundos quando tratado com 10 mM de benzamidina. A ação coagulante da BbrzSP-32 foi afetada tanto pela benzamidina como pelo PMSF (Figura 27 B). 5 mM de benzamidina aumentou para até 79 segundos o tempo de coagulação e 10 mM de benzamidina fez com que o tempo necessário para que a SP coagulasse 200 μ L de plasma humano citratado fosse dobrado. O EDTA nas quantidades utilizadas não demonstrou nenhum efeito de redução das atividades coagulantes. Também, nem o DMSO (1,0% ou 3,0% v/v, concentração final) nem a solução salina interferiram na ação de coagulação do veneno ou da enzima isolada.

Figura 27: Efeito de inibidores sobre a atividade coagulante do plasma citratado induzida pelo veneno de *B. brazili* e BbrzSP-32.

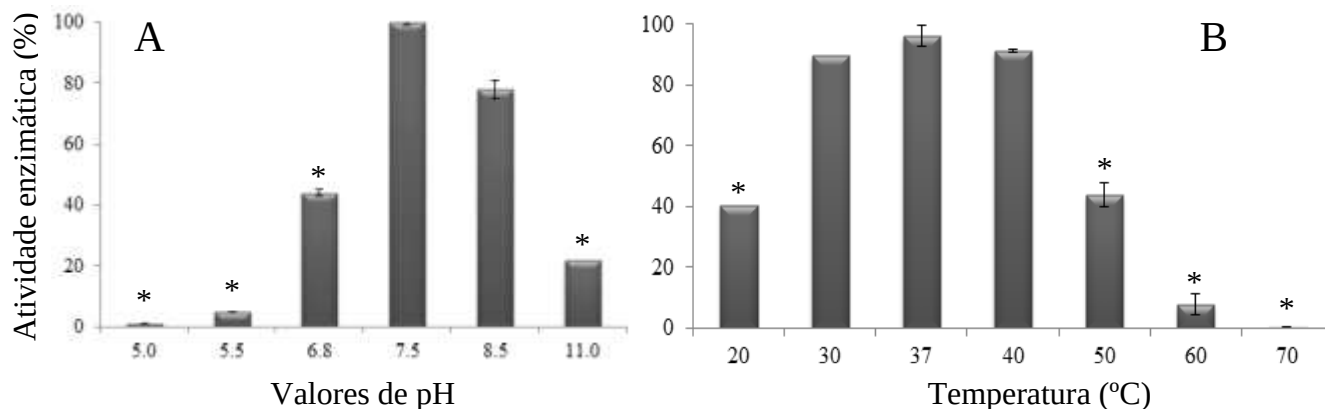


Os inibidores foram incubados durante 30 minutos à temperatura ambiente com 2,4 μ g/mL de veneno de *B. brazili* ou 1,2 μ g/mL de BbrzSP-32 e, em seguida, ensaiada com plasma. **Grupos 1:** veneno de *B. brazili* ou BbrzSP-32 incubado NaCl (colunas pretas); **Grupos 2:** veneno ou BbrzSP-32 incubado com DMSO 1% (coluna cinza) ou DMSO 3% (coluna cinza listrada); **Grupos 3:** veneno de *B. brazili* ou BbrzSP-32 incubado com benzamidina 5mM (coluna de cinza) ou com 10mM (coluna branca); **Grupos 4:** veneno de *B. brazili* ou BbrzSP-32 incubado com EDTA 5 mM (coluna cinza) ou com 10mM (coluna branca); **Grupos 5:** veneno de *B. brazili* ou BbrzSP-32 incubadas com PMSF 1 mM (coluna cinza) ou 3 mM (coluna branca). Dados expressos como média $\pm$ DP de dois experimentos indivíduos (n = 3). * Nível de Significância ($p \leq 0,05$), em comparação com as colunas 1 e 2.

4.12 Ensaio de Estabilidade frente à variação de pH e Temperatura

Depois de incubada em diferentes temperaturas, a BbrzSP-32 apresentou maiores atividades em intervalo de pH 7,5 a 8,5 e 30 a 40 °C, sendo as condições ideais de reação estabelecidas a 37 °C e pH 7,5. As atividades foram expressas como porcentagem de atividade sobre o substrato cromogênico S-2238 (para enzimas trombina-símile) por valor de pH e porcentagem de atividade enzimática sobre o substrato cromogênico BApNA por temperatura de pré-incubação (Figura 28). Os valores máximos resultantes dos ensaios foram admitidos como 100% de atividade e serviram como base para os cálculos da influência do pH e temperatura nas atividades da BbrzSP-32.

Figura 28: Atividade enzimática influenciada pelo pH e pela temperatura.



A BbrzSP-32 (2 µg) foi pré-incubada por 30 minutos com diferentes valores de pH (5,0-11,0) ou temperatura (20, 30, 37, 40, 50, 60 e 70 °C) e posteriormente as reações ocorreram com diferentes cromogênicos (S-2238 para o ensaio de variação de pH e Bapna para termoestabilidade) em tampão Tris-HCl 50 mM, pH 8,0 a temperatura ambiente. Os valores máximos resultantes dos ensaios foram admitidos com 100% de atividade e serviram como base para os cálculos de influência do pH e temperatura nas atividades da BbrzSP-32. Os resultados representam a média $\pm$ SD (n=3). * $p \leq 0,05$ em relação aos controles (7,5 para pH e 37 °C para temperatura) ANOVA.

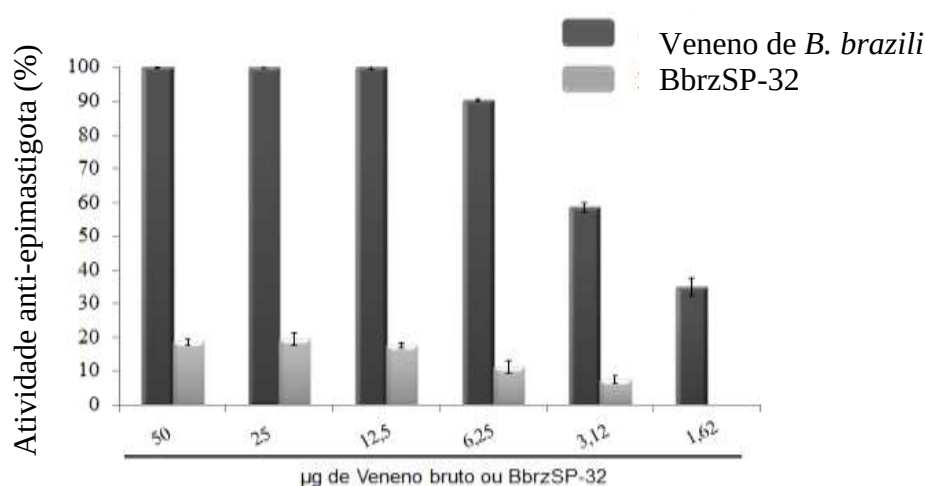
4.13 Agregação Plaquetária

A avaliação da BbrzSP-32 sobre plaquetas lavadas foi monitorada turbidimetricamente. Diferentes concentrações da SP foram incubadas com PL durante 5 minutos sob agitação a 37 °C e o processo de agregação foi desencadeado por adição de colágeno. Os resultados demonstraram que a BbrzSP-32 não induz nem interfere na agregação de plaquetas lavadas.

4.14 Teste de Susceptibilidade de Epimastigotas de *Trypanosoma cruzi*

O veneno de *B. brazili* mostrou-se eficaz na redução da viabilidade celular dos epimastigotas de *T. cruzi*, alcançando 100% de atividade anti-epimastigotas na concentração de 12,5 µg/mL. A BbrzSP-32 apresentou no máximo 20% de atividade anti-epimastigota sobre os *T. cruzi* (Figura 29). Os ensaios foram realizados buscando-se detectar os níveis de expressão de β galactosidade (β-Gal) medidos pela hidrólise catalítica do CPRG. A eficácia das amostras foi demonstrada através do cálculo da porcentagem de atividade anti-epimastigota (%AE).

Figura 29: Atividade anti *Trypanosoma cruzi* in vitro do veneno e da BbrzSP-32.

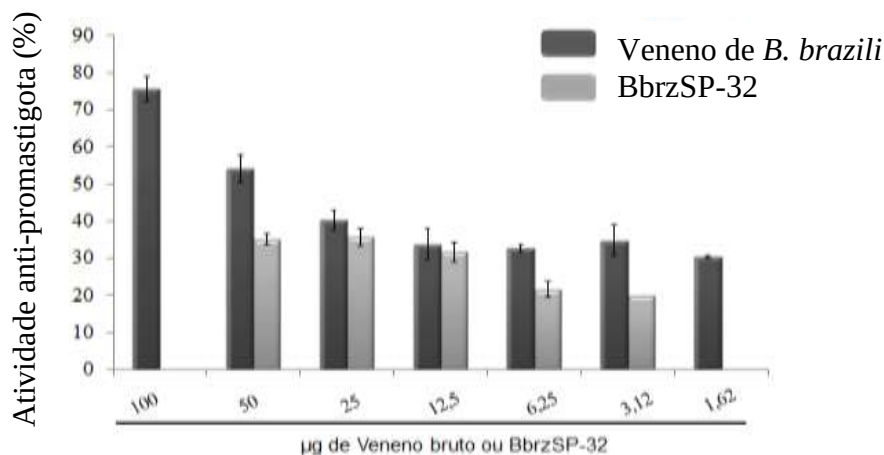


A citotoxicidade do veneno de *B. brazili* e da BbrzSP-32 sobre as formas epimastigotas de *T. cruzi* foi testada frente à incubação com diferentes doses de BbrzSP-32 ou veneno de *B. brazili*. Após a incubação a 28°C durante 72 horas, foi realizada a adição de 50µL de solução de CPRG e decorridas 6 horas (37°C) a leitura foi aferida a 595 nm, buscando-se detectar os níveis de expressão de β galactosidade (β-Gal) medidos pela hidrólise catalítica do CPRG. A eficácia de cada amostra foi demonstrada através do cálculo da porcentagem de atividade anti-epimastigota (%AE).

4.15 Teste de Susceptibilidade de Promastigota de *L. infantum*

Após incubação de promastigotas de *L. infantum* com veneno de *B. brazili* ou com BpirSP-32, pode-se verificar uma redução significativa na viabilidade dos referidos protozoários. A porcentagem de *L. infantum* viável, após a incubação com 100µg de veneno, foi de aproximadamente 20%, ou seja, o veneno apresentou citotoxicidade sobre os promastigotas de *L. infantum* de até 80%. A BbrzSP-32 apresentou até 39% de atividade anti-promastigota (Figura 30). O gráfico foi expresso em atividade de inibição do crescimento de promastigotas (%AP) por quantidade de veneno/enzima utilizados.

Figura 30: Atividade Anti promastigota de *Leishmania infantum* do veneno e da BbrzSP-32.



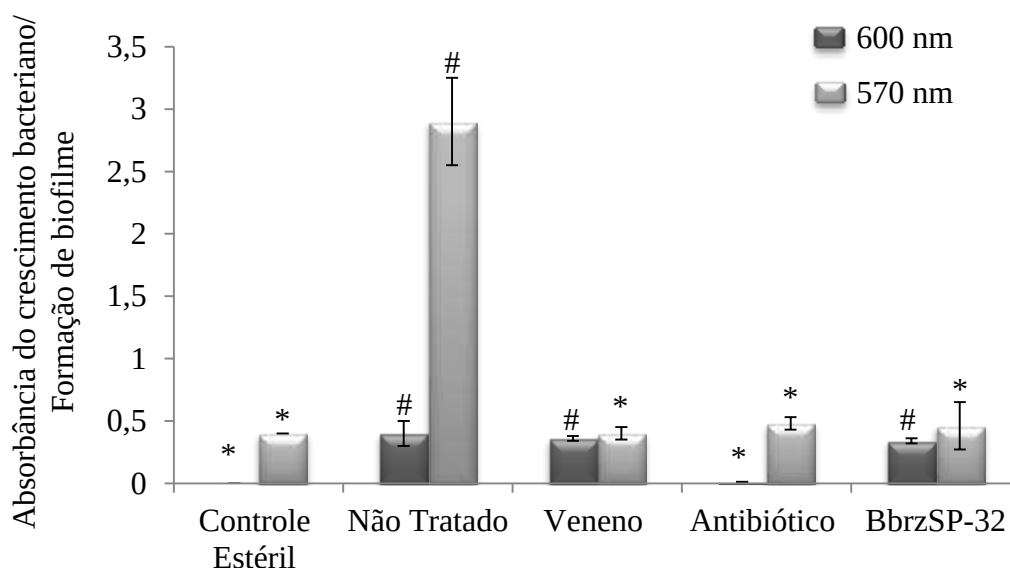
A citotoxicidade do veneno de *B. brazili* e da BbrzSP-32 sobre as formas promastigotas de *L. infantum* foi testada frente à incubação com diferentes doses de BbrzSP-32 ou veneno de *B. brazili*. Após a incubação a 26°C durante 72 horas, foi realizada a adição de 20µL de uma solução 2,5 mM de resazurina e a redução-oxidação foi quantificada a 570 e 595 nm. A eficácia de cada amostra foi demonstrada através do cálculo da porcentagem de atividade anti-promastigota (%AP). O gráfico foi expresso em porcentagem de atividade anti-promastigota (%AP) por quantidade de veneno/enzima utilizados.

4.16 Atividades antibacterianas e antibiofilme *in vitro*

Após a formação de biofilme, a BbrzSP-32 (500 µg/mL) foi incubada e sua capacidade em destruir biofilmes pré-formados, bem como, sua atividade antibacteriana contra esses microrganismos foi avaliada espectrofotometricamente.

A BbrzSP-32 mostrou-se hábil em reduzir a viabilidade de bactérias patogênicas da espécie *S. epidermidis*, bem como, reduziu significativamente a formação de biofilme produzido pela bactéria. Mostrou-se ainda mais eficiente que o antibiótico utilizado como controle no que tange à ação sobre o biofilme (Figura 31).

Figura 31: Atividade do veneno de *B. brazili* e da BbrzSP-32 frente à *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984 e Biofilme formado pela mesma.

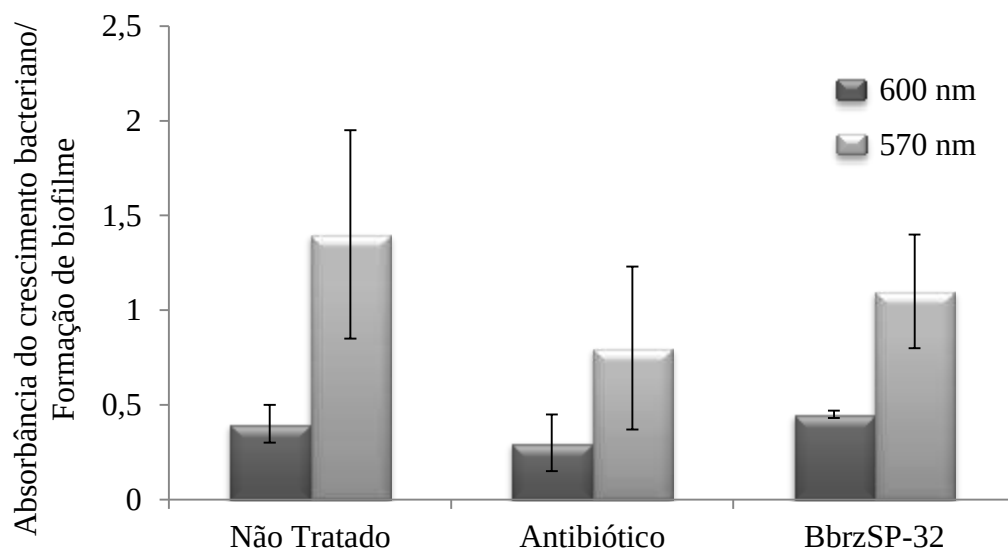


A avaliação da interferência da BbrzSP-32 (500 µg/mL) no crescimento de *Staphylococcus epidermidis* foi realizada pela diferença de inicial (t = 0 h) e final (t = 24 h), após incubação com as substâncias, em unidade de absorbância a 600 nm e a avaliação do potencial da enzima em reduzir o biofilme pré-formado foi avaliado em 570nm. O antibiótico utilizado foi Rifampicina (6µg / mL). #Estatisticamente significativo quando comparado ao estéril. *Estatisticamente significativo quando comparado ao não tratado (p≤0,05).

RESULTADOS

A enzima não mostrou interferência significativa sobre o crescimento de *P. aeruginosa* ATCC 27853 nem degradou o biofilme produzido pela supracitada espécie, apresentando resultados semelhantes às amostras controle (sem tratamento) (Figura 32).

Figura 32: Comparação da ação de antibiótico controle e da BbrzSP-32 frente à *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 e Biofilme formado pela mesma.



A avaliação da interferência da BbrzSP-32 (500 µg/mL) no crescimento de *Pseudomonas aeruginosa* foi realizada pela diferença de inicial (t = 0 h) e final (t = 24 h), após incubação com as substâncias, em unidade de absorbância a 600 nm e a avaliação do potencial da enzima em reduzir o biofilme pré-formado foi avaliado em 570nm. O antibiótico utilizado foi Gentamicina (6µg / mL). # Estatisticamente significativo quando comparado ao estéril. * Estatisticamente significativo quando comparado ao não tratado ($p \leq 0,05$).

5 DISCUSSÃO

A natureza é uma fonte incomensurável de produtos químicos com potenciais para aplicações biotecnológicas (CALVETE; JUÁREZ; SANZ, 2007; CALDERON et al., 2009; VONK et al., 2011). Comparado a esse elevado potencial, as pesquisas de base ainda deixam a desejar no que dizem respeito ao quantitativo de profissionais atuando na área de prospecção biotecnológica, bem como, ao investimento dispendido nessas pesquisas.

Diversas convenções são realizadas no intuito de propor medidas conservacionistas, porém, até então, sem êxito global. Na realidade, o que se observa são as constantes degradações com consequente perda de biodiversidade (MYERS et al., 2000; BUTCHART et al., 2010). Porém, ainda existem diversas áreas pouco conhecidas e que possuem potencial biotecnológico, denominadas *hotspots*, com necessidade de ampliações conservacionistas antes que não haja mais disponibilidade de material para estudos (JEPSON; CANNEY, 2001; TAN; GYLLENHAAL; SOEJARTO, 2006).

Com frequência diversos artigos relatam o uso da biodiversidade como potencial para a descoberta de novos fármacos (CHAPIN et al., 2000; CHIVIAN, 2002; ALBUQUERQUE; HANAZAKI, 2006; ALVES; ROSA, 2006; KINI, 2006; CALVETE; JUÁREZ; SANZ, 2007; CYRANOSKI, 2007; BARREIRO; BOLZANI, 2009; WARRELL, 2010; BUTCHART et al., 2010; SAJEVIC; LEONARDI; KRI??AJ, 2011; TRENTIN et al., 2011; VONK et al., 2011; KOH; KINI, 2012; JAIN; KUMAR, 2012). Dessa maneira, estudos com componentes que possuam futuras aplicabilidades são de extrema importância, justificando o estudo de compostos oriundos da natureza, tais como as toxinas animais.

5.1 Isolamento e Caracterização bioquímica e Estrutural

A BpirSP-32, previamente isolada em elevado grau de pureza após três passos cromatográficos (exclusão molecular, afinidade e fase reversa) por Zaqueo e colaboradores (2014), teve suas estruturas primária e terciária elucidadas. Além disso, foi realizado o isolamento da primeira serinoprotease proveniente do veneno da serpente *B. brazili* obtida depois de duas etapas cromatográficas (afinidade e fase reversa) (Figura 12 e Figura 14).

As técnicas cromatográficas sob alta pressão estão entre os procedimentos mais atualizados para o fracionamento de venenos de viperídeos e, podem, ser aplicadas de maneira única ou conjugadas, guiadas em função das características bioquímicas e/ou funcionais das proteínas que se pretende isolar (STÁBELI et al., 2012).

Geralmente, são necessárias mais de três etapas cromatográficas para a obtenção de proteínas dessa classe de enzimas em elevado grau de pureza (KOH; CHUNG; KIM, 2001; VIEIRA et al., 2004; COSTA et al., 2007; MAGALHÃES et al., 2007; PONCE-SOTO et al., 2007; GUEDES et al., 2008; LIU et al., 2008; OLIVEIRA-CARVALHO et al., 2008; PÉREZ et al., 2008; SANT'ANA et al., 2008; TAN, 2010; VILCA-QUISPE et al., 2010; MENALDO et al., 2012; ZAQUEO et al., 2014). Outra exceção foi descrita por Vilca-Quispe e colaboradores (2010), que isolaram, em apenas um passo cromatográfico em coluna de fase reversa, uma serinoprotease do veneno da serpente *Bothrops marajoensis*, denominada de TLBm, com atividades miméticas às da trombina.

A pureza da enzima isolada de *B. brazili* foi inicialmente confirmada por eletroforese (Figura 15) e, posteriormente, por espectrometria de massa (Figura 16). O resultado obtido após as análises realizadas aplicando-se a última metodologia auxiliou na denominação da mesma. Utilizando os mesmos critérios propostos por Zaqueo e colaboradores (2014), a serinoprotease recebeu a designação de BbrzSP-32: Bbrz por se tratar de uma enzima isolado do veneno de *Bothrops brazili*, SP, por pertencer a classe das serinoproteases e 32 em virtude de sua massa molecular (aproximadamente 32 kDa). A diferença entre as massas detectadas por eletroforese (36 kDa) e espectrometria (32.520,26 Da) deve-se, inicialmente ao fato de serem glicoproteínas e

às disparidades de sensibilidades dos métodos aplicados. Dessa maneira, os resultados demonstram indícios de que ambas as SPs são proteínas glicosiladas.

A quantidade de carboidratos é variável na classe de serinoproteases e essas diferentes taxas aparentam estar relacionadas às atividades desempenhadas por esse grupo de proteases. Uma vez que SPs com maiores quantidades de glicídios costumemente apresentam maiores atividades biológicas. Acredita-se que esses hidratos de carbono participem da estabilização da estrutura terciária dessas moléculas (CASTRO et al., 2004).

Tanto a BpirSP-39 (Figura 17) como BbrzSP-32 (Figura 18) apresentaram elevada identidade com outras SVSPs, o que pode ser corroborado pela análise comparativa da sequência N-terminal da BbrzSP-32 com outras serinoproteases de peçonhas de serpentes, demonstrando identidade de 98 % se comparada a Bothrombina, serinoprotease isolada de *B. jararaca*. Além disso, a sequência primária apresentou mais de 79 % de identidade às outras SVSP de serpentes botrópicas. Ainda, as análises corroboraram os 73,36 % de identidade com a serinoprotease da *Agkistrodon halys*, enzima usada como molde para a modelagem molecular (Tabela 2). Dados da literatura ratificam que as SVSP são enzimas que apresentam elevada identidade (CASTRO et al., 2004; KINI, 2005; COSTA et al., 2010; SERRANO, 2013).

Tabela 2: Porcentagem de similaridade entre a BbrzSP-32 e outras serinoproteases (EC:3.4.21) de serpentes.

Espécies	Nome	GI Número	Similaridade (%)
<i>Agkistrodon halys</i>	Thrombin	383280398	73,36
<i>B. jararaca</i>	Bothrombin	14285806	79,48
<i>B. atrox</i>	Batroxobin	114837	79,48
<i>B. leucurus</i>	Leucurobin	357580550	76,42
<i>B. jararacussu</i>	BjussuSP-1	123895619	71,62

Quando comparadas, as serinoproteases de *B. brazili* e *B. pirajai*, exibiram 74,58 % de identidade e 14,02 % dos resíduos de aminoácidos apresentam similaridade. As serinoproteases possuem vários aminoácidos em regiões conservadas, corroborando

com a elevada identidade apresentada pelas mesmas. Frequentemente, a valina é o aminoácido inicial da sequência N-terminal, ou sendo substituído por um com massa similar (isoleucina) (CASTRO et al., 2004). Ambas as proteases apresentam valina como o primeiro aminoácido e suas sequências mostram-se alinhadas de forma que a tríade catalítica esteja em consonância, de outra forma, os sítios de glicosilação preditos (asparaginas) apresentam-se em regiões diferentes, por mais que haja resíduo similar nas sequências alinhadas (Figura 33).

Figura 33: Alinhamento entre as sequências de BpirSP-39 e BbrzSP-32.

```

BpirSP-39 VIGGDECNINEHRFLVALYGKRSRGYFCGLTLINQEWVLTAHCDRKNFRIYLGIIHTRKV 60
BbrzSP-32 VIGGDECNINEHRFLVALYKS--HGYFCGLTLINQEWVLTAHCDRRFMRIYLGIIHTRKV 60
*****. :*****: :*****

BpirSP-39 LNEDEQTR----FLCPNGKKDDVLDKDIMLIRLDSPVSNSEHIAPLSLPSSPPSVGSVC 115
BbrzSP-32 LNEDEQTRYPKKFICPN--KNVITDKDIMLIRLDSPVSNSEHIAPLSLPSSPPSVGSVC 120
***** *:*** *: : *****

BpirSP-39 RIMGWGTISPT-KTNPDPVPHCANINLLDDAVCRAAYPELPAE--YRTLCAgilQGGIDSC 172
BbrzSP-32 RIMGWGTITP-SKTNPDVPHCANINLLDDAVCREAYAVDPAKT---LCAGILQGGIDSC 180
*****:* ***** ** **: *****

BpirSP-39 KGGDS----LCNGQFQGLLSWGSSKVCAQPRPKPALYTKVSDYTEWIKSIIAGNTDVTCP 224
BbrzSP-32 KGGDSGGPLICNGQFQGIVGS--DPCAEPRLKPAIYTKVFDYLDRERSIIAGNTAAACPP 240
***** :*****:. . **:*****:**** ** : :***** .:***

```

Asterisco (*) indica aminoácidos idênticos; dois pontos (:) indica conservação entre grupos de propriedades fortemente semelhantes; espaço () conservação entre grupos de propriedades fracamente semelhantes. "-" significa um resíduo de aminoácido desconhecido, os resíduos H, D e S destacados fazem parte da tríade catalítica das enzimas e os N correspondem aos sítios de glicosilação preditos.

O método utilizado para a elucidação da estrutura primária é eficaz, no entanto, provavelmente devido à carga líquida negativa dos fragmentos, houve supressão na análise MS/MS resultando em algumas lacunas nas duas sequências elucidadas, que resultaram em um prejuízo inicial na obtenção da sequência completa de aminoácidos. Para tanto, a modelagem, que é uma ferramenta de bioinformática que visa, além de prever a estrutura tridimensional, elucidar os aminoácidos que não foram identificados

durante o processo de sequenciamento proteico, foi realizada. Desta forma, as lacunas das serinoproteases foram preenchidas por homologia com uma enzima da mesma classe, isolada do veneno de *Agkistrodon halys* (PDB ID: 4E7N) (ZHENG et al., 2013). Esta abordagem apresenta resultados satisfatórios, com base no pressuposto que as estruturas terciárias das proteínas (molde e sequência elucidada) são semelhantes se as suas sequências estão relacionadas (KROEMER et al., 1996).

Os ensaios de validação da SP de *Agkistrodon halys* como modelo estrutural para a modelagem da BpirSP-39 (Figura 9 A e B) e da BbrzSP-32 demonstraram reduzidas variações média das estrutura das proteínas. Esses dados indicam um elevado nível de estabilidade para ambos modelos gerados (RANGWALA; KARYPIS, 2008), demonstrando a elevada qualidade dos modelos tridimensionais gerados.

A metodologia de modelagem aplicada na execução do trabalho mostrou-se eficaz, uma vez que, a porcentagem de resíduos presentes nas regiões permitidas, analisados por meio dos gráficos de Ramachandran (RAMACHANDRAN; RAMAKRISHNAN; SASISEKHARAN, 1963), que é um dos melhores guias de controle da qualidade estereoquímica de um modelo de proteína, demonstraram que para a Bpirsp-39 81,3% dos resíduos estão localizados em regiões permitidas e, apenas, 4,3% em regiões desfavoráveis e a qualidade do modelo da BbrzSP-39 foi ainda superior, apresentando 90,8% dos aminoácidos em regiões favoráveis. Ambos os modelos foram submetidos a testes de qualidade e comprovado que os aminoácidos que se encontram em locais desfavoráveis, de acordo com a predição, estão localizados em regiões de alça, conhecidas por apresentarem relativa dificuldade nos processos de modelagem (SANTOS FILHO; BICCA DE ALENCASTRO, 2003).

Após análise da modelagem, pode-se verificar que as duas enzimas podem assumir a forma de proteínas globulares com duas estruturas secundárias externas em α -hélice, folhas- β antiparalelas formando dois barris, além de 12 cisteínas formando 6 pontes dissulfeto e a tríade catalítica característica do grupo de TLEs (Figura 11e Figura 19). No modelo da BbrzSP-32 foi ainda demonstrado os dois sítios de ligações dos oligossacarídeos (asparaginas 96 e 138). Os resultados estão em consonância com trabalhos que elucidaram a estrutura tridimensional por cristalografia (ZHU et al., 2005).

5.2 Caracterização Enzimática

Com a realização da atividade fibrinogenolítica, pode ser constatado que a BbrzSP-32 é uma enzima α -fibrinogenolítica, pois age sobre a cadeias α do fibrinogênio, podendo ser avaliado em SDS-PAGE que a degradação da cadeia α é iniciada em aproximadamente 10 minutos após a incubação da BbrzSP-32 com o fibrinogênio bovino (Figura 20). Com relação à BpirSP-39, o ensaio fibrinogenolítico não foi realizado, no entanto, por induzir a degradação de solução de fibrinogênio formando um rede de fibrina estável, devido à ativação do fator XIII, há fortes indícios que a enzima é capaz de clivar ao menos as cadeias α e β do fibrinogênio. Portanto, com base nos resultados, os indícios sugerem que a BpirSP-39 seja uma SVTLE-AB (ZAQUEO et al., 2014) e, a BbrzSP-32, uma SVTLE-A.

Algumas serinoproteases de venenos de serpentes agem preferencialmente sobre a cadeia α do fibrinogênio, outras sobre a cadeia β , e existem ainda SPs que degradam ambas cadeias sem preferência (SWENSON; MARKLAND, 2005). Possivelmente, por se tratarem de enzimas, a concentração das mesmas e o tempo de incubação também são variáveis importantes a se avaliar.

Quando apenas um dos fibrinopeptídeos é clivado e não há conversão do fator XIII em XIIIa, sua forma ativa (que catalisa a união dos monômeros de fibrina), a rede de fibrina formada sofrerá polimerização limitada, não sendo estabilizada e, facilmente solubilizada pelo organismo do animal (BRAUD; BON; WISNER, 2000). A maioria das SVSPs não ativam o fator XIII da cascata de coagulação, porém, já foram descritas serinoproteases capazes de degradar ambas as cadeias do fibrinogênio (ao mesmo tempo, sem especificidade por uma) e após longos períodos de incubação, também demonstrando a capacidade de degradar a cadeia γ do fibrinogênio. Este é o caso da trombocetina, uma serinoprotease isolada da serpente *B. atrox* (NIEWIAROWSKI et al., 1979) e da Cerastocytina, SP de *Cerastes cerastes* que conseguem ativar o fator XIII, no entanto, apresentam-se menos ativas que a trombina no processo de indução da coagulação plasmática (MARRAKCHI et al., 1997).

A BbrzSP-32, possui ação fibrinolítica (Figura 21). Outro dado interessante deste resultado é que a serinoprotease não é a única enzima presente no veneno de *B. brazili* que apresenta essa atividade, pois a primeira unidade amostral utilizada (1 μ g de

enzima pura) apresenta 3,13 % mais serinoprotease que os 40 µg de veneno de *B. brazili* e, ainda assim, a ação fibrinolítica observada foi maior no veneno. Porém, o veneno, mesmo em maior quantidade, não foi capaz de degradar mais coágulo de fibrina que os 8 µg de BbrzSP-32, ainda havendo, no veneno, outras proteínas que possuem atividade fibrinolítica como é o caso das metaloproteases (KAYANO et al., 2015). Desta maneira, fica evidente que a ação fibrinolítica, está intimamente relacionada com a presença de enzimas da classe das serinoproteases, mas não apenas a elas. Ou ainda, que existe sinergismo entre componentes no veneno levando a uma ação fibrinolítica mais eficaz.

Assim como a BbrzSP-32, muitas das serinoproteases apresentam as características: fibrinogenolíticas e fibrinolíticas, e são classificadas em fibrina(ogeno)líticas. Segundo Swenson e Markland (2005) pequenas alterações na sequência ou estrutura dessas proteínas têm elevado impacto na classificação das mesmas.

A BbrzSP-32 possui ação trombolítica (Figura 22), porém, aparenta possuir maior atividade fibrinolítica (Figura 21). Três hipóteses podem ser levantadas: (i) pode haver necessidade de um maior tempo de reação para a dissolução do coágulo, uma vez que, com o maior tempo de incubação a dissolução foi mais representativa (ii) a BbrzSP-32 possivelmente apresente menor atividade sobre coágulos, ou ainda seja inibida por componentes da cascata da coagulação (iii) devem haver outros componentes no veneno que induzem à ação trombolítica, ou ainda, a ação sinérgica entre componentes do veneno e/ou da cascata, consome o coágulo com maior eficiência quando comparado apenas à ação da BbrzSP-32.

Componentes do veneno podem converter o plasminogênio em plasmina, e, essa por sua vez, é capaz de degradar os coágulos sanguíneos. É importante ressaltar que o maior constituinte do trombo é a fibrina, porém, com o teste trombolítico existem outras variáveis relacionadas à cascata de coagulação e essas podem estar deflagrando a ação de degradação do trombo (HART; SPANNAGL, 2014).

A BbrzSP-32, além de apresentar as atividades fibrinogenolítica, fibrinolítica e trombolítica, é capaz de degradar gelatina. Na Figura 23 é possível perceber que o padrão de migração da proteína foi dificultado, isso ocorreu em virtude da incompleta desnaturação da amostra, o que dificulta a absorção do SDS pela cadeia de aminoácidos.

Uma vez que a proteína continue mantendo sua estrutura terciária, uma menor quantidade desse detergente iônico conseguirá se ligar aos resíduos de aminoácidos, resultando em uma menor quantidade de carga negativa junto à amostra e, conseqüentemente, a migração da proteína ao polo positivo não ocorrerá da mesma maneira que quando desnaturada (SCHÄGGER, 2006). Essa técnica de zimografia demonstra a capacidade da enzima em degradar gelatina (SNOEK-VAN BEURDEN; VON DEN HOFF, 2005).

As atividades proteolíticas do veneno de *B. brazili* e da BbrzSP-32 (Figura 24 e Figura 25) foram reduzidas por PMSF e benzamidina (inibidores clássicos de serinoproteases) e, em menor quantidade, por EDTA (inibidor de metaloproteases). A redução de atividade verificada pela incubação do veneno com benzamidina e PMSF demonstrou que as serinoproteases possuem importante papel na degradação dos substratos S-2238 e S-2288 ocasionadas pelo veneno, sendo essa redução maior que 45% para ambos os substratos, em todas as concentrações testadas; apresentando uma relação entre o aumento da quantidade de PMSF com conseqüente redução das ações proteolíticas da enzima (Figura 24 e Figura 25). As porcentagens de redução de atividade tanto do veneno quanto da serinoprotease, sobre os substratos (S-2238 e S-2288), foram bem similares.

O Ácido Etileno Diamino Tetracético (EDTA) é um quelante de grupos prostéticos de cátions divalentes (NOWACK; FEDERAL, 2002), que exibe uma baixa ação, quando comparado aos inibidores específicos de serinoproteases. Aparentemente, algum componente de natureza não-proteica pode influenciar na atividade da BbrzSP-32. Estudos adicionais são necessários para verificar essa hipótese (Figura 24 e Figura 25). O que não é comum para essa classe de enzimas, como verificado por Menaldo e colaboradores (2012) que isolaram e caracterizaram duas isoformas de serinoprotease do veneno de *B. pirajai* as quais não apresentaram redução de suas atividades sobre substrato S-2238, além de não sofrerem alteração em suas atividades esterásicas após incubação com o mesmo inibidor. Resultados semelhantes aos de Menaldo e colaboradores (2012) foram relatado por Sant'Ana e colaboradores (2008). Esses autores não verificaram alteração na capacidade coagulante nem fibrinogenolítica da enzima BjussuSP-I, após incubação com EDTA.

Os inibidores de protease são amplamente utilizados para prevenir a indesejável degradação de proteínas durante os processos de isolamento e podem ser amplamente classificados em dois grupos, com base no mecanismo de ação: os que se ligam de maneira não covalente aos aminoácidos que compõem o sítio enzimático, podendo ser reversíveis; e os que se ligam covalentemente ao local ativo da serinoproteases ou atuando como alostéricos, modificando-as irreversivelmente e, conseqüentemente, tornando-as inativas (SHARMA; RADHA KISHAN, 2011).

O PMSF é um exemplo de inibidor que possui capacidade de se ligar de maneira covalente aos resíduos de serina do sítio catalítico das serinoproteases, tornando-as inativas, o que pode ser confirmado pelos ensaios proteolíticos sobre substratos cromogênicos S-2238 e S-2288 e, sobre a atividade coagulante.

Geralmente, as serinoproteases de peçonhas de serpentes não são sensíveis à ação de inibidores endógenos, as serpinas, como a antitrombina-III e a aprotinina (SERRANO; MAROUN, 2005; SERRANO, 2013).

A proteína purificada do veneno de *B. brazili*, é uma serinoprotease que apresenta elevada atividade coagulante sobre o plasma citratado. Em diferentes concentrações, a enzima foi capaz de induzir esta coagulação. Essa atividade foi confirmada através de análise dose-resposta realizada para obtenção da dose coagulante mínima sobre o plasma (DCM) determinada em 1,2 µg de proteína (Figura 26).

A maioria das serinoproteases descritas até o momento apresenta capacidade coagulante. Algumas apresentam essa atividade reduzida, geralmente tratando-se de glicoproteínas com baixa taxa de glicídios (WHITE, 2005; PONCE-SOTO et al., 2007; COSTA et al., 2010). Há apenas um grupo de serinoproteases cataliticamente inativas (WU et al., 2008), e neste grupo, a ausência de atividade enzimática deve-se a substituição da Histidina presente na tríade catalítica por uma Arginina na posição 53.

A atividade de coagulação *in vitro* dos venenos da família Viperidae está associada a grupos específicos de proteases: as serinoproteases e as metaloproteases. Os ensaios de inibição foram realizados usando PMSF, benzamidina (inibidores característicos de serinoproteases, irreversível e reversível, respectivamente) ou EDTA (inibidor característico de metaloproteases) (SMITH; CUSUMANO; BABBS, 1990).

Diferente do observado com relação às atividades sobre substratos cromogênicos, o EDTA não apresentou qualquer interferência na capacidade coagulante, nem do veneno de *B. brazili* nem da BbrsSP-32. Com relação ao processo de coagulação sobre o plasma citratado ocasionado pelo veneno de *B. brazili*, apenas a benzamidina foi capaz de retardá-lo, demonstrando que, existem outros componentes no veneno bruto que induzem à referida atividade.

As atividades coagulantes da BbrzSP-32 foram significativamente reduzidas após incubação da enzima com seus inibidores clássicos (benzamidina e PMSF), corroborando seu status de serinoprotease (Figura 27). O PMSF induziu a uma maior redução na atividade coagulante, mesmo sendo utilizado em menores quantidades que os demais inibidores, o que se deve ao fato de ser um inibidor irreversível. Menaldo e colaboradores (2012) demonstraram que duas serinoproteases isoladas de *B. pirajai* tiveram suas atividades coagulantes, fibrinogenolíticas e esterásicas reduzidas após incubação com PMSF, benzamidina e leupeptina, porém o PMSF influenciou em menor grau a atividade da BpirSP41, os autores propuseram que, possivelmente, por essa ser a enzima com maior quantidade de N-glicanas, essas poderiam conferir uma certa proteção ao resíduo serina do sítio ativo.

Finalizando os resultados de caracterização enzimática, a BrzSP-32 foi testada quanto à sua estabilidade frente a variação de fatores que podem levar a um processo de degradação da molécula proteica. A classe das serinoproteases é conhecida por possuir enzimas com elevada capacidade em resistir a variações de temperatura e pH (Figura 28), outras enzimas, como as metaloproteases são rapidamente inativadas quando expostas a pHs alcalinos ou ácidos e/ou elevadas temperaturas (SWENSON; MARKLAND, 2005).

Com relação às SPs, a estabilidade deve-se ao fato destas possuírem 12 resíduos de cisteína que formam 6 pontes dissulfeto (frequentemente entre os pares 22-157, 42-58, 91-250, 136-201, 168-182 e 191-220) (CASTRO et al., 2004), conferindo dessa maneira, uma resistência em sua estrutura tridimensional. As maiores atividades da enzima encontram-se em pH e temperatura próximos aos do corpo de suas presas. Estes eventos que podem estar relacionados ao fato de seus alimentos serem pecilotérmicas ou endotérmicas, ou seja, no caso das primeiras (pecilotérmicas), terem a temperatura corporal controlada pela temperatura ambiental e, no caso das segundas, possuírem

temperatura média de 37 °C. Além disso, os tipos de presas possuem pH fisiológico em torno de 7,4. Sendo assim, teoricamente, essas proteínas estariam com maior atividade enzimática quando inoculadas em suas vítimas.

A BbrzSP-32, nas concentrações testadas, não foi capaz de induzir ou inibir a agregação plaquetária, assim como a BjussuSP-I de *B. jararacussu* (SANT' ANA et al., 2008) e divergindo da maioria das SVSPs que frequentemente possuem atividade sobre a agregação plaquetária. Dentre as SVSPs que atuam sobre a agregação plaquetária, não existe um consenso de ação, cada grupo enzimático possui particularidades quanto ao mecanismo de ativação das plaquetas. Algumas agem de maneira análoga à trombina, ou seja, independente do fibrinogênio (SERRANO et al., 1995), outras, já necessitam da presença do fibrinogênio para que a agregação ocorra (VILCA-QUISPE et al., 2010).

5.3 Prospecção Biotecnológica

Na atualidade, ainda existem doenças relacionadas às condições de pobreza, bem como, contribuindo para a manutenção do quadro de desigualdade, uma vez que representam forte entrave ao desenvolvimento dos países. Embora seja reportado um aumento no número de drogas desenvolvidas para o combate das referidas doenças, ainda há necessidade significativa de investimentos na área (MAN et al., 2008; COHEN; DIBNER; WILSON, 2010). A essas doenças é alcunhado o termo Doenças Negligenciadas (FEASEY et al., 2010; BROADBENT, 2011). Em 2012, a Fundação Oswaldo Cruz anunciou a assinatura de um acordo colaborativo para o desenvolvimento de novos medicamentos e vacinas para doenças negligenciadas típicas das regiões tropicais (VAN DER VAART et al., 2012). Dentre essas destacam-se três protozoonoses tidas como extremamente negligenciadas: a Leishmaniose Visceral (tendo as espécies *Leishmania donovani*, *Leishmania infantum* e *Leishmania chagasi* como agentes etiológicos), a Doença de Chagas (*Trypanosoma cruzi*) e a Doença do Sono (*T. gambiense*) (WHO, 2013).

O interesse biotecnológico das proteínas de venenos de serpentes é justificado pela possível aplicabilidade clínica (KOH; ARMUGAM; JEYASEELAN, 2006; CALVETE; JUÁREZ; SANZ, 2007).

As principais protozoonoses brasileiras causadas pelos protozoários flagelados são a Doença de Chagas (*T. cruzi*) e as Leishmanioses (*Leishmania* sps) (COURA et al., 2002; DIAS; SILVEIRA; SCHOFIELD, 2002; DA SILVA et al., 2009; DAHROUG et al., 2010; RASSI JR; RASSI; MARIN-NETO, 2010; RASSI; MARIN-NETO, 2010).

5.3.1 BbrzSP-32 x Protozoonoses

5.3.1.1 *Trypanosoma cruzi*

A BbrzSP-32 foi testada quanto à sua capacidade anti-tripanosoma frente a epimastigotas de *T. cruzi*, demonstrando capacidade em reduzir a viabilidade dos mesmos. No entanto, o veneno de *B. brazili* apresentou atividades mais efetivas, demonstrando que testes com outras proteínas do veneno são promissores, uma vez que, poderão resultar no encontro de agentes importantes contra o protozoário testado. Os resultados de citotoxicidade do veneno sobre os espécimes de *T. cruzi* apresentaram resultados com inibição de até 100% das culturas de parasitos nas maiores concentrações de veneno testadas. Esta atividade pode estar relacionada a uma proteína ou, mais provavelmente, à ação sinérgica de proteínas do veneno (Figura 29).

O *Trypanosoma cruzi* é um protozoário parasito causador da Doença de Chagas (RASSI; MARIN-NETO, 2010; RASSI; MARCONDES DE REZENDE, 2012), descrito em 1909 (RASSI; MARIN-NETO, 2010), anteriormente restrito ao meio silvestre, que devido às devastadoras ações antrópicas sobre o meio ambiente, o homem se fez inserir no ciclo de vida dos mesmos. A infecção chagásica humana é, principalmente, resultante da picada do vetor hemíptero, porém, até mesmo vias de transmissão oral já foram descritas (VINHAES; DIAS, 2000; DIAS, 2006; MAGNANI; DIAS; GONTIJO, 2009).

A manifestação da doença é caracterizada por uma fase aguda, seguida de fase crônica, que tipicamente se contemporiza por toda a vida do hospedeiro (MARIN-NETO et al., 2007). Essa doença é considerada um relevante problema de saúde pública em vários países da América Latina, bem como, ao sul dos Estados Unidos, levando a complicações socioeconômicas de grande extensão e complexidade (DIAS et al., 2009a).

Até então, a quimioterapia contra a Doença de Chagas consiste no uso de algumas substâncias tais como Nitrofurazona, violeta de genciana como agente profilático em bancos de sangue, nifurtimox (Lampit[®] Bayer) e benzonidazol (Rochagan[®] Roche). Os dois últimos atuam na formação de radicais livres e/ou metabólitos eletrofílicos, apresentando dessa maneira, baixa especificidade de ação em vias bioquímicas exclusivas do parasito. Por apresentarem reduzida especificidade, muitas vezes possuem efeitos tóxicos aos pacientes, que vão desde perda de peso, sonolência, manifestações digestivas, hipersensibilidades, parestesias e polineurite (COURA; DE CASTRO, 2002; DIAS, 2009; DIAS et al., 2009a, 2009b; MAYA et al., 2010), justificando a necessidade da busca constante por novos quimioterápicos.

5.3.1.2 Leishmanioses

A BbrzSP-32 foi testada quanto à sua capacidade anti-leishmania sobre formas promastigotas de *Leishmania infantum*, espécie que causa leishmaniose visceral. Essa serinoprotease demonstrou capacidade em reduzir a viabilidade dos promastigotas da referida espécie, e apresentou resultados similares aos do veneno de *B. brazili* para os ensaios com 25 e 12,5 µg (Figura 30). As leishmanioses são um conjunto de doenças causadas por espécimes do gênero *Leishmania* que didaticamente, são divididas em dois grupos: leishmaniose tegumentar americana (com ação na pele e nas mucosas) e visceral (com atividade direcionada aos órgãos internos) (ORGANIZATION; LEISHMANIASES, 2010; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2010; PIGOTT et al., 2014; READY, 2014). Essas protozoonoses afetam outros animais além do homem e constituem um problema de saúde pública (MIRÓ et al., 2008; SARIDOMICHELAKIS; KOUTINAS, 2014; SOARES; DUARTE; SOUSA, 2015).

A terapia convencional mais comumente empregada no tratamento de acometidos por leishmanioses é embasada em fármacos antimoniais, além de outros medicamentos, dentre os quais se destacam: pentamidina, anfotericina B, paromomicina e miltefosine. Porém, estes possuem eficácia variável, custo relativamente elevado e acentuada toxicidade (CROFT; SUNDAR; FAIRLAMB, 2006; MONZOTE, 2009; WORLD HEALTH ORGANIZATION; WHO, 2012).

Escassos trabalhos relatam a atividade de serinoproteases contra protozoários. De outra maneira, diversos artigos relatam a atividade do veneno e de proteínas isoladas frente a uma gama variada de microrganismos. Em 1994, Fernandez-Gomes e colaboradores compararam a atividade do veneno de *Cerastes cerastes*, *Naja haje* e *Vipera lebetina*, sobre o crescimento de *T. cruzi* e *L. infantum in vitro* e compararam à benzonidazol (FERNANDEZ-GOMEZ et al., 1994). Gonçalves e colaboradores (2002) demonstraram que o veneno de *Bothrops jararaca* foi capaz de inibir o crescimento de promastigotas de *Leishmania major* e epimastigotas de *T. cruzi* e Deolindo e colaboradores (2005) evidenciaram que o veneno bruto da mesma espécie foi capaz de induzir os *T. cruzi* a morte (GONÇALVES et al., 2002; DEOLINDO et al., 2005). Torres e colaboradores (2010) isolaram a BleuLAAO, uma L-aminoácido oxidase do veneno de *B. leucurus* que mostrou-se capaz de inibir o crescimento de *S. aureus*, *Leishmania sp.*, e *T. cruzi*, ademais não mostrou-se tóxica frente a incubação com macrófagos (TORRES et al., 2010).

Dentre as perspectivas do Programa Especial para Pesquisa e Treinamento em Doenças Tropicais (TDR) da Organização Mundial de Saúde destaca-se a busca pelo desenvolvimento de novos testes diagnósticos para a detecção de casos, bem como, a prospecção de novas drogas para Tripanossomíase e Leishmanioses (DISEASE; TRYPANOSOMIASIS, 2012), dessa maneira, trabalhos que visem o encontro de novas ferramentas moleculares com atividades sobre protozoonoses apresentam elevado apreço.

5.3.2 Atividade Antibacteriana e Antibiofilme da BbrzSP-32

O Domínio Bactéria é representado por microrganismos unicelulares e procarióticos, adaptáveis a diversos tipos de ambientes. As bactérias podem ser encontradas em dois estados básicos de vida: como células planctônicas, ou seja, de vida livre ou como células sésseis, constituindo biofilmes (DA SILVA TRENTIN; GIORDANI; MACEDO, 2013).

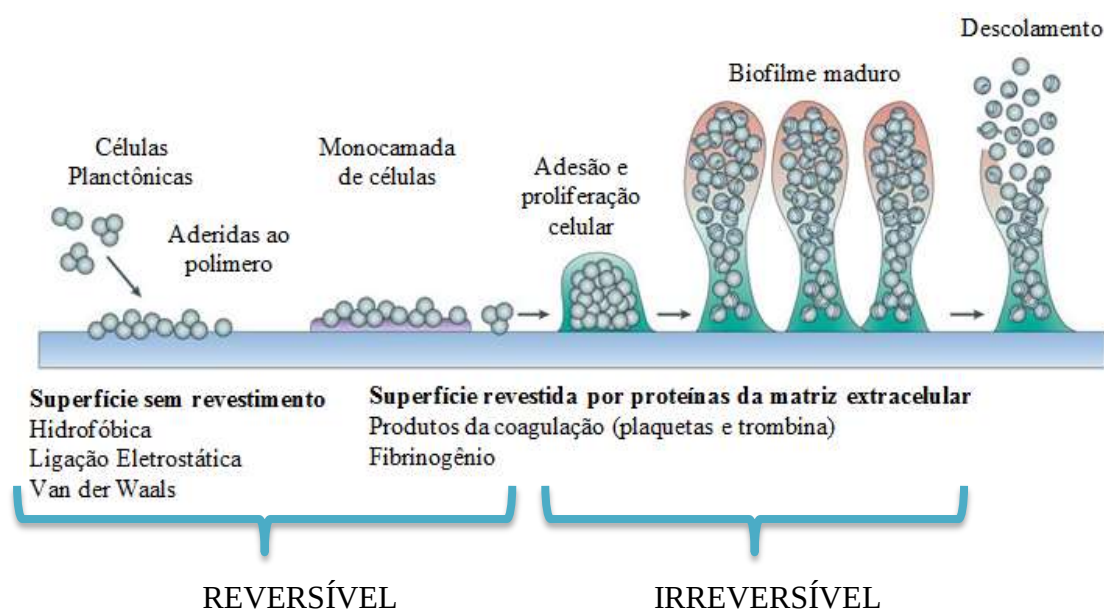
Dessa maneira, biofilmes bacterianos são aglomerações multicelulares de microrganismos sobre uma superfície com estrutura tridimensional e fisiológica

características, além disso, formam a base de resistência a muitos antibióticos e mecanismos de defesa do hospedeiro (O'TOOLE; KAPLAN; KOLTER, 2000; OTTO, 2009).

Formam-se por uma ação inicial de adesão celular, que pode ocorrer por Pontes de Van der Waal, ligações hidrofóbicas ou eletrostáticas (sendo estes reversíveis) e processo secundário com a interação das células com a superfície por meio de matriz extracelular de glicocálix (Figura 34). Quando maduros, são compostos por canais cheios de fluidos, sendo estes importantes nos processos de dispersão de nutrientes para todas as células que congregam no biofilme e dão ao biofilme maduro, a sua estrutura tridimensional normal. Forças destrutivas também estão envolvidas no destacamento de grupos de células do biofilme, o que limita a expansão deste e pode levar à disseminação da infecção (O'TOOLE; KAPLAN; KOLTER, 2000; VUONG; OTTO, 2002; HALL-STOODLEY; COSTERTON; STOODLEY, 2004; OTTO, 2009). Dois mecanismos de descolamento têm sido propostos: degradação enzimática do biofilme e exopolímeros e interrupção da interação não covalente de moléculas de tipo detergente (OTTO, 2009).

Os biofilmes representam um problema frente aos antibióticos convencionais, pois resguardam alguns procariontes mesmo após o uso dos medicamentos (HALL-STOODLEY; STOODLEY, 2005). Compostos que possuem atividade reguladora do crescimento de biofilmes (inibindo e/ou destruindo) atraem interesses biotecnológicos, uma vez que podem representar uma alternativa para o tratamento de diversos caracteres, dentre elas, problemas hospitalares.

Figura 34: Formação de Biofilme bacteriano.



Representação esquemática dos estágios, reversíveis e irreversíveis, do desenvolvimento dos biofilmes, findando com o processo de descolamento, adaptado de Vuong e Otto (2002) e Otto (2009).

5.3.2.1 *Staphylococcus epidermidis*

É uma espécie de bactéria gram-positiva que compõe a flora bacteriana normal na pele e membranas mucosas do corpo humano e por esse motivo, durante muitos anos foi considerada como relativamente inócua. No entanto, na atualidade, pertence ao conjunto de microrganismos patogênicos oportunistas e uma das mais importantes causas de infecções hospitalares (RAHME et al., 1995; SOLOMON et al., 2002; VUONG; OTTO, 2002; ROSENTHAL et al., 2008, 2010, 2012).

O grande problema relacionado a essa espécie de microrganismo deve-se ao fato da mesma ser a mais importante causa de infecções nosocomiais nos últimos anos devido à capacidade de produzir biofilmes (VUONG; OTTO, 2002) e por isso, colonizar diferentes dispositivos médicos, tais como cateteres e próteses (DONLAN; COSTERTON, 2002). Essas infecções geralmente começam com a introdução de bactérias a partir da pele do paciente ou dos profissionais da saúde durante a inserção do dispositivo e têm aumentado em número, muito provavelmente, devido ao aumento da utilização de tais dispositivos (OTTO, 2009). A adesão a superfícies abióticas, como

cateteres, é regida, principalmente, pelo caráter hidrofóbico da superfície celular (VACHEETHASANEE et al., 1998).

A serinoprotease demonstrou capacidade em reduzir a viabilidade de procariotos da espécie *S. epidermidis* e, além disso, apresentou melhores resultados sobre o biofilme produzido pelas mesmas (Figura 31). As metodologias aplicadas não nos permitem explicar qual o mecanismo de ação das serinoproteases sobre os microrganismos, e estudos posteriores auxiliarão no entendimento desses mecanismos.

5.3.2.2 *Pseudomonas aeruginosa*

É uma espécie de bactéria Gram-negativa muito versátil que cresce no solo, pântanos e habitats marinhos costeiros, bem como, em tecidos de plantas e animais, possuindo habilidade em formar biofilmes. Por suas características e versatilidade metabólica pode causar infecções nosocomiais graves, podendo resultar em morbidade e mortalidade significativas entre os seres humanos comprometidos (RAHME et al., 1995; COSTERTON; STEWART; GREENBERG, 1999, 2011; STULBERG; PENROD; BLATNY, 2002). A BbrzSP-32 não demonstrou atividade significativa sobre o mesmo (Figura 32).

Diversos componentes de veneno de serpentes têm apresentado interessante atividade microbiológica, mostrando-se ativos sobre plasmódios, vírus, bactérias, fungos, leishmanias e células tumorais (ZIELER et al., 2001; KOH; ARMUGAM; JEYASEELAN, 2006; CISCOTTO et al., 2009; STUTESMAN, 2010; CALDERON et al., 2014). Ciscotto e colaboradores (2009) evidenciaram elevada atividade inibitória de bactérias gram-positivas e gram-negativas nos venenos das serpentes *B. jararaca* e *B. jararacussu*.

5.4 Bioprospecção

Apesar dos acidentes com serpentes apresentarem elevada ação sobre a motilidade e mortalidade humanas, os venenos desses animais mostram-se eficientes para diversas aplicações terapêuticas (PAL et al., 2002; KOH; ARMUGAM; JEYASEELAN, 2006).

As serinoproteases, por exemplo, são utilizadas na clínica há mais de 50 anos. Algumas das principais aplicações são demonstradas na (Tabela 3).

Tabela 3: Algumas das principais aplicações de serinoproteases isoladas de venenos de serpentes.

Veneno de:	Nome comercial	Aplicação Clínica	Referência
<i>B. atrox</i> e <i>B. moojeni</i>	Defibrase®	Vítimas de trombose, infarto do miocárdio, doenças vasculares periféricas, isquemia aguda e rejeição de transplante renal. Agente defibrinogénantes	(WU; WANG, 1989; LI; GAI; WANG, 1990; HUANG et al., 1992; WU; HUANG, 2005; CAI et al., 2009)
<i>B. atrox</i> , <i>B. moojeni</i> e <i>B. jararaca</i>	Reptilase®	Droga hemostática e Utilizada no diagnóstico de problemas no sistema de coagulação sanguínea	(KUBISZ; SURANOVA, 1975; CARR; GABRIEL; MCDONAGH, 1986; CASTRO et al., 2004)
<i>B. atrox</i>	Vivostat®	Fabricação pré ou intra-operatório de selante de fibrina autólogo. Regeneração tecidual	(KJAERGARD; TRUMBULL, 1998a, 1998b; VELADA et al., 2002; DRAKE; WONG, 2003; BELBOUL et al., 2004; BUCHTA et al., 2005; SCHIPS et al., 2006; ÅGREN et al., 2014)
<i>Agkistrodon rhodostoma</i>	Arwin®	Agente defibrinogénantes	(HESS; KEIL-KURI; MARSHALL, 1975; NEUGEBAUER, 1976; WOLF, 1976; BÖHME; SCHMIDT; HÜTTEL, 1978; HEIDRICH, 1978)

Existem serinoproteases isoladas de venenos de serpentes sendo aplicadas como agentes desfibrinogénantes, como é o caso da batroxobin, isolada de *B. atrox moojeni* (atual *B. moojeni*) (STOCKER; BARLOW, 1976) registrada sob o nome comercial Defibrase, utilizada em pacientes vítimas de trombose, infarto do miocárdio, doenças vasculares periféricas, isquemia aguda e rejeição de transplante renal (STOCKER; FISCHER; MEIER, 1982). A mesma enzima também é empregada na preparação de colas de fibrina, utilizadas como alternativa ou complemento aos processos de suturas convencionais (DASCOMBE et al., 1997).

A aplicação biotecnológica das serinoproteases no tratamento de trombose venosa deve-se à (i) sua capacidade em consumir o estoque de fibrinogênio disponível, além disso, como citado anteriormente, por grande parte dessas, (ii) não ativarem o Fator XIII, e, dessa maneira, não criarem redes de fibrina estáveis, (iii) por não serem susceptíveis às ações dos inibidores endógenos, além de (iv) possuírem ação trombolítica (JACKSON, 2001; MACGILLIVRAY, 2003; BLOMBÄCK; BARK, 2004; MOESSON, 2005; KOH; ARMUGAM; JEYASEELAN, 2006; WOLBERG, 2007; WOLBERG; CAMPBELL, 2008; BARROS et al., 2009; JANMEY; WINER; WEISEL, 2009).

A maneira convencional de unir tecidos após uma lesão é o uso de suturas, no entanto, essa realidade vem passando por modificações, por diversas razões, tais como: demora nos processos de cicatrização; incompatibilidade entre o material utilizado e o conjunto de células lesado, dentre outros. Algumas medidas em substituição as suturas já foram utilizadas, dentre as quais destacam-se: cianoacrilatos, eficazes porem cancerígenos, gelatina de colágeno e as aplicações mais estudadas, estão pautadas no uso de colas de fibrina, também chamada de selantes de fibrina ou adesivos de tecidos (JACKSON, 2001).

O uso comercial das serinoproteases apresenta diversas vantagens, dentre as quais se destacam: processo de produção rápido, fácil e barato (expressão proteica); diversidade de aplicações (Tabela 3); até então não foram descritas reações adversas notáveis; no caso de selantes de fibrina substituírem a trombina humana, não apresentando risco de transmissão de doenças infecciosas; entre outras (BELL, 1997; MACGILLIVRAY, 2003; BLOMBÄCK; BARK, 2004; MOESSON, 2005; WOLBERG, 2007; WOLBERG; CAMPBELL, 2008; BARROS et al., 2009; JANMEY; WINER; WEISEL, 2009).

Neste contexto a, tanto a BpirSP-39 como a BbrzSP-32 têm a capacidade de ser utilizada como nova ferramenta em substituição à trombina, pois, mimetizam muitas características da mesma (Tabela 4), descartando-se também a hipótese de contaminações virais. Vale ressaltar que estudos realizados até o momento, tanto em seres humanos, como em outros animais, não relatam casos de alergias relacionadas as trombina-símbles de venenos de serpentes (BARROS et al., 2009; JUAN et al., 1995; MAN et al., 2011; SAMPAIO et al., 2007).

Tabela 4: Comparação entre as atividades biológicas da trombina com as novas serinoproteases isoladas.

Atividades	Trombina	BpirSP-39	BbrzSP-32
Agregação e desagregação de plaquetas	+	Não testado	+
Retração do coágulo	+	Não testado	+
Ativação do fator XIII	+	+	-
Degradação do fibrinogênio (α and β)	+	+	Apenas α
Degradação do substrato BAPNA	+	+	+
Inibição por heparina	+	-	-
Inibição por PMSF	+	+	+
Inibição por citrato de sódio	+	-	-
Inibição por EDTA	+	-	-

Tomados em conjunto, os resultados demonstraram que duas novas isoformas de serinoproteases do veneno de serpentes da família Viperidae foram caracterizadas estruturalmente: uma de *Bothrops pirajai* e, a outra, de *B. brazili*. A BbrzSP-32 possui atividades: sobre o (i) fibrinogênio; (ii) redes de fibrina; (iii) coágulos sanguíneos humanos; (iv) gelatina; (v) cromogênicos para serinoproteases e enzimas trombina-símile; (vi) coagulante sobre o plasma humano, sendo estas últimas (v e vi) apenas, significativamente, reduzidas após incubação com inibidores clássicos de trombina (PMSF e benzamidina); além de apresentar estabilidade frente a variações de pH e temperatura; não induz nem interfere na coagulação de plaquetas lavadas; possui atividade contra os protistas *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania infantum*, nas formas epimastigota e promastigota, respectivamente, e demonstrou habilidades em reduzir a viabilidade de *S. epidermidis*, bem como, degradar biofilme produzido pela mesma.

6 CONCLUSÕES

- ✓ A BpirSP-32 teve sua sequência de aminoácidos elucidada e sua estrutura terciária modelada;
- ✓ A primeira SP do veneno da serpente *B. brazili* foi isolada em apenas dois passos cromatográficos;
- ✓ Sua massa molecular relativa é de aproximadamente 36 kDa e a absoluta de 32.520,26 Da, a enzima passou a ser denominada BbrzSP-32;
- ✓ A sequência da porção N-terminal foi comparada à de outras serinoproteases demonstrando elevada identidade;
- ✓ A estrutura primária da BbrzSP-32 foi estimada, possibilitando sua modelagem molecular;
- ✓ A BbrzSP-32 possui capacidade de degradar as cadeias α de fibrinogênio bovino;
- ✓ A nova serinoprotease é capaz de degradar fibrina e trombos de coágulo humano;
- ✓ A BbrzSP-32 apresenta atividades proteolíticas sobre os substratos cromogênicos S-2238 e S-2288, sendo essas significativamente reduzidas após incubação com benzamidina e PMSF;
- ✓ Os resultados de conservação da atividade frente às variações de pH e temperatura mostraram-se condizentes com publicações para a classe da enzima;
- ✓ A enzima não demonstrou possuir atividade sobre agregação/inibição plaquetária;
- ✓ A BbrzSP-32 foi hábil em reduzir a viabilidade dos epimastigotas de *Trypanosoma cruzi*, bem como dos promastigotas de *Leishmania infantum*;
- ✓ A serinoprotease em questão reduziu a viabilidade de bactérias gram-positiva da espécie *S. epidermidis*, bem como, minimizou a formação de biofilme produzido pela mesma;
- ✓ Foi realizada a caracterização de duas serinoproteases com promissoras aplicações biotecnológicas.

ARTIGOS PUBLICADOS RELACIONADOS À TESE

7 ARTIGOS PUBLICADOS RELACIONADOS À TESE

Research Article

Isolation and Biochemical Characterization of a New Thrombin-Like Serine Protease from *Bothrops pirajai* Snake Venom

Kayena D. Zaqueo,¹ Anderson M. Kayano,¹ Rodrigo Simões-Silva,¹ Leandro S. Moreira-Dill,¹ Carla F. C. Fernandes,¹ André L. Fuly,² Vinícius G. Maltarollo,³ Kathia M. Honório,^{3,4} Saulo L. da Silva,⁵ Gerardo Acosta,^{6,7} Maria Antonia O. Caballol,⁸ Eliandre de Oliveira,⁸ Fernando Albericio,^{6,7,9,10} Leonardo A. Calderon,¹ Andreimar M. Soares,¹ and Rodrigo G. Stábili¹

¹ Centro de Estudos de Biomoléculas Aplicadas à Saúde, CEBio, Fundação Oswaldo Cruz, Fiocruz Rondônia e Departamento de Medicina, Universidade Federal de Rondônia, UNIR, Rua da Beira 7176, Bairro Lagoa, 76812-245 Porto Velho, RO, Brazil

² Departamento de Biologia Celular e Molecular, Instituto de Biologia, Universidade Federal Fluminense, 24210-130 Niteroi, RJ, Brazil

³ Centro de Ciências Naturais e Humanas, Universidade Federal do ABC, 09210-170 Santo André, SP, Brazil

⁴ Escola de Artes, Ciências e Humanidades, USP, 03828-000 São Paulo, SP, Brazil

⁵ Universidade Federal de São João Del Rei, UFSJ, Campus Alto Paraopeba, 36420-000 Ouro Branco, MG, Brazil

⁶ Institute for Research in Biomedicine (IRB Barcelona), 08028 Barcelona, Spain

⁷ CIBER-BBN, Barcelona Science Park, 08028 Barcelona, Spain

⁸ Proteomic Platform, Barcelona Science Park, 08028 Barcelona, Spain

⁹ Department of Organic Chemistry, University of Barcelona, 08028 Barcelona, Spain

¹⁰ School of Chemistry, University of KwaZulu Natal, Durban 4001, South Africa

Correspondence should be addressed to

Andreimar M. Soares; andreimar@fiocruz.br and Rodrigo G. Stábili; stabili@fiocruz.br

Received 9 July 2013; Revised 20 September 2013; Accepted 1 December 2013; Published 26 February 2014

Academic Editor: Edward G. Rowan

Copyright © 2014 Kayena D. Zaqueo et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

This paper presents a novel serine protease (SP) isolated from *Bothrops pirajai*, a venomous snake found solely in Brazil that belongs to the Viperidae family. The identified SP, named BpirSP-39, was isolated by three chromatographic steps (size exclusion, bioaffinity, and reverse phase chromatographies). The molecular mass of BpirSP-39 was estimated by SDS-PAGE and confirmed by mass spectrometry (39,408.32 Da). The protein was able to form fibrin networks, which was not observed in the presence of serine protease inhibitors, such as phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF). Furthermore, BpirSP-39 presented considerable thermal stability and was apparently able to activate factor XIII of the blood coagulation cascade, unlike most serine proteases. BpirSP-39 was capable of hydrolyzing different chromogenic substrates tested (S-2222, S-2302, and S-2238) while Cu²⁺ significantly diminished BpirSP-39 activity on the three tested substrates. The enzyme promoted platelet aggregation and also exhibited fibrinogenolytic, fibrinolytic, gelatinolytic, and amidolytic activities. The multiple alignment showed high sequence similarity to other thrombin-like enzymes from snake venoms. These results allow us to conclude that a new SP was isolated from *Bothrops pirajai* snake venom.

1. Introduction

Snake venoms have proteolytic enzymes that can be divided into two main groups: metalloproteases and serine proteases,

which affect the hemostatic system through different mechanisms [1, 2]. Serine proteases are abundant in snake venoms, particularly of the Viperidae family, and may constitute up to 20% of total venom proteins. This class of enzymes

has a highly conserved catalytic triad (His57, Asp102, and Ser195) [3]. Besides venomous snakes, these enzymes are often found in many organisms such as viruses, bacteria, and higher mammals. Serine proteases can participate in several biological activities, such as complementing system activation, cell differentiation and homeostasis and even prey digestion [4–7]. This class of proteases affects different steps of the coagulation cascade, often nonspecifically, by proteolytic degradation. Selectively, they can activate or inactivate specific coagulation factors involved in platelet aggregation, coagulation, and fibrinolysis [8].

In snake venoms, one class of serine proteases, named snake venom thrombin-like enzymes (svTLEs), possesses coagulant activity similar to human thrombin. They convert fibrinogen to fibrin by the cleavage of the A α and B β chains [2]. Some of these enzymes are able to cleave only the α or β chains or both chains of the fibrinogen and are therefore known as svTLE-A, svTLE-B, or svTLE-AB, respectively [9]. New serine proteases are constantly being described and/or characterized [10–13].

The aim of the present study is the isolation and biochemical characterization of a new serineprotease from *Bothrops pirajai* snake venom. Because it is such a rare snake and lives in a small area of the world, little about its venom has been described to date; these studies are limited to the purification of (i) phospholipase A₂: piratoxin-I [14], piratoxin-II and -III [15], MP-III 4R [16], and BpirPLA₂-I [17], (ii) C-type lectin: BPL [18], (iii) LAAO: BpirLAAO-I [19] and (iv) two serine proteases: BpirSP27 and BpirSP41 [20].

2. Materials and Methods

2.1. Isolation and Molecular Mass Determination. The identified serineprotease (BpirSP-39) was isolated after chromatographic fractionation of *B. pirajai* venom by size exclusion, followed by bioaffinity and reverse phase chromatographies. So, about 40 mg of crude venom was solubilized in 1 mL of 20 mM Tris-HCl pH 7.6 and centrifuged at 9000 $\times$ g for 10 min at room temperature. The clear supernatant was applied to a Superdex G-75 (70 $\times$ 0.9 cm) column (GE Healthcare), preequilibrated with 20 mM Tris-HCl pH 7.6, and the chromatography was carried out at a flow of 0.75 mL/min, collecting fractions of 1 mL/tube. The elution of proteins was monitored at 280 nm.

Fractions with coagulant activity were lyophilized, suspended in 50 mM Tris-HCl pH 7.4 plus 0.5 M NaCl, and applied to a Hitrap benzamidine *Fast Flow* column (GE Healthcare), previously equilibrated with 50 mM Tris-HCl pH 7.4 plus 0.5 M NaCl. The elution of proteins was performed using 0.5 M NaCl plus 10 mM HCl at a flow of 1 mL/min. The collected samples (1 mL) were desalted and lyophilized.

The fraction of interest was dissolved in 0.1% trifluoroacetic acid (TFA) and a reversed-phase high-performance chromatography was performed using a C2/C18 column (10 mm $\times$ 4.6 mm, 3 μ m, 120 Å) (GE Healthcare), preequilibrated with 0.1% TFA. The elution was carried out using a linear gradient of 0–100% (99% acetonitrile plus 0.1% TFA)

at a flow rate of 0.75 mL/min. All chromatographic steps were performed in an Akta Purifier 10 system (GE Healthcare).

The molecular mass was estimated by 12.5% SDS-PAGE [21] and determined by mass spectrometry in an AXIMA TOF² system. The mass spectrum was acquired in linear mode, using a saturated solution of sinapinic acid as ionization matrix.

2.2. Enzyme Activities

2.2.1. Determination of Coagulant Activity. The minimum coagulant dose (MCD), or the amount of enzyme capable of coagulating 200 μ L of plasma in 60 sec, was determined visually using different concentrations of isolated protein (0.5–3.0 μ g) and citrated human plasma [22]. The time needed to form fibrin networks was measured by a chronometer and the results were expressed in percentage of seconds ($1/\Delta \times 100$), where Δ is the average time in seconds. The action of protease inhibitors on the purified enzyme was evaluated determining coagulation activity after the incubation of 2 μ g serineprotease with heparin, citrate, ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), and phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF) for 20 minutes at room temperature. The thermal stability of the protease was verified by measuring coagulation activity after preincubation of 2 μ g protein at different temperatures (–70°C–85°C) for 30 minutes. The assays were carried out in duplicate with $n = 3$.

2.2.2. Activation of Factor XIII of the Clotting Cascade. After centrifugation of heparinized blood samples at 2205 $\times$ g for 15 minutes, 400 μ L plasma was incubated with (i) 2 μ g BpirSP-39 (40 μ L), or (ii) 2 μ g BjussuSP-I (a serineprotease from *B. jararacussu* that is not able to activate factor XIII), or (iii) 40 μ L of water, dilution the sample solution (negative controls) and (iv) blood collected without anticoagulant (positive control) in order to evaluate the stability of the formed fibrin network [23]. Aiming at evaluating the activation of coagulation factor XIII, 200 μ L of 10 M urea solution was added to the clots and the samples were incubated for 48 h at 37°C. The assays were carried out in duplicate with $n = 3$.

2.2.3. Activity on Synthetic Substrates. The ability of SP in hydrolyzing chromogenic substrates (0.1 mM, final concentration) S-2238 (that is suitable for thrombin-like enzymes), S-2222 (for factor Xa) and S-2302 (for plasma kallikrein, factor XIa and XIIa), was analyzed using a Thermomax microplate reader (Molecular Devices, Menlo Park, CA, USA). The enzymatic reaction was monitored for 20 min. at 37°C and A405 nm. The effective concentration (EC) was determined as the concentration of SP (μ g/mL) able to produce an increase of 0.3/5 minutes. SP was pre-incubated either with EDTA (20 mM), PMSF (2 mM), benzamidine (15 mM), and O-Phe (0.3 mM) for 60 min at 37°C or with 10 mM divalent cations (Cu²⁺, Mn²⁺, Ba²⁺, and Ca²⁺) for 30 min at 37°C, and then the reaction was started by adding substrates [24, 25].

2.2.4. Platelet Aggregation Assays. Washed rabbit platelets (WRP) were prepared according to the procedure described by Fuly and coworkers [26]. Collected blood plus 5 mM EDTA was centrifuged at $360 \times g$ for 12 min at room temperature, and the Platelet Rich Plasma (PRP) obtained was further centrifuged at $1370 \times g$ for 20 minutes. The platelet pellets were suspended in a calcium-free Tyrode's solution containing 0.35% (w/v) bovine serum albumin (BSA) plus 0.1 mM EGTA (final concentration) pH 6.5 and washed twice by centrifugation. The final pellet was then suspended in Tyrode-BSA pH 7.5, without EGTA. The suspension was adjusted to $3-4 \times 10^5$ platelets/mL and platelet aggregation was measured by turbidimetry using a dual Whole Blood Lumi-Aggregometer (model 490 2D, Chrono-Log Corporation). The assays were performed at 37°C in siliconized glass cells using $200 \mu\text{L}$ of WRP, under stirring conditions, and aggregation was triggered after preincubation for 2 min with aliquots of SP in the presence of 1.0 mM CaCl_2 (final concentration).

2.2.5. Fibrinogenolytic Activity. The fibrinogenolytic activity of SP was determined according to Cominetti and coworkers [27] with modifications. Samples of bovine fibrinogen (10 mg/mL) were incubated with different concentrations of enzyme (0.5–3 μg) at 37°C for 2 hours. The reactions were stopped by adding 0.5 mM Tris-HCl pH 8.0, 20% glycerol (v/v), 4% SDS (v/v), 0.05% bromophenol blue (w/v), and 0.3% DL-dithiothreitol (w/v), in a 1:1 proportion. After overnight incubation, the digested fibrinogen was analyzed using 10% SDS-PAGE.

2.2.6. Fibrinolytic Activity. Fibrinolytic activity was evaluated according to the method described by Cominetti and coworkers [27] and Chudzinski-Tavassi and Modesto [23]. First enough agarose to prepare a 0.9% gel was solubilized in 50 mM Tris-HCl pH 7.4 plus 100 mM CaCl_2 and heated until melted. At a temperature of 37°C , 0.3% bovine fibrinogen, dissolved in 50 mM Tris-HCl pH 7.4 plus 100 mM CaCl_2 , and 1.2 U/mL bovine thrombin were added to the agarose solution. Afterwards, the mixture was polymerized in a Petri dish (0.9 cm $\times$ 15 cm) and the SP (5 and 10 μg in PBS), crude venom (3 μg , positive control), and PBS (negative control) were incubated at 37°C overnight in orifices as previously done. The halos that formed indicating fibrinolytic activity were analyzed by comparison to negative and positive controls. An activity unit was defined as the quantity of protein capable of producing a 1 mm halo on fibrin gel. The result was expressed in millimeters.

2.2.7. Gelatinolytic Activity Assay. Gelatinolytic activity was assessed according to the procedure described by Cominetti and coworkers [27]. SDS-PAGE was carried out on 12.5% gel containing 0.3% gelatin as a copolymerized substrate under nonreducing conditions [21]. After electrophoresis, the gel was washed twice in 0.5% Triton X-100 (v/v) for 30 min to remove SDS and incubated in 50 mM Tris-HCl pH 8.0 plus 5 mM CaCl_2 at 37°C for 20 h. Then, the gel was stained with

Coomassie blue R-250 and gelatinolytic activity was observed by the presence of clear proteolytic zones.

2.2.8. Amidolytic Activity on Substrate BApNA. Amidolytic activity was measured after incubation at 37°C for 5 h of 10 μg BpirSP-39 in $500 \mu\text{L}$ solution containing 1% N^α -Benzoyl-DL-Arginyl *p*-nitroanilide (BApNA) in 100 mM Tris-HCl pH 8.0. The reaction's product was analyzed at 405 nm using a value of $8800 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ as the molar extinction coefficient of *p*-nitroanilide. The negative control was carried out using water plus BApNA. A unit of enzymatic activity was defined as the quantity of enzyme capable of releasing 1 μmol *p*-nitroanilide/min, corresponding to the increase of 0.009 absorbance units measured at A405 nm.

2.3. Sequencing Determination

2.3.1. Solution Digestion. The protein was reduced by treatment with a solution of 20 mM DTT in 50 mM NH_4HCO_3 for 1 h at 30°C and alkylated with a solution of 150 mM iodine acetamide in 50 mM NH_4HCO_3 for 1 h at 30°C . The sample was then digested overnight at 37°C with trypsin (sequencing grade modified, Promega). Afterwards, tryptic peptides were cleaned up with a Proxeon Stage tip and eluted with 70% acetonitrile/0.1% trifluoroacetic acid. The eluted peptides were dried in a vacuum centrifuge and resuspended in 1% formic acid for LC-MS/MS analysis. Mass spectrometry was performed in a nanoAcquity (Waters) HPLC coupled to an Orbitrap Velos mass spectrometer (Thermo Scientific). An aliquot of the tryptic digest was injected and separated in a C18 reverse phase column (75 μm Oi, 10 cm, nanoAcquity, 1.7 μm BEH column, Waters). Bound peptides were eluted with the following gradients: 1 to 40% B in 20 minutes, followed by 40 to 60% B in 5 min; flow was 250 nL/min (A: 0.1% formic acid in water; B: 0.1% formic acid in acetonitrile). Eluted peptides were ionized in an emitter needle (PicoTipTM, New Objective). Spray voltage applied was 1900 V. Peptide masses (m/z : 300–1700) were measured in full scan in the Orbitrap at a resolution of 60,000 at 400 m/z . Up to the 5 most abundant peptides (minimum intensity of 1500 counts) were selected from each MS scan and fragmented in the HCD collision cell using a normalized collision energy (NCE) of 40% with nitrogen as the collision gas. Fragments were detected in the Orbitrap with a resolution of 7500 FWHM at 400 m/z . Raw data were collected using Thermo Xcalibur (v.2.1.0.1140).

2.3.2. Database Search. Raw data were analyzed using Proteome Discoverer (v.1.3.0.339) software. A search was run with the search engine MASCOT against the NCBI nr Serpentes database. Also, an .mgf file was generated in Proteome Discoverer and this file was used to search with PEAKS Studio (v.5.3.) against the same database. After that the homology search tool SPIDER* was used to run a tag homology search. The search parameters were Database/Taxonomy: NCBI nr Serpentes; missed cleavage: 2; fixed modifications: carbamidomethyl of cysteine; variable modifications: oxidation of methionine and pyro-Glu (N-term Glutamine);

peptide tolerance: 10 ppm for MS spectra and 0.05 Da for MS/MS spectra; and enzyme: trypsin.

The Percolator node was used in the Proteome Discoverer Mascot search in order to discriminate correct from incorrect peptide spectrum matches using the q -value (FDR) to improve the number of confidently identified peptides at a given false discovery rate. The results have been filtered so only high confidence peptides (FDR $\leq$ 0.01) are considered for identification results.

2.4. BpirSP-39 Molecular Modeling and Determination of N-Glycosylation Sites. The structural model of the BpirSP-39 from *Bothrops pirajai* was generated employing the threading modeling method [28–30], which was performed using the HHpred software [31] available at <http://toolkit.tuebingen.mpg.de/hhpred>. Initially, HHpred generated 112 alignments for BpirSP-39. The alignments were obtained using the global mode and the gaps resulting from LC-MS/MS sequencing were filled by homology with a thrombin-like enzyme from *Agkistrodon halys* venom (PDB ID: 4E7N) [32] (selected to construct the model of BpirSP-39). The first two gaps were confirmed by Edman's degradation (data not showed), and the third and fourth gaps are justified by the large amount of lysine which generated small fragments not detected by LC-MS/MS. The chosen template showed the best alignment score (286.73) and the identity between the studied protein sequence and the template was 67%. Potential N-glycosylation sites of serineprotease were predicted employing NetNGlyc v.1.0, [33] available at <http://www.cbs.dtu.dk/>.

2.4.1. Simulation of Molecular Dynamics. After the construction of the initial model, we performed simulations of molecular dynamics (MD) of the studied protein. All the MD parameters were equally set to the two generated models. The MD simulations were performed employing GROMACS (GROningenMACHine for Chemical Simulation) v.4.5.4 software [34, 35] in Intel Xeon processor with 8 GB RAM, operating in a CentOS 5.5 Linux operational system. The simple point charge (SPC) model was used to represent explicit water molecules. Protonation states of charged groups were set according to pH 7.0 and counter ions were added to neutralize the system. GROMOS force field [36] was chosen to perform the MD simulation. These simulations were performed at constant temperature and pressure in a periodic truncated cubic box, and the minimum distance between any atom of the protein and the box wall was 1.0 nm.

Initially, an energy minimization using the steepest descent algorithm was performed. After that 20 ps of MD simulation with position restraints applied to the protein was performed at 298 K to relax the system. And finally, an unrestrained MD simulation was performed at 298 K for 10 ns to assess the stability of the structures. During the simulation, temperature and pressure (1.0 bar) were maintained by an external bath controlling heat and isotropic pressure.

2.4.2. Structural Analysis and Validation. The model generated after the MD simulation was checked using several GROMACS structural analyses, as well as the analysis of

Ramachandran plot generated with Rampage [37]. The pseudo-energy profile of the models was analyzed with Verify 3D [38, 39] available at http://nihserver.mbi.ucla.edu/Verify_3D/ and ProSA-web [40, 41].

3. Results

The purification of BpirSP-39 was performed using three consecutive chromatographic steps. The first step of the *B. pirajai* venom fractionation, performed by size-exclusion molecular chromatography on Superdex G-75, resulted in five fractions (P1–P5) (Figure 1(a)). The peaks P-1 and P-2 were capable of coagulating the citrated plasma and promoting proteolytic activity, when the chromogenic substrate BApNA was used. Since P-1 demonstrated the highest coagulant and proteolytic activities, it was fractionated by affinity chromatography using a benzamidine Sepharose column resulting in two peaks (Figure 1(b)). The coagulant fraction was applied to a C2/C18 column, and after elution enzymatic activity was observed in the first fraction (Figure 1(c)).

The relative molecular mass of SP, estimated by SDS-PAGE 12.5%, was approximately 49 kDa (Figure 1(a)) but when determined by mass spectrometry it was 39.408,32 Da (Figure 1(d)). Knowing that mass spectrometry is a more accurate method than polyacrylamide electrophoresis, the new identified serineprotease was called BpirSP-39.

BpirSP-39 is a serineprotease that presents coagulant activity in citrated plasma in a concentration-dependent manner, with a minimum coagulant dose (MCD) determined to be 1.7 μ g of the protein (Figure 2(a)).

In contrast to the majority of snake venom serine proteases [42], BpirSP-39 is apparently able to activate the clotting cascade factor XIII and, as observed in the positive control, the fibrin network showed stability after 48 h incubation. The clot induced by BjussuSP-I was dissolved in less than 120 seconds which indicates that factor XIII was not activated. The second negative control (40 μ L of water) was not able to induce a coagulation process, proving that thrombin was neutralized by heparin and does not participate in the coagulation induced by BpirSP-39, though for a definite conclusion, it needs to be tested with purified factor XIII.

BpirSP-39 clotting activity was not influenced by different thrombin inhibitors (citrate, heparin, and EDTA), which distinguishes it from most svTLEs (see Table 1). However, BpirSP-39 clotting activity was significantly reduced after incubation with PMSF (Figure 2(b)). BpirSP-39 also proved to be a thermo-stable enzyme (Figure 2(c)), exhibiting highest activity at room temperature (25°C).

The enzyme possesses high catalytic activity on different chromogenic substrates tested (S-2238, S-2222, and S-2302) (Figure 2(d)); however, when incubated with Cu^{2+} , its catalytic activity was diminished significantly on the three tested substrates. While Mn^{2+} influenced the activity on substrates S-2222 (for factor Xa) and S-2302 (for plasma kallikrein, factor XIa and XIIa), Ba^{2+} and Ca^{2+} had no influence on the catalytic activity on substrate S-2238 (that is suitable for thrombin-like enzymes) but modified the enzyme's activity on substrates S-2222 and S-2302. The protein was also

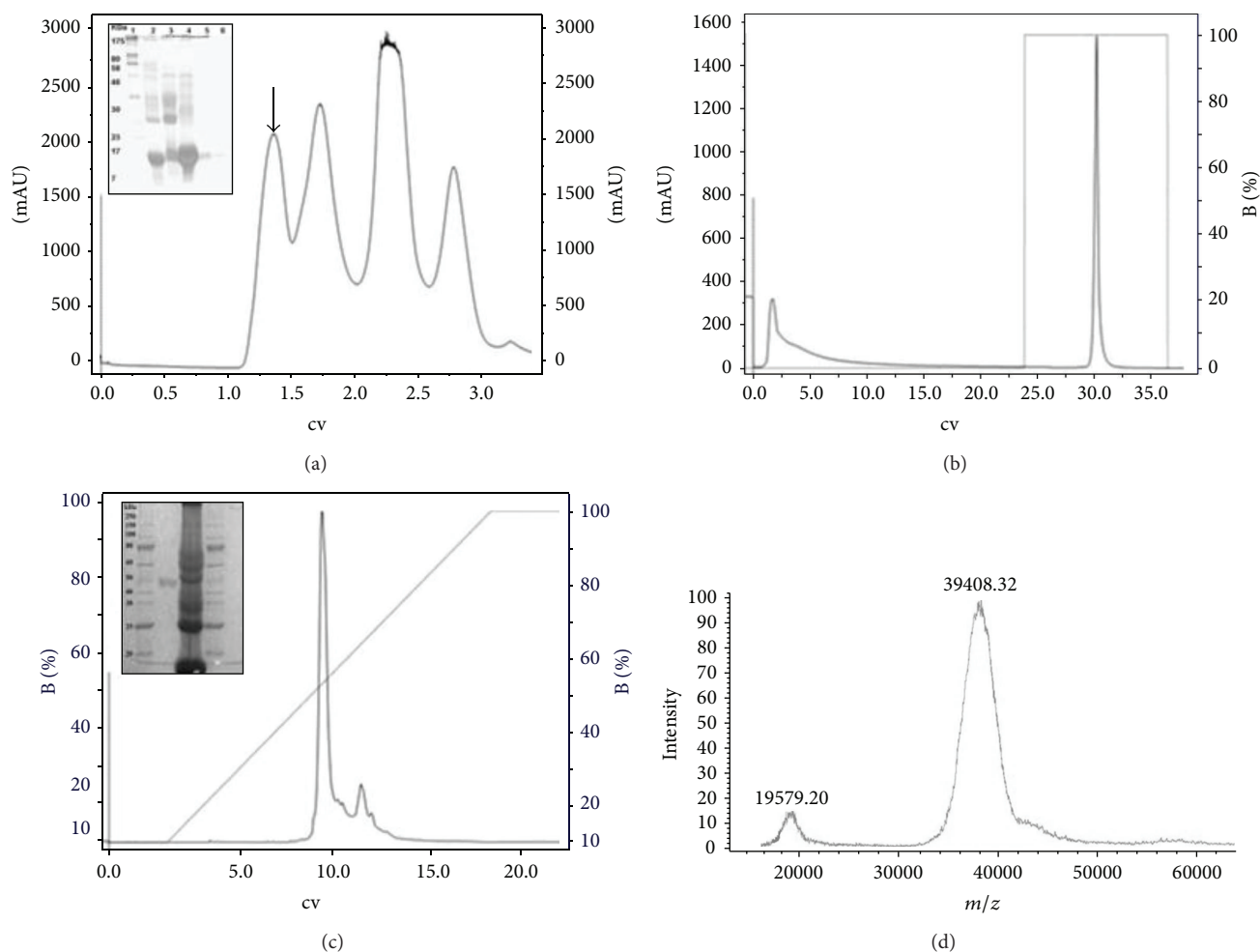


FIGURE 1: Purification profile of the serine protease BpirSP-39 from *Bothrops pirajai* crude venom. The detached arrow (a) indicates the fraction with the highest coagulation activity, fraction 1 of 12.5% SDS-PAGE in denaturing conditions. Line 1: molecular mass standard, Color Plus Prestained Protein Marker, Broad Range (7–175 kDa) (P7709S New England Biolabs), lines 2–6: Fractions 1–5 obtained after chromatography. (b) Affinity chromatography of fraction 1 on benzamidine sepharose column. (c) High performance liquid chromatography using the C2/C18 column (10 mm × 4.6 mm, 3 μm, 120 Å) and 12.5% SDS-PAGE of BpirSP-39 and *B. pirajai* crude venom. Lines 1 and 4: molecular mass standard: Protein Ladder (10–250 kDa) (P7703S New England Biolabs); 2- BpirSP-39 in denaturing conditions showing a band of approximately 49 kDa; 3-crude venom of *B. pirajai* in denaturing conditions. (d) Mass spectrum of BpirSP-39 determined by AXIMA TOF². The identified protein presented a molecular mass of 39,408.32 Da. The peak at 19,579.02 Da indicates the double charge of the protein. The absorbance was monitored at A280 nm.

capable of promoting platelet aggregation in a concentration-dependent manner (Figure 2(f)).

The proteolytic activity of BpirSP-39 on fibrin (Figure 3(b)) demonstrates that the purified serine protease is a fibrinolytic enzyme similar to other sVTLEs [43]. Furthermore, BpirSP-39 showed gelatinolytic activity (Figure 3(c)) and amidolytic activity on BApNA (Figure 3(d)).

The amino acid sequence of BpirSP-39 was determined by MS/MS and showed a multiple sequence alignment between the enzyme and other serine proteases (Figure 4). Figure 5(a) displays the root mean squared deviation (RMSD) of the backbone during the MD simulation and we can see that the structure of the BpirSP-39 model was clearly stabilized after 7500 ps. From these results, it is possible to say that the MD simulations were important to minimize the system.

From the RMS fluctuation plot between 7500 and 10000 ps of MD simulation (Figure 5(b)), we can note that only the loop regions had deviation high values. The average fluctuation of the protein structure is around 0.6 Å and the maximum fluctuation is around 1.4 Å, indicating a high level of stability. These structural findings confirm the quality of the generated model. Figure 5(c) shows the alignment between the final model and the chosen template, indicating that the predicted tertiary structure was preserved during the MD simulation.

After the MD simulation, the final model presented Verify3D scores above zero for all residues, suggesting that the conformation of individual residues was adequate. Analyzing the Ramachandran plot of the final model, the BpirSP-39 structure shows 81.3% of the residues located at allowed regions and only 4.3% in outlier regions (Figure 6(a)). Also,

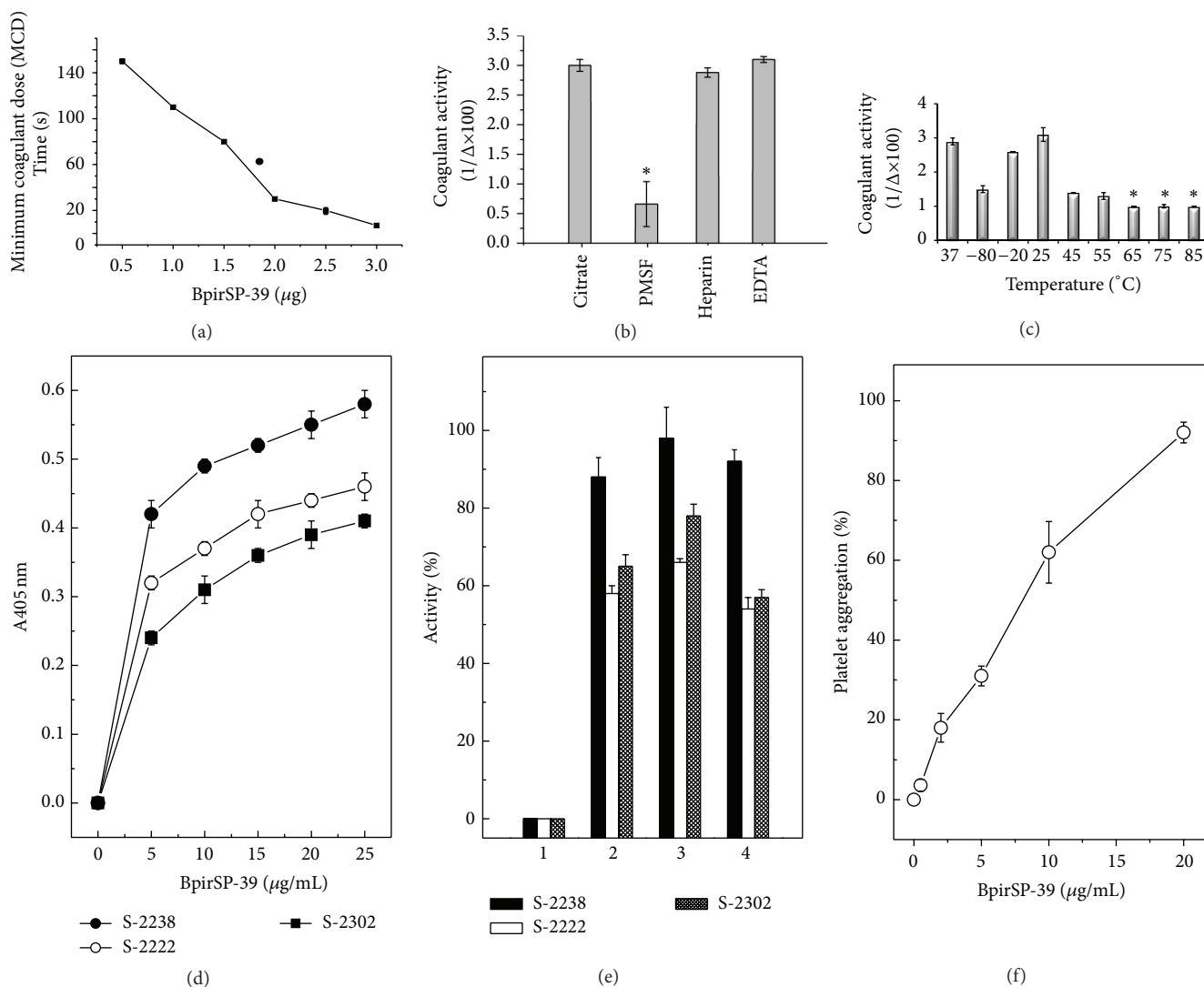


FIGURE 2: Enzymatic characterization of the protein. (a) Determination of minimum coagulant dose (MCD) of BpirSP-39 using a concentration-response curve. The time of formation of fibrin network was measured by chronometer and the samples were evaluated visually. (b) Evaluation of inhibitors' action on the coagulation activity of BpirSP-39. (c) Evaluation of BpirSP-39 thermostability on the clotting of human citrated plasma. (d) Effect of protein on different chromogenic substrates. (e) Effect of metals on the enzymatic activity of serineprotease (column 1, Cu²⁺; column 2, Mn²⁺; column 3, Ba²⁺; and column 4, Ca²⁺). (f) Effect of serineprotease on platelet aggregation. Results are expressed as means $\pm$ SD of two individual experiments ($n = 3$).

all disordered predicted residues were located at loop regions (Figure 6(b)), suggesting that the conformation of the final model has good stereochemical quality.

Finally, we validated the final model using the energy profile from ProSA web server. The initial model contained a high energy region and the final model has no region with energy higher than 0, indicating that the MD simulation was important in improving the model's quality (Supplementary Material—Figure 8, available on line at <http://dx.doi.org/10.1155/2014/595186>). The binding site of the modeled serineprotease is composed of a histidine, an asparagine, and a serine (His42, Asp86, and Ser194). Figure 7 displays the obtained model with disulfide bonds in yellow and the catalytic triad in red. The final model presented the

same number of disulfide bonds as other snake venom serine proteases.

Based on these results, the new identified serineprotease mimics several thrombin characteristics (Table 2).

4. Discussion

The present report details the isolation and biochemical characterization of BpirSP-39, a new thrombin-like enzyme from *Bothrops pirajai* snake venom, with common procedures for the isolation of snake venom serine proteases [44–50].

The divergences observed between the relative and absolute mass of BpirSP-39 were also detected with other thrombin-like proteins purified from snake venoms [51–54].

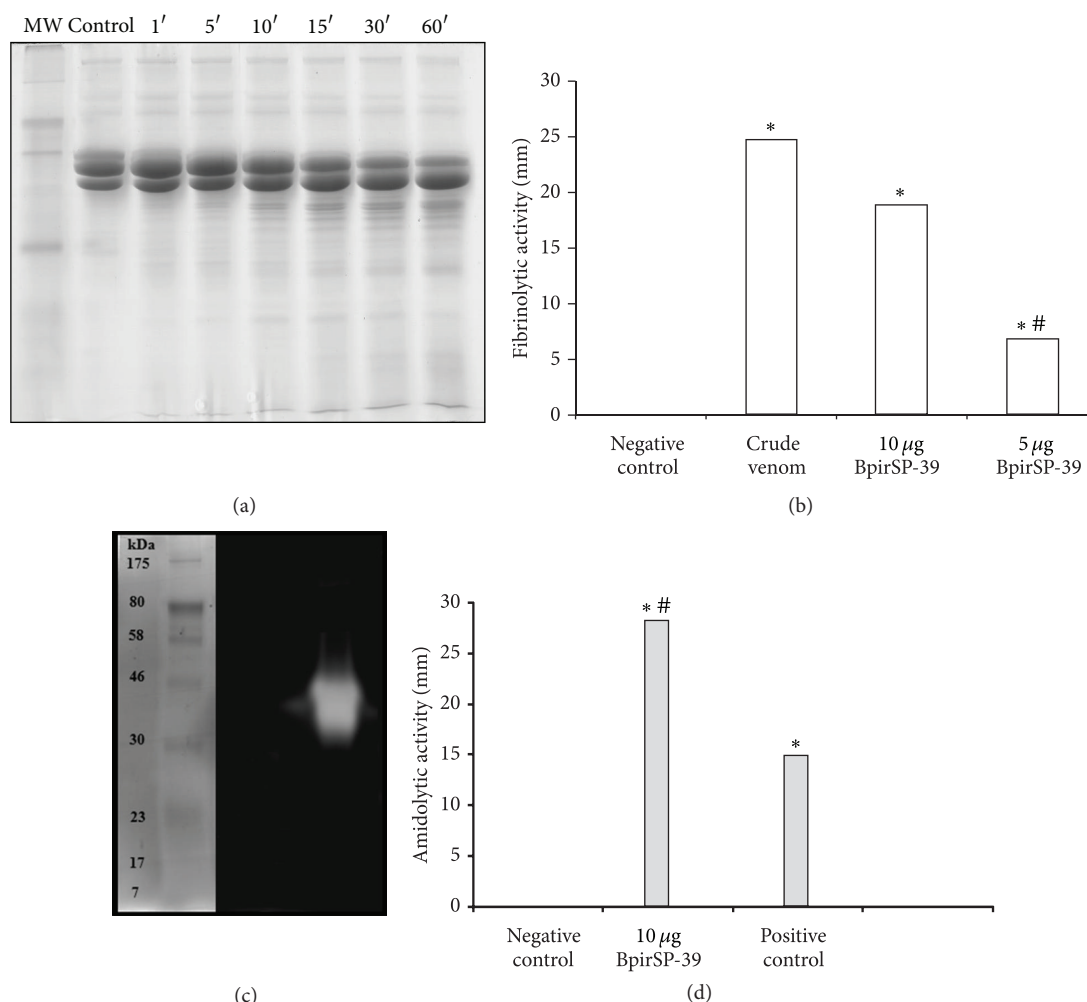


FIGURE 3: Enzymatic characterization of BpirSP-39. (a) Fibrinogenolytic activity demonstrating the degradation of the α and β chains of bovine fibrinogen. (b) Fibrinolytic activity. The data are expressed in millimeters. (c) Gelatinase activity stained with Coomassie R-250. (d) Amidolytic activity on chromogenic substrate BAPNA. The crude venom of *B. pirajai* was used as positive control and the dilution buffer of the sample as negative control. (*) Values significantly different from the negative control ($P \leq 0.05$) and (#) values significantly different from positive control ($P \leq 0.05$).

Like the majority of serine proteases [12, 13, 20, 44–48], these differences indicate that BpirSP-39 seems to be a glycosylated protein. The difference detected during electrophoretic migration was probably caused by the carbohydrate microheterogeneity of the enzyme since this fraction can vary the weight of the serine protease up to 30%. Castro and coworkers [9] suggest that the glycidyl domain can aid in structural stabilization and participate in the recognition of substrates by the enzyme.

The MCD of BpirSP-39 was 1.5 μ g which is similar to BjussuSP-I, a serineprotease isolated from the venom of *Bothrops jararacussu*, a venomous snake phylogenetically similar to *Bothrops pirajai* [48]. When compared to two other serineprotease isoforms isolated and characterized from the same species by Menaldo and coworkers [20] (BpirSP27 and BpirSP41, with MCDs of $\sim 3.5 \mu$ g and $\sim 20 \mu$ g, resp.), BpirSP-39 presented a higher coagulant potential. Other purified

serine proteases such as PA-BJ and Jararassin-I from *Bothrops jararaca* venom show considerably reduced coagulant activity, with MCDs of 5 of 10 μ g, respectively [55, 56].

The new isoform of serineprotease from *Bothrops pirajai* is apparently able to activate factor XIII in XIIIa. It is known that factor XIII is a protransglutaminase activated by thrombin at the end of blood cascade system [57]. In plasma, factor XIII presents two subunits. While subunit A is the active form of the enzyme, subunit B plays the role of a carrier protein [58]. Factor XIIIa modifies the structure of the clot by forming cross-links between the fibrin by a link ϵ (γ -glutamyl) lysine [59] leading to increased resistance to fibrinolysis. Factor XIIIa is also able to maintain its structure when exposed to denaturing agents.

BpirSP-39 has clotting activity and its action was not influenced by different thrombin inhibitors. However, this proclotting activity was significantly reduced after incubation

B_pirajai_45-seq1	VIGGDECNINEHR FLVALYGKRSRGYFC
V_STEJN Q71QI1.1	MVLIRVLANLLILQLSYAQRSSSELVIGGDECNINEHR FLVALYK SGRFRC
B_insularis Q8QG86.1	MVLIRVIANLLILQVSYAQKSSSELVVGDECINEHP FLAFLY- SHGYFC
B_ALTER Q6IWF1.1	-----VIGGDECINEHR FLAFLY- PGRFFC
A_acutus 1OP2_A PDBID	-----VIGNECDINEHR FLVAFFN TTGFFC
D_acutus AAK52506.2	-----MVIGGDECINEHR FLVAFFN TTGFFC
B_JUSSU Q2PQJ3.1	-----VLGGDECINEHP FL-AFLY SHGYFC
B_pirajai_45-seq1	GLTLINQEWVLTAAHCDR KNFRIY LGIHR KVLNEDEQTR -----FLCPN
V_STEJN Q71QI1.1	GGTLINQEWVLTAAHCDR RNMEIK LGMHSK NVPNEDEQRR VPKEKF-FCDS
B_insularis Q8QG86.1	GLTLINQEWVLTAAHCDR RFMRIY LGIHAR SVANDDEVIR YPKEKF-ICPN
B_ALTER Q6IWF1.1	SGTLINQEWVLTVAHCDT ISMRIY LGLHTR SVPNDDEEIR YPMEKF-KCPN
A_acutus 1OP2_A PDBID	GGTLINPEWVTAAHCD S TNFQMQ LGVHSK KVLNEDEQTR NPKEKF-ICPN
D_acutus AAK52506.2	GGTLINPEWVTAAHCD S TNFQMQ LGVHSK KVLNEDEQTR NPKEKF-ICPN
B_JUSSU Q2PQJ3.1	GLTLINQEWVTAAHCD S TNFQMQ LGVHSK KVLNEDEQTR NPKEKF-ICPN
B_pirajai_45-seq1	GK KDDVLDKDIMLIR LDSPVS NSEHIAPLSLPSSPPSVGSVCR IMGWGTI
V_STEJN Q71QI1.1	NK NYTQWNKDIMLIR LNSPVN NSTHIAPLSLPSPPIVGSVCR IMGWGTI
B_insularis Q8QG86.1	KN MSDEKDKDIMLIR LNRPVK NSTHIAPISLPSPPSVGSVCR VMGWGSI
B_ALTER Q6IWF1.1	RK RSYIKDKDIMLIR LNRPVN DSPHIAPLSLPSPPSVGSVCH VMGWGTT
A_acutus 1OP2_A PDBID	KN NNEVLDKDIMLIK LDKPIS NSKHIAPLSLPSSPPSVGSVCR IMGWGSI
D_acutus AAK52506.2	KN NNEVLDKDIMLIK LDSPVN NSAHIAPLSLPSPPSVGSVCR VMGWGSI
B_JUSSU Q2PQJ3.1	KN S-EVLDKDIMLIK LDKPIS NSKHIAPLSLPSPPSVGSVCR IMGWGSI
B_pirajai_45-seq1	SPTK TNPDPVPHCAN INLLDDAVCR AAYPELPAEYR TLCAGILQGGI
V_STEJN Q71QI1.1	TSPN ETYPDVPHCAN INLFNYTVCH GAHAGLPATSR TLCAGVLEGGK
B_insularis Q8QG86.1	TIPN DTYPDVPHCAN INLVNDTVCR GAYKRFPKSR TLCAGVLQGGK
B_ALTER Q6IWF1.1	SPSK ATYPDVPHCAN INLVNDTMCH GAYNGLPVTSR KFCAGVLQGGI
A_acutus 1OP2_A PDBID	TPVK ETFPDVPYCAN INLLDHAVCQ AGYPELLAEYR TLCAGIVQGGK
D_acutus AAK52506.2	TSPN VTIPGVPHCAN INILDYEVCR ATKPELPAKSR TLCAGILEGGK
B_JUSSU Q2PQJ3.1	TIPN ETYPDVPYCAN INLVDYEVCC GAYNGLPAKT- TLCAGVLEGGK
B_pirajai_45-seq1	DSCK -----LCNGQFQG LLSWGSKVCAQP RLKPALYTK VSDYTEWIK SIIAG
V_STEJN Q71QI1.1	DTCK GDSGGPLICNGQFQG FVSWGGDPCAQP REPGVYTK VFDHLDWIQ NIIAG
B_insularis Q8QG86.1	DTCV GDSGGPLICNGTFQG IVSWGGKVCARP RKPALYTK VFDYLPWIQ SIIAG
B_ALTER Q6IWF1.1	DTCV GDSGGPLICNGQFQG IVSWGGKVCARL PRPALYTK VFEYLPWIQ SIIAG
A_acutus 1OP2_A PDBID	DTCG GDSGGPLICNGQFQG IVSYGAHPCGQG PKPGIYTN VFDYTDWIQ RNIAG
D_acutus AAK52506.2	DTCG GDSGGPLICNGQFQG IVSYGAHPCGQG PKPGIYTN VFDYTDWIQ RNIAG
B_JUSSU Q2PQJ3.1	DTCV GDSGGPLICNGQFQG IVSYGAHSCGQG PKPGIYTN VFDYTDWIQ RNIAG
B_pirajai_45-seq1	NTDVTCPP
V_STEJN Q71QI1.1	NTTATCPL
B_insularis Q8QG86.1	NKTATCPP
B_ALTER Q6IWF1.1	NTTATCPL
A_acutus 1OP2_A PDBID	NTDATCPP
D_acutus AAK52506.2	NTSATCPP
B_JUSSU Q2PQJ3.1	NTDATCPP

FIGURE 4: Multiple sequence alignment between BpirSP-39 and other serine proteases.

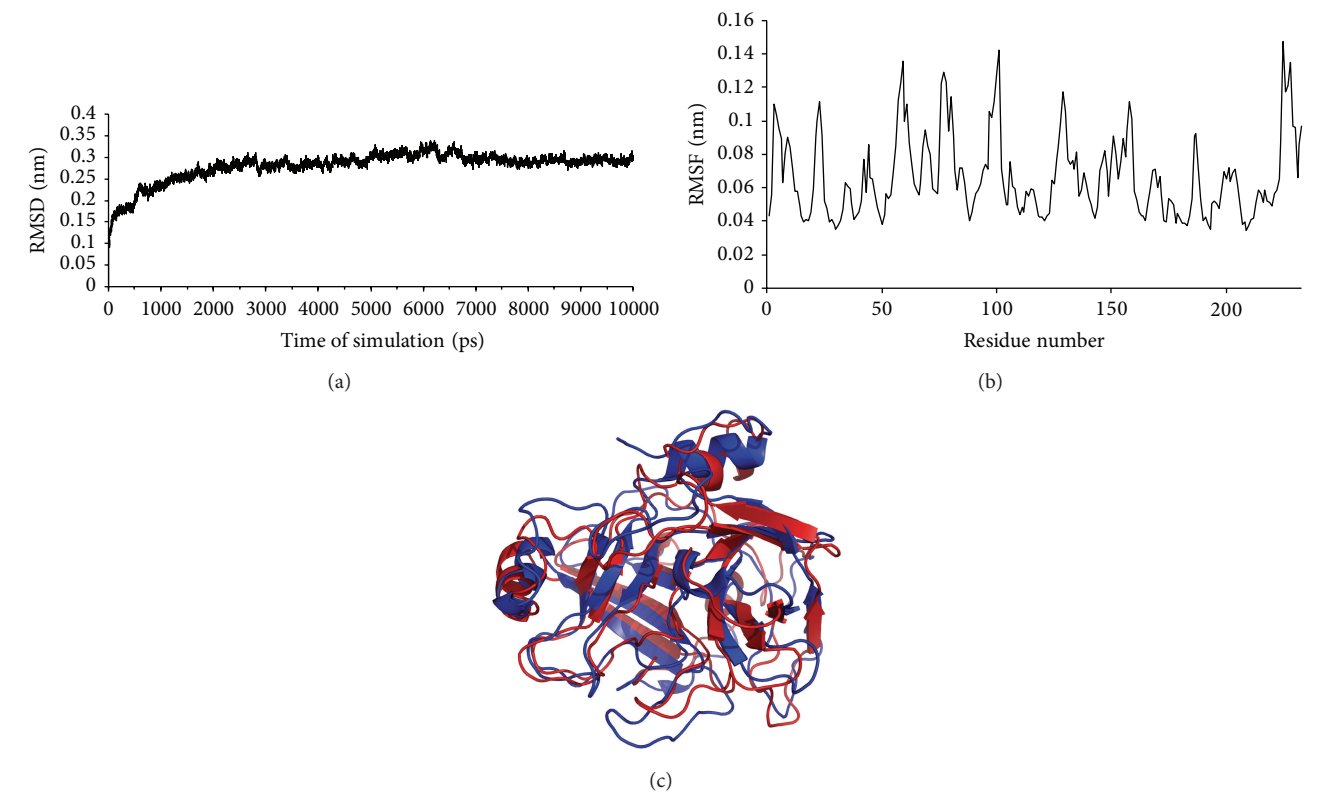


FIGURE 5: (a) RMSD versus MD simulation time for the generated model; (b) root mean squared fluctuation (RMSF) of average structure of BpirSP-39 (between 7.5 and 10 ns of MD simulation); (c) alignment between BpirSP-39 (red) model and crystallographic template (blue).

with PMSF, indicating that serine residues present in the enzyme's catalytic site participate in the proteolytic activity, since PMSF binds covalently to reactive serine residues present in the catalytic site [60]. Because the clotting activity was not inhibited by heparin, a direct thrombin inhibitor, it can be proposed that the identified protein acts as a thrombin-like enzyme, and not as a prothrombin activator, as is true of some snake serine proteases. If BpirSP-39 acted indirectly, activating prothrombin, the resulting thrombin would be inactivated by heparin preventing fibrin network formation. In this same way, the clotting activity of Agacutase, a recent thrombin-like enzyme isolated from *Deinagkistrodon acutus* [12], was not influenced by heparin or hirudin, which is different from BjussuSP-I, a serineprotease from *Bothrops jararacussu* whose clotting ability was reduced by heparin [48].

The BpirSP-39 showed a high thermostability similar to BpirSP27 and BpirSP41 [20], BjussuSP-I [48], and Barnettobin, a coagulant thrombin-like enzyme isolated and characterized from *Bothrops barnetti* venom [10]. This data confirms the expected results of an enzyme belonging to this class, which possesses considerable thermal stability, differing from metalloproteases which are quickly inactivated when exposed to extreme variations in temperature and pH [43].

The results obtained related to the substrate S-2238 for BpirSP-39 are similar to the data from BpirSP27 and BpirSP41

TABLE 1: Effect of inhibitors on enzymatic activity of SP.

Inhibitors	% inhibition of		
	S-2238	S-2222	S-2303
Benzamidine	62 ± 4	61 ± 2	47 ± 1
PMSF	55 ± 3	52 ± 3	45 ± 3
EDTA	7.5 ± 1	15 ± 2	5 ± 2
O-Phe	3.9 ± 2	3 ± 1	4.5 ± 2

The inhibitors in final concentration, benzamidine (15 mM), PMSF (2 mM), EDTA (20 mM), or O-Phe (0.3 mM) were preincubated with SP (20 µg/mL) for 60 min at 37°C; then the reaction was initiated by adding chromogenic substrates (0.1 mM, final concentration). The reaction was monitored for 5 min, as described in the Section 2 and % inhibition was measured. 100% of the SP enzymatic activity was obtained in the absence of inhibitors for each substrate. Results are expressed as means ± SD of two individual experiments ($n = 2$).

[20]. These isoforms showed reduced thrombin-like activity when incubated with Cu^{2+} , BpirSP27 activity was influenced by Mn^{2+} , and neither was modified when incubated with Ba^{2+} and Ca^{2+} (Figure 2(e)).

Concerning the enzyme's capacity to promote platelet aggregation, BpirSP-39 seems to be more active compared to other isolated isoforms of the same species [20]. The new isolated serineprotease was able to degrade fibrinogen and induce fibrin network formation, as well as cleave the α and β chains of bovine fibrinogen (Figure 3(a)). This is

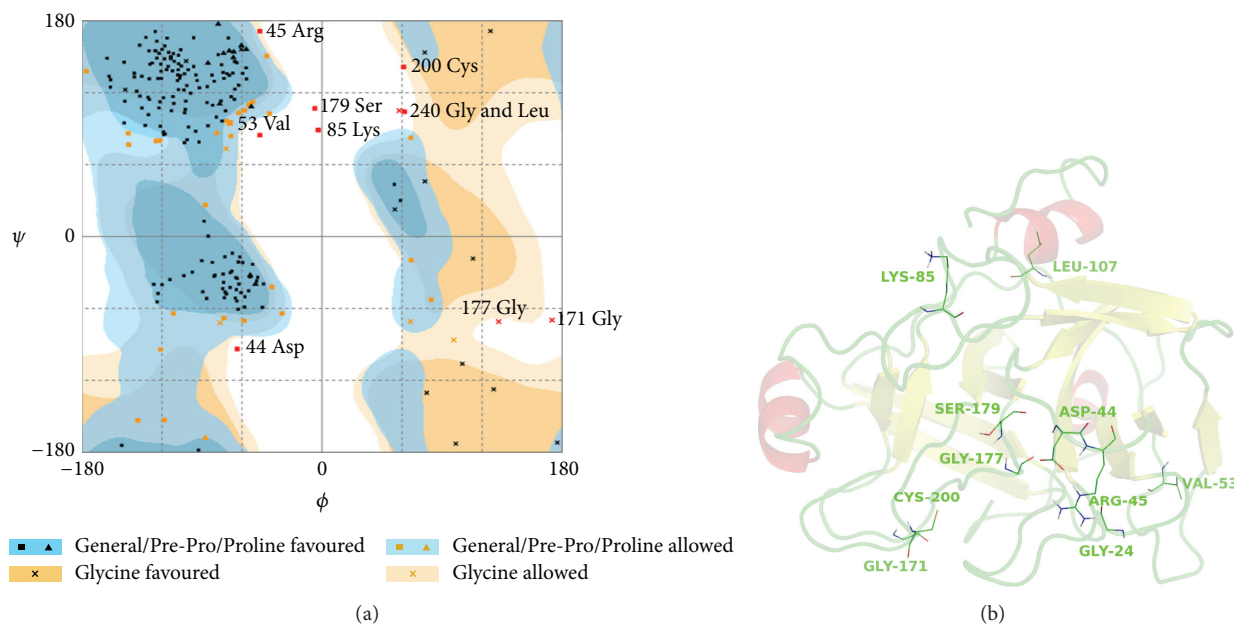


FIGURE 6: Residues located at outlier regions predicted by Ramachandran plot.

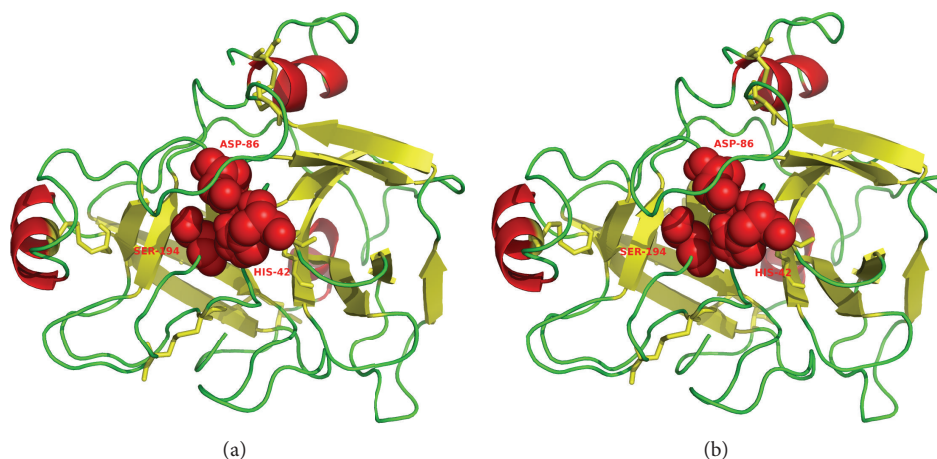


FIGURE 7: Stereoview of the final 3D model for BpirSP-39.

in contrast to other thrombin-like enzymes, which cleave preferentially either the α or β fibrinogen chains, occasioning an increase in fibrinopeptides A or B and consequently generating abnormal blood clots [62, 63].

As for BpirSP-39's proteolytic activity upon fibrin, gelatin, and the amidolytic substrate BAPNA, the purified serine-protease demonstrates enzymatic activities similar to other svTLEs [43]. It is known that the proteolytic action on BAPNA occurs between the amino acids Arg and Gly. This confirms that BpirSP-39 possesses fibrinogenolytic action on the α and β chains of fibrinogen, since the *in vivo* conversion of fibrinogen to fibrin carried out by thrombin is obtained by the cleavage of four peptide bonds in the amino terminal regions of the polypeptide chains 2A α and 2B β , which occur

between the amino acids Arg¹⁴-Gly¹⁷ of the A α chains and Arg¹⁴-Gly¹⁵ of the B β chains [64].

The best template found for molecular modeling was the structure in the PDB registered under the number 4E7N, corresponding to a thrombin-like enzyme isolated from the venom of the snake *Agkistrodon halys*. This template has 67% identity with the sequence of *B. pirajai* and a similarity score of about 286.7. The literature says that templates with percent identities above 30% are sufficient to predict the three-dimensional structure between template-protein and target-protein.

Two potential glycosylation sites on BpirSP-39 were identified at positions Asn05 and Asn74 using the software NetNGlyc (results not shown). The presence of these sites

TABLE 2: Comparison between thrombin and BpirSP-39 activities*.

Activities	Thrombin	BpirSP-39
Aggregation of platelet disaggregation	+	Not tested
Clot retraction	+	Not tested
Fibrinogen clotting	+	+
Factor XIII activation	+	+
Degradation of fibrinogen (α and β)	+	+
Hydrolysis of BAPNA	+	+
Inhibition by heparin	+	–
Inhibition by PMSF	+	+
Inhibition by citrate	+	–
Inhibition by EDTA	+	–

* Adapted from Niewiarowski et al., 1979 [61].

The presented data represents a summary of thrombin and BpirSP-39 activities.

is conserved in SVSPs. BpiSP-39 also showed the presence of twelve cysteine residues, ten of which form five disulfide bonds. The other two cysteines form a unique bridge conserved among SVSPs, in this case, involving Cys226 found in the C-terminal extension [55].

Medical and scientific interest in thrombin-like enzymes has increased considerably because of their specificity when compared to thrombin, a multifunctional enzyme [65]. These serine proteases seem to be promising defibrinogenation agents. The enzymes ancrod (Arwin), isolated from the venom of *Calloselasma rhodostoma*, and batroxobin (Defibrase), isolated from *B. moojeni*, are being used in patients suffering from thrombosis, myocardial infarction, peripheral vascular diseases, acute ischemia, and renal transplant rejection [66, 67]. Ancrod has also been used as a treatment for heparin-induced thrombocytopenia [68] without any impact on platelets [69]. Besides that, batroxobin (isolated from *Bothrops atrox*) and gyroxin, a serineprotease described by Bacila [70] and purified by Alexander and coworkers [71] from the venom of *Crotalus durissus terrificus*, are used to prepare fibrin sealants that can be utilized in different medical situations [72].

The fibrin sealants made by fibrinogen extracted from large animals and thrombin-like enzymes extracted from snake venoms were tested in both animals and humans and have diverse advantages, such as quick, easy, and cheap production; they have a large diversity of applications; they are safe, since they do not produce notable adverse reactions; and they do not use human blood or present risk of infectious disease transmission [73].

In summary, a novel isoform of serineprotease was isolated and characterized from the crude venom of the *Bothrops pirajai* snake. BpirSP-39 is a thrombin-like protein. Based on its characteristics, the enzyme could be an alternative to thrombin in the production of fibrin sealants, such as autologous fibrinogen. The enzyme, by itself, does not induce viral contamination and it also shows promising use in the treatment of clotting dysfunction.

Conflict of Interests

The authors declare that there is no conflict of interests.

Acknowledgments

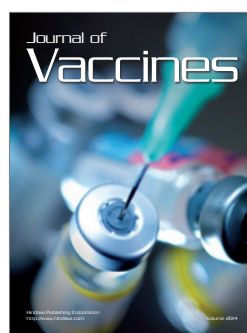
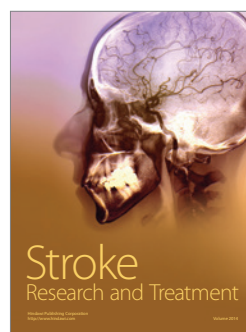
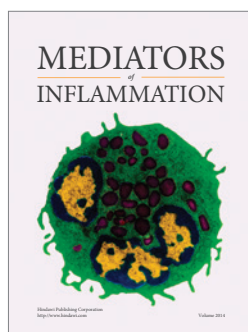
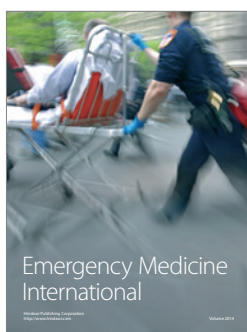
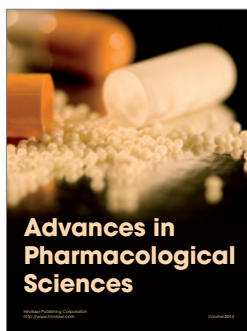
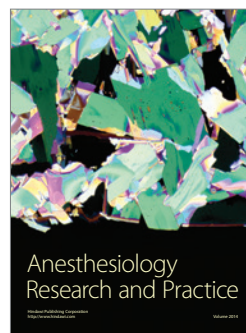
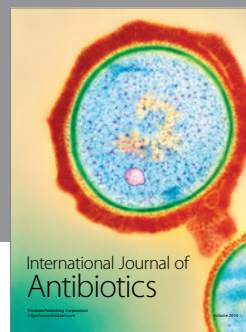
The authors express their gratitude to Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ), Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Pesquisa Translacional em Saúde e Ambiente na Região Amazônica (INCT-INPeTAm), Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Toxinas (INCT-Tox), Secretaria de Estado do Planejamento e Coordenação Geral (CNPq-SEPLAN-RO), CICYT (CTQ2012-30930), and the *Generalitat de Catalunya* (2009SGR 1024) for the financial support and to Conselho de Gestão do Patrimônio Genético (CGEN/MMA) for the authorization number 010627/2011-1. Amy Grabner provided the English editing of the paper.

References

- [1] J. White, "Snake venoms and coagulopathy," *Toxicon*, vol. 45, no. 8, pp. 951–967, 2005.
- [2] T. Matsui, Y. Fujimura, and K. Titani, "Snake venom proteases affecting hemostasis and thrombosis," *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 1477, no. 1-2, pp. 146–156, 2000.
- [3] S. M. T. Serrano and R. C. Maroun, "Snake venom serine proteinases: sequence homology versus substrate specificity, a paradox to be solved," *Toxicon*, vol. 45, no. 8, pp. 1115–1132, 2005.
- [4] J. A. F. P. Villar, F. T. D. Lima, C. L. Veber et al., "Synthesis and evaluation of nitrostyrene derivative compounds, new snake venom phospholipase A2 inhibitors," *Toxicon*, vol. 51, no. 8, pp. 1467–1478, 2008.
- [5] J. D. O. Costa, K. C. Fonseca, M. S. Garrote-Filho et al., "Structural and functional comparison of proteolytic enzymes from plant latex and snake venoms," *Biochimie*, vol. 92, no. 12, pp. 1760–1765, 2010.
- [6] J. D. O. Costa, K. C. Fonseca, C. C. Neves Mamede et al., "Bhalterin: functional and structural characterization of a new thrombin-like enzyme from *Bothrops alternatus* snake venom," *Toxicon*, vol. 55, no. 7, pp. 1365–1377, 2010.
- [7] E. Longo, F. M. L. G. Stamato, R. Ferreira, and O. Tapia, "The catalytic mechanism of serine proteases II: the effect of the protein environment in the α -chymotrypsin proton relay system," *Journal of Theoretical Biology*, vol. 112, no. 4, pp. 783–798, 1985.
- [8] S. Braud, C. Bon, and A. Wisner, "Snake venom proteins acting on hemostasis," *Biochimie*, vol. 82, no. 9-10, pp. 851–859, 2000.
- [9] H. C. Castro, R. B. Zingali, M. G. Albuquerque, M. Pujol-Luz, and C. R. Rodrigues, "Snake venom thrombin-like enzymes: from reptilase to now," *Cellular and Molecular Life Sciences*, vol. 61, no. 7-8, pp. 843–856, 2004.
- [10] D. E. Vivas-Ruiz, G. A. Sandoval, J. Mendoza et al., "Coagulant thrombin-like enzyme (barnettobin) from *Bothrops barnetti* venom: molecular sequence analysis of its cDNA and biochemical properties," *Biochimie*, vol. 95, no. 494, pp. 1476–1486, 2013.

- [11] A. K. Mukherjee and S. P. Mackessy, "Biochemical and pharmacological properties of a new thrombin-like serine protease (Russelobin) from the venom of Russell's Viper (*Daboia russelii russelii*) and assessment of its therapeutic potential," *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 1830, no. 495, pp. 3476–3488, 2013.
- [12] S. S. Tang, X. H. Wang, J. H. Zhang et al., "Biochemical properties and comparative pharmacology of a coagulant from *Deinagkistrodon acutus* snake venom," *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 49, no. 496, pp. 90–98, 2013.
- [13] Y. Zheng, F. P. Ye, J. Wang et al., "Purification, characterization and gene cloning of Da-36, a novel serine protease from *Deinagkistrodon acutus* venom," *Toxicon*, vol. 67, no. 497, pp. 1–11, 2013.
- [14] L. C. Mancuso, M. M. Correa, C. A. Vieira et al., "Fractionation of *Bothrops pirajai* snake venom: isolation and characterization of piratoxin-I, a new myotoxic protein," *Toxicon*, vol. 33, no. 5, pp. 615–626, 1995.
- [15] M. H. Toyama, L. C. Mancuso, J. R. Giglio, J. C. Novello, B. Oliveira, and S. Marangoni, "A quick procedure for the isolation of dimeric piratoxins-I and II, two myotoxins from *Bothrops pirajai* snake venom. N-terminal sequencing," *Biochemistry and Molecular Biology International*, vol. 37, no. 6, pp. 1047–1055, 1995.
- [16] M. H. Toyama, P. D. Costa, J. C. Novello et al., "Purification and amino acid sequence of MP-III 4R D49 phospholipase A₂ from *Bothrops pirajai* snake venom, a toxin with moderate PLA₂ and anticoagulant activities and high myotoxic activity," *Protein Journal*, vol. 18, no. 3, pp. 371–378, 1999.
- [17] S. S. Teixeira, L. B. Silveira, F. M. N. da Silva et al., "Molecular characterization of an acidic phospholipase A₂ from *Bothrops pirajai* snake venom: synthetic C-terminal peptide identifies its antiplatelet region," *Archives of Toxicology*, vol. 85, no. 10, pp. 1219–1233, 2011.
- [18] A. Havt, M. H. Toyama, N. R. F. Do Nascimento et al., "A new C-type animal lectin isolated from *Bothrops pirajai* is responsible for the snake venom major effects in the isolated kidney," *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, vol. 37, no. 1, pp. 130–141, 2005.
- [19] L. F. M. Izidoro, M. C. Ribeiro, G. R. L. Souza et al., "Biochemical and functional characterization of an L-amino acid oxidase isolated from *Bothrops pirajai* snake venom," *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, vol. 14, no. 20, pp. 7034–7043, 2006.
- [20] D. L. Menaldo, C. P. Bernardes, N. A. Santos-Filho et al., "Biochemical characterization and comparative analysis of two distinct serine proteases from *Bothrops pirajai* snake venom," *Biochimie*, vol. 94, no. 613, pp. 2545–2558, 2012.
- [21] U. K. Laemmli, "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4," *Nature*, vol. 227, pp. 680–685, 1970.
- [22] R. D. G. Theakston and H. A. Reid, "Development of simple standard assay procedures for the characterization of snake venoms," *Bulletin of the World Health Organization*, vol. 61, no. 6, pp. 949–956, 1983.
- [23] A. M. Chudzinski-Tavassi and J. C. A. Modesto, "Venenos de serpentes e suas ações nos mecanismos de coagulação e fibrinólise," in *Métodos em Toxinologia: Toxinas de Serpentes*, H. S. Selistre-de-Araújo and D. H. F. Souza, Eds., pp. 11–23, EDUFSCar, São Carlos, Brazil, 2007.
- [24] L. Romero, S. Marcussi, D. P. Marchi-Salvador et al., "Enzymatic and structural characterization of a basic phospholipase A₂ from the sea anemone *Condylactis gigantea*," *Biochimie*, vol. 92, no. 8, pp. 1063–1071, 2010.
- [25] S. L. Da Silva, C. A. Dias-Junior, P. A. Baldasso et al., "Vascular effects and electrolyte homeostasis of the natriuretic peptide isolated from *Crotalus oreganus abyssus* (North American Grand Canyon rattlesnake) venom," *Peptides*, vol. 36, no. 501, pp. 206–212, 2012.
- [26] A. L. Fuly, O. L. T. Machado, E. W. Alves, and C. R. Carlini, "Mechanism of inhibitory action on platelet activation of a phospholipase A₂ isolated from *Lachesis muta* (Bushmaster) snake venom," *Thrombosis and Haemostasis*, vol. 78, no. 5, pp. 1372–1380, 1997.
- [27] M. R. Cominetti, C. L. S. Pontes, and D. H. F. Souza, "Métodos cromatográficos e critério de pureza," in *Métodos em Toxinologia: Toxinas de Serpentes*, H. S. Selistre-de-Araújo and D. H. F. Souza, Eds., pp. 11–23, EDUFSCar, São Carlos, Brazil, 2007.
- [28] C. Chothia and A. M. Lesk, "The relation between the divergence of sequence and structure in proteins," *The EMBO Journal*, vol. 5, no. 4, pp. 823–826, 1986.
- [29] L. Holm and C. Sander, "Protein structure comparison by alignment of distance matrices," *Journal of Molecular Biology*, vol. 233, no. 1, pp. 123–138, 1993.
- [30] L. Holm and C. Sander, "Dali: a network tool for protein structure comparison," *Trends in Biochemical Sciences*, vol. 20, no. 11, pp. 478–480, 1995.
- [31] J. Söding, A. Biegert, and A. N. Lupas, "The HHpred interactive server for protein homology detection and structure prediction," *Nucleic Acids Research*, vol. 33, no. 2, pp. W244–W248, 2005.
- [32] F. Zeng, B. Shen, Z. Zhu et al., "Crystal structure and activating effect on RyRs of AhV-TL-I, a glycosylated thrombin-like enzyme from *Agkistrodon halys* snake venom," *Archives of Toxicology*, vol. 87, no. 647, pp. 535–545, 2013.
- [33] N. Blom, T. Sicheritz-Pontén, R. Gupta, S. Gammeltoft, and S. Brunak, "Prediction of post-translational glycosylation and phosphorylation of proteins from the amino acid sequence," *Proteomics*, vol. 4, no. 6, pp. 1633–1649, 2004.
- [34] H. J. C. Berendsen, D. van der Spoel, and R. van Drunen, "GROMACS: a message-passing parallel molecular dynamics implementation," *Computer Physics Communications*, vol. 91, no. 1–3, pp. 43–56, 1995.
- [35] E. Lindahl, B. Hess, and D. van der Spoel, "GROMACS 3.0: a package for molecular simulation and trajectory analysis," *Journal of Molecular Modeling*, vol. 7, no. 8, pp. 306–317, 2001.
- [36] W. F. Van Gunsteren, S. R. Billeter, A. A. Eising et al., "Biomolecular simulations: the GROMOS96 manual and user guide," *VdF Hochschulverlag ETHZ*, vol. 648, 1996.
- [37] S. C. Lovell, I. W. Davis, W. B. Arendall III et al., "Structure validation by C α geometry: phi, psi and C β deviation," *Proteins*, vol. 50, pp. 437–450, 2003.
- [38] J. U. Bowie, R. Luthy, and D. Eisenberg, "A method to identify protein sequences that fold into a known three-dimensional structure," *Science*, vol. 253, pp. 164–170, 1991.
- [39] R. Luthy, J. U. Bowie, and D. Eisenberg, "Assessment of protein models with three-dimensional profiles," *Nature*, vol. 356, pp. 83–85, 1992.
- [40] M. J. Sippl, "Recognition of errors in three-dimensional structures of proteins," *Proteins: Structure, Function and Genetics*, vol. 17, no. 4, pp. 355–362, 1993.
- [41] M. Wiederstein and M. J. Sippl, "ProSA-web: interactive web service for the recognition of errors in three-dimensional structures of proteins," *Nucleic Acids Research*, vol. 35, pp. W407–W410, 2007.

- [42] H. Pirkle, "Thrombin-like enzymes from snake venoms: an updated inventory," *Thrombosis and Haemostasis*, vol. 79, no. 3, pp. 675–683, 1998.
- [43] S. Swenson and F. S. Markland Jr., "Snake venom fibrin(ogen)olytic enzymes," *Toxicon*, vol. 45, no. 8, pp. 1021–1039, 2005.
- [44] J. O. Costa, C. B. Petri, A. Hamaguchi et al., "Purification and functional characterization of two fibrinogenolytic enzymes from *Bothrops alternatus* venom," *Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases*, vol. 13, no. 3, pp. 640–654, 2007.
- [45] Y.-S. Koh, K.-H. Chung, and D.-S. Kim, "Biochemical characterization of a thrombin-like enzyme and a fibrinolytic serine protease from snake (*Agkistrodon saxatilis*) venom," *Toxicon*, vol. 39, no. 4, pp. 555–560, 2000.
- [46] A. Magalhães, H. P. B. Magalhães, M. Richardson et al., "Purification and properties of a coagulant thrombin-like enzyme from the venom of *Bothrops leucurus*," *Comparative Biochemistry and Physiology*, vol. 146, no. 4, pp. 565–575, 2007.
- [47] L. A. Ponce-Soto, V. L. Bonfim, J. C. Novello, R. Navarro Oviedo, A. Yarlequé Chocas, and S. Marangoni, "Isolation and characterization of a serine protease, Ba III-4, from Peruvian *Bothrops atrox* venom," *Protein Journal*, vol. 26, no. 6, pp. 387–394, 2007.
- [48] C. D. Sant'Ana, F. K. Ticli, L. L. Oliveira et al., "BjussuSP-I: a new thrombin-like enzyme isolated from *Bothrops jararacussu* snake venom," *Comparative Biochemistry and Physiology*, vol. 151, no. 3, pp. 443–454, 2008.
- [49] C. D. Sant'Ana, C. P. Bernardes, L. F. M. Izidoro et al., "Molecular characterization of BjussuSP-I, a new thrombin-like enzyme with procoagulant and kallikrein-like activity isolated from *Bothrops jararacussu* snake venom," *Biochimie*, vol. 90, no. 3, pp. 500–507, 2008.
- [50] A. Vilca-Quispe, L. A. Ponce-Soto, F. V. Winck, and S. Marangoni, "Isolation and characterization of a new serine protease with thrombin-like activity (TLBm) from the venom of the snake *Bothrops marajoensis*," *Toxicon*, vol. 55, no. 4, pp. 745–753, 2010.
- [51] A. Magalhaes, G. J. De Oliveira, and C. R. Diniz, "Purification and partial characterization of a thrombin-like enzyme from the venom of the bushmaster snake, *Lachesis muta noctivaga*," *Toxicon*, vol. 19, no. 2, pp. 279–294, 1981.
- [52] F. S. Markland and P. S. Damus, "Purification and properties of a thrombin-like enzyme from the venom of *Crotalus adamanteus* (Eastern diamondback rattlesnake)," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 246, no. 21, pp. 6460–6473, 1971.
- [53] H. S. Selistre and J. R. Giglio, "Isolation and characterization of a thrombin-like enzyme from the venom of the snake *Bothrops insularis* (jararaca ilhoa)," *Toxicon*, vol. 25, no. 11, pp. 1135–1144, 1987.
- [54] K. Stocker and G. H. Barlow, "The coagulant enzyme from *Bothrops atrox* venom (batroxobin)," *Methods in Enzymology*, vol. 45, pp. 214–223, 1976.
- [55] S. M. T. Serrano, R. Mentele, C. A. M. Sampaio, and E. Fink, "Purification, characterization, and amino acid sequence of a serine proteinase PA-BJ, with platelet-aggregating activity from the venom of *Bothrops jararaca*," *Biochemistry*, vol. 34, no. 21, pp. 7186–7193, 1995.
- [56] D. F. Vieira, L. Watanabe, C. D. Sant'Ana et al., "Purification and characterization of jararassin-I, a thrombin-like enzyme from *Bothrops jararaca* snake venom," *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, vol. 36, no. 12, pp. 798–802, 2004.
- [57] L. Muszbek, V. C. Yee, and Z. Hevessy, "Blood coagulation factor XIII: structure and function," *Thrombosis Research*, vol. 94, no. 5, pp. 271–305, 1999.
- [58] R. Adany, "Intracellular factor XIII: cellular distribution of factor XIII subunit a in humans," *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*, vol. 22, no. 5, pp. 399–408, 1996.
- [59] S. I. Rapaport, "The initiation of the tissue factor dependent pathway of blood coagulation," *Advances in Experimental Medicine and Biology*, vol. 281, pp. 97–103, 1991.
- [60] R. Bezerra and L. B. Carvalho, "Proteases no trato digestivo de Peixes," *Biociencia*, vol. 622, pp. 46–49, 2001.
- [61] S. Niewiarowski, E. P. Kirby, T. M. Brudzynski, and K. Stocker, "Thrombocytin, a serine protease from *Bothrops atrox* venom—2. Interaction with platelets and plasma-clotting factors," *Biochemistry*, vol. 18, no. 16, pp. 3570–3577, 1979.
- [62] F. S. Markland, "Snake venoms and the hemostatic system," *Toxicon*, vol. 36, no. 12, pp. 1749–1800, 1998.
- [63] C. Ouyang, C.-M. Teng, and T.-F. Huang, "Characterization of snake venom components acting on blood coagulation and platelet function," *Toxicon*, vol. 30, no. 9, pp. 945–966, 1992.
- [64] J. Martins-Silva, J. Carvalho de Sousa, C. Saldanha, and J. Martins-Silva, in *Fibrinogen: From Physiopathology to Clinics*, C. Perdigão, Ed., pp. 13–26, 1996.
- [65] N. Marsh and V. Williams, "Practical applications of snake venom toxins in haemostasis," *Toxicon*, vol. 45, no. 8, pp. 1171–1181, 2005.
- [66] W. R. Bell, "Clinical trials with ancrod," in *Hemostasis and Animal Venoms*, H. Pirkle and F. S. Markland Jr., Eds., pp. 541–551, Marcel Dekker, New York, 1988.
- [67] K. Stocker and J. Meier, "Thrombin-like snake-venom enzymes," *Thrombosis and Haemostasis*, vol. 54, pp. 313–313, 1985.
- [68] C. Demers, J. S. Ginsberg, P. Brill-Edwards et al., "Rapid anticoagulation using ancrod for heparin-induced thrombocytopenia," *Blood*, vol. 78, no. 9, pp. 2194–2197, 1991.
- [69] J. G. Kelton, J. W. Smith, D. Moffatt, A. Santos, and P. Horsewood, "The interaction of ancrod with human platelets," *Platelets*, vol. 10, no. 1, pp. 24–29, 1999.
- [70] M. Bacila, "Gyroxin, a new neurotoxin of *Crotalus durissus terrificus* venom," *Acta Physiologica Latinoamericana*, vol. 11, p. 224, 1961.
- [71] G. Alexander, J. Grothusen, H. Zepeda, and R. J. Schwartzman, "Gyroxin, a toxin from the venom of *Crotalus durissus terrificus*, is a thrombin-like enzyme," *Toxicon*, vol. 26, no. 10, pp. 953–960, 1988.
- [72] W. H. Dascombe, G. Dumanian, C. Hong et al., "Application of thrombin based fibrin glue and non-thrombin based batroxobin glue on intact human blood vessels: evidence for transmembrane thrombin activity," *Thrombosis and Haemostasis*, vol. 78, no. 2, pp. 947–951, 1997.
- [73] L. C. Barros, R. S. Ferreira Jr., S. R. C. S. Barraviera et al., "A new fibrin sealant from *Crotalus durissus terrificus* venom: applications in medicine," *Journal of Toxicology and Environmental Health B*, vol. 12, no. 8, pp. 553–571, 2009.





BbrzSP-32, the first serine protease isolated from *Bothrops brazili* venom: Purification and characterization



Kayena D. Zaqueo^a, Anderson M. Kayano^a, Thaisa F.S. Domingos^b, Laura A. Moura^b, André L. Fuly^b, Saulo L. da Silva^c, Gerardo Acosta^d, Eliandre Oliveira^e, Fernando Albericio^{d,f,g}, Fernando B. Zanchi^a, Juliana P. Zuliani^a, Leonardo A. Calderon^a, Rodrigo G. Stábili^{a,*}, Andreimar M. Soares^{a,*}

^a Centro de Estudos de Biomoléculas Aplicadas à Saúde, CEBio, Fundação Oswaldo Cruz, FIOCRUZ Rondônia e Departamento de Medicina, Universidade Federal de Rondônia, Brazil

^b Universidade Federal Fluminense, UFF, Niterói, RJ, Brazil

^c Universidad Regional Amazónica IKIAM, Via Muyuna Km 7, Tena, Napo, Ecuador

^d Institute for Research in Biomedicine (IRB Barcelona), 08028-Barcelona, Spain and CIBER-BBN, Barcelona Science Park, Barcelona 08028, Spain

^e Proteomic Platform, Barcelona Science Park, Barcelona 08028, Spain

^f Department of Organic Chemistry University of Barcelona, Barcelona 08028, Spain

^g School of Chemistry, University of KwaZulu Natal, Durban 4001, South Africa

ARTICLE INFO

Article history:

Received 29 April 2015

Received in revised form 14 October 2015

Accepted 26 January 2016

Available online 28 January 2016

Keywords:

Snake venom

Enzyme

Biotechnology

Viperidae

Thrombin-like

ABSTRACT

Snake venom toxins are related not only in detention, death and the promotion of initial digestion of prey but also due to their different biochemical, structural and pharmacological effects they can result in new drugs. Among these toxins snake venom serine proteases (SVSPs) should be highlighted because they are responsible for inducing changes in physiological functions such as blood coagulation, fibrinolysis, and platelet aggregation. This article presents the first serine protease (SP) isolated from *Bothrops brazili*: BbrzSP-32. The new SP showed 36 kDa of relative molecular mass and its absolute mass was confirmed by mass spectrometry as 32,520 Da. It presents 79.48% identity when compared to other SVSPs and was able to degrade the α -chain of fibrinogen, in *in vitro* models, because of this it is considered a SVTLE-A. It showed dose-dependent activity in the process of degradation of fibrin networks demonstrating greater specificity for this activity when compared to its thrombolytic action. BbrzSP-32 demonstrated proteolytic activity on gelatin and chromogenic substrates for serine proteases and thrombin-like enzymes (S-2288 and S-2238 respectively), besides having coagulant activity on human plasma. After pre-incubation with PMSF and benzamidine the coagulant and proteolytic activities on the S-2288 and S-2238 substrates were reduced. BbrzSP-32 shows stability against pH and temperature variations, demonstrating optimum activity between 30 and 40 °C and in the pH range 7.5 to 8.5. A new SP with potential biotechnological application was isolated.

© 2016 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

The composition of snake venoms results from the interaction/action of various factors, leading to an efficient biological product and complex nature, which has as main objective the detention, death and the promotion of initial digestion of prey. And they deserve attention because of their numerous proteins and peptides with different biochemical, structural and pharmacological effects, acting through different mechanisms. Some toxins from snake venoms have been widely used as tools for functional analysis of molecular receptors on platelets

and tumor cells, to understand the mechanisms of blood coagulation, ion channels and to understand the immune system (Calderon et al., 2014; Du et al., 2002; Gutiérrez et al., 2005; Six and Dennis, 2000; Theakston and Kamiguti, 2002).

Bothropic envenomation causes various pathophysiological disorders, including systemic disorders of hemostasis related to the acting of factor X and II, consumption of fibrinogen and inhibition of platelet aggregation, leading to characteristic systemic symptoms (Zelanis et al., 2007). Thus, cataloging the venom profile is an essential requirement to provide useful molecular tools for elucidating the mechanisms of action of toxins, as well as antagonists searching. The structural understanding of these agents enables changes in the structure to build a more effective and specific therapeutic activity. Some proteins from snake venoms are able to interact with factors of the coagulation cascade, while others may act on platelets and other components of the hemostatic system. And, such effects are usually attributed to serine

* Corresponding authors at: Fundação Oswaldo Cruz Rondônia, Centro de Estudos de Biomoléculas Aplicadas à Saúde, Rua da Beira, 7176, Bairro Lagoa, 76812-245 Porto Velho, Rondônia, Brazil.

E-mail addresses: stabeli@fiocruz.br (R.G. Stábili), andreimar@fiocruz.br (A.M. Soares).

proteases, metalloproteases and disintegrins of snake venoms (Cominetti et al., 2004; Gay et al., 2005; Gutiérrez et al., 2005; Kamiguti et al., 1998).

One of the greatest relevance in the accident framework by venomous snakes is related to blood coagulant action, which proteases strongly participate by two independent mechanisms: activating some factors of coagulation cascade or converting fibrinogen to fibrin, leading to blood incoagulability, since fibrinogen was consumed (Ghorbanpur et al., 2009). These proteases are, in general called snake venom thrombin-like enzymes (SVTLE), because they present some functions similar to thrombin. SVTLE belong to a class of enzymes that has in the active site a highly conserved catalytic amino acids triad (His57, Asp102 and Ser195) that has analogous positions to mammalian serine proteases (Castro et al., 2004; Costa et al., 2008).

Bothrops brazili Hoge, 1954 (Brazil's Lancehead) is a rare venomous pitviper, and information about its venom composition has been restricted only to four myotoxins MTX-I, MTX-II (Costa et al., 2008), BbTX K49-II PLA₂ and BbTX III-PLA₂ (Huancahuire-Vega et al., 2009), one L-amino acid oxidase with cytotoxic action on cell cultures of *Staphylococcus aureus*, *Vibrio cholerae* e *Streptococcus faecalis* and one metalloproteinase (BbrzMP-I), with antiplasmodial activity (Kayano et al., 2015). It is worth noting that so far no serine protease has been described in the venom of *B. brazili*. So, the objective of this work was to isolate and perform a partial biochemical and enzymatic characterization of the first serine protease from *B. brazili* snake venom.

2. Material and methods

2.1. Isolation of BbrzSP-32

The new serine protease was isolated after chromatographic fractionation of *B. brazili* venom by bioaffinity and reverse phase chromatography. About 400 mg of crude venom was solubilized in 1 mL of 50 mM Tris–HCl pH 7.6 and centrifuged at $9,000 \times g$ for 10 min at room temperature. The clear supernatant was applied to Column Tricorn 10/100 packed with Benzamidine-Sepharose resin (GE Healthcare), previously equilibrated with 50 mM Tris–HCl pH 7.6. The elution of proteins was performed using two steps: (i) 50 mM Tris–HCl pH 7.6 (ii) 50 mM Tris–HCl pH 7.6 plus 1 M NaCl and (iii) 20 mM Glycine at a flow of 1 mL/min. The collected samples were desalted in a Sephadex G-25 Superfine 5 mL column (GE Healthcare) and lyophilized. The enriched-fraction in coagulant activity was lyophilized, dissolved in 0.1% trifluoroacetic acid (TFA) and a reversed-phase high performance chromatography was performed using a C2/C18 column (10 mm $\times$ 4.6 mm, 3 μ m, 120 Å) (GE Healthcare), pre-equilibrated with 0.1% TFA. The elution was carried out in a linear gradient of 0–50% (99% acetonitrile + 0.1% TFA) at a flow rate of 0.75 mL/min. In both chromatographies, the elution of proteins was monitored at 280 nm. All chromatographic steps were performed in an Akta Purifier 10 system (GE Healthcare), capable of controlling pressure and temperature. The protein was quantified by Bradford's method (Hammond and Kruger, 1988).

2.2. Molecular mass determination

The molecular mass was estimated by 12.5% SDS-PAGE (Laemmli, 1970) and determined by MALDI-TOF mass spectrometry using an AXIMA TOF² system (Shimadzu/Kratos Scientific). The mass spectrum was acquired in linear mode, using a saturated solution of sinapinic acid as ionization matrix.

2.3. Sequencing determination

2.3.1. Solution digestion

The protein was reduced by treatment with a solution of 20 mM DTT in 50 mM NH₄HCO₃ for 1 h at 30 °C and alkylated with a solution of 150 mM iodine acetamide in 50 mM NH₄HCO₃ for 1 h at 30 °C. The

sample was then digested overnight at 37 °C with trypsin (Sequencing grade modified, Promega). Afterwards, tryptic peptides were cleaned up with a Proxeon Stage tip and eluted with 70% acetonitrile/0.1% trifluoroacetic acid. The eluted peptides were dried in a vacuum centrifuge and resuspended in 1% formic acid for LC–MS/MS analysis. Mass spectrometry was performed in a NanoAcquity (Waters) HPLC coupled to an OrbitrapVelos mass spectrometer (Thermo Scientific). An aliquot of the tryptic digest was injected and separated in a C18 reverse phase column (75 μ m Oi, 10 cm, nanoAcquity, 1.7 μ m BEH column, Waters). Bound peptides were eluted with the following gradients: 1 to 40% B in 20 min, followed by 40 to 60% B in 5 min.; flow was 250 nL/min (A: 0.1% formic acid in water; B: 0.1% formic acid in acetonitrile). Eluted peptides were ionized in an emitter needle (PicoTipTM, New Objective). Spray voltage applied was 1900 V. Peptide masses (m/z : 300–1700) were measured in full scan in the Orbitrap at a resolution of 60,000 at 400 m/z . Up to the 5 most abundant peptides (minimum intensity of 1500 counts) were selected from each MS scan and fragmented in the HCD collision cell using a normalized collision energy (NCE) of 40% with nitrogen as the collision gas. Fragments were detected in the Orbitrap with a resolution of 7500 FWHM at 400 m/z . Raw data were collected using ThermoXcalibur (v.2.1.0.1140).

2.3.2. Database search

Raw data were analyzed using Proteome Discoverer (v.1.3.0.339) software. A search was run with the search engine MASCOT against the NCBIInrSerpentes database. Also, an. mgf file was generated in Proteome Discoverer and this file was used to search with PEAKS Studio (v.5.3.) against the same database. After that, the homology search bioinformatics tool SPIDER* was used to run a tag homology search. The search parameters were: Database/Taxonomy: NCBIInrSerpentes; missed cleavage: 2; fixed modifications: carbamidomethyl of cysteine; variable modifications: oxidation of methionine and pyro-Glu (N-term Glutamine); peptide tolerance: 10 ppm for MS spectra and 0.05 Da for MS/MS spectra; and enzyme: trypsin. The Percolator node was used in the Proteome Discoverer Mascot search in order to discriminate correct from incorrect peptide spectrum matches using the q -value (FDR) to improve the number of confidently identified peptides at a given false discovery rate. The results have been filtered so that only high confidence peptides (FDR $\leq$ 0.01) are considered for identification results.

2.4. Molecular modeling and determination of glycosylation sites

To investigate the structural characteristics of its amino acids, we performed homology modeling of BbrzSP-32's sequence using as a template the crystal structure of AhV_{TL}-I, a glycosylated Snake-venom thrombin-like enzyme from *Agkistrodon halys* (PDB code: 4E7N) with a resolution of 1.75 Å (Zeng et al., 2013). For search and retrieval of the template structure, Protein Blast (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) (Altschul et al., 1990) and Protein Data Bank (PDB) (<http://www.pdb.org>) [Accessed 06 Feb. 2015] were used. The sequence alignments were carried out using MODELLER v9.10 (Sali and Blundell, 1993) and ClustalW (Thompson et al., 1994) softwares. Model building was carried out in MODELLER v9.10. A total of 1000 models were generated and the final model was selected based on the lowest DOPE scores calculated by MODELLER software. The overall stereo chemical quality of the final model for BbrzSP-32 was assessed by the program PROCHECK (Laskowski et al., 1993). Interactive visualization and comparative analysis of molecular structures were carried out in Swiss-PDB viewer (Guex and Peitsch, 1997) and structure images were taken with Persistence of Vision Raytracer (POV-ray) 3.62 (<http://www.povray.org>) [Accessed 06 Feb. 2015]. Potential sites of N-glycosylation were predicted in BbrzSP-32 by the program NetNGlyc v.1.0, available at the Center for Biological Sequence Analysis server (<http://www.cbs.dtu.dk/>).

2.5. Fibrinogenolytic activity

The fibrinogenolytic activity of BbrzSP-32 was determined according to Cominetti and coworkers (Cominetti et al., 2004) with modifications. Samples of bovine fibrinogen (10 mg/mL) were incubated with 2 μ g BbrzSP-32 at 37 °C during different times (5, 10, 30 and 60 min). The control was coupled with a fibrinogen solution incubated with a dissolution sample buffer at 37 °C for 60 min. The reactions were stopped by adding 0.5 mM Tris–HCl pH 8.0, 20% glycerol (v/v), 4% SDS (v/v), 0.05% bromophenol blue (w/v) and 0.3% DL-dithiothreitol (w/v), in a 1:1 proportion. After overnight incubation, the digested fibrinogen was analyzed using 10% SDS-PAGE.

2.6. Fibrinolytic activity

Fibrinolytic activity was evaluated according to the method described by Cominetti and coworkers (Cominetti et al., 2004). First, enough agarose to prepare a 0.9% gel was solubilized in 50 mM Tris–HCl pH 7.4 plus 100 mM CaCl₂ and heated until melted. At a temperature of 37 °C, 0.3% bovine fibrinogen, dissolved in 50 mM Tris–HCl pH 7.4 plus 100 mM CaCl₂, and 1.2 U/mL bovine thrombin were added to the agarose solution. Afterwards, the mixture was polymerized in a Petri dish (0.9 cm $\times$ 15 cm) and 1, 2, 4, 8, 16 and 32 μ g of BbrzSP-32 or crude venom (3 μ g, positive control), and PBS (negative control) were incubated at 37 °C overnight in orifices as previously done. The halos that formed indicating fibrinolytic activity were analyzed by comparison to negative and positive controls. One activity unit was defined as the quantity of protein capable of producing a 1 mm halo on fibrin gel. The graph was expressed in millimeters.

2.7. Thrombolytic activity

In order to evaluate thrombolytic activity, human blood was collected from healthy donors according to the CAAE authorization: 14,204,413.5.0000.0011, in the absence of anticoagulants. For testing, blood clots were performed in 24-well plates by incubating 500 μ L blood at room temperature for one hour. After this period, the clots were incubated for 24–48 h at 37 °C with different concentrations of BbrzSP-32 (83; 167 and 333 μ g/mL), crude venom of *B. brazili* (167 μ g/mL) and MilliQ water (300 μ L) (samples, positive and negative control, respectively). After the incubation period, the sturdy clot was removed and the resulting volume was measured and the graph expressed in volume.

2.8. Clotting assays

The clotting activity of *B. brazili* venom and purified serine protease was determined using an Amelung Model KC4A coagulometer (Labcon, Germany). Different concentrations of *B. brazili* venom and serine protease were mixed with normal citrated human plasma (donated by the blood bank of Hospital Universitário Antônio Pedro, UFF) CAAE authorization: 14,204,413.5.0000.0011. The amount of venom and serine protease (μ g/mL) that clotted plasma in 60 s was denoted as the Minimum Coagulant Dose (MCD). Inhibition of clotting activity was done by incubating one MCD of enzymes for 30 min at room temperature with the following substances: 5 mM/10 mM Benzamidine and 1 mM/3 mM PMSF (inhibitors of serine proteases) or with 5 mM/10 mM EDTA (inhibitor of metalloprotease). Then, the mixture was added to plasma and the clotting time recorded. Control experiments were performed by incubating venom or serine protease with DMSO or saline, instead of inhibitors. Results were expressed as clotting time (s)/protein concentration.

2.9. Hydrolytic activity upon chromogenic substrate

The ability of *B. brazili* venom and the isolated serine protease to hydrolyze chromogenic substrates, S-2238 (for thrombin-like enzymes) and S-2288 (for serine protease) (0.5 mM, final concentration) was tested in a Thermomax Microplate reader (Molecular Devices, USA) monitored at 405 nm for 20 min at 37 °C. Inhibitors (5 mM and 10 mM PMSF; 1 mM and 3 mM benzamidine or 5 mM and 10 mM EDTA) were incubated for 30 min at room temperature with crude venom of *B. brazili* and the new serine protease, then the enzymatic reaction was assayed with chromogenic substrates S-2238 and S-2288. Control experiments were performed by incubating *B. brazili* venom and serine protease with DMSO (1% v/v, final concentration) or saline. Results were expressed as % of inhibition.

2.10. Platelet aggregation assay

The platelet aggregation assay was carried out according to Fuly and coworkers (Fuly et al., 2002), with some modifications. Platelet aggregation was monitored turbidimetrically in an Aggregometer (Chrono Log model 490 2D, Havertown, USA) using Washed-Platelets (WP). WP were obtained from human whole blood of health volunteer donors (CAAE: 14,204,413.5.0000.0011). Different concentrations of the serine protease isolated from *B. brazili* were incubated with WP for 5 min at 37 °C under stirring. Then, platelet aggregation was triggered by adding collagen (24 μ g/mL). Assays were performed at 37 °C in siliconized glass cuvettes in a final volume of 300 μ L.

2.11. pH stability

The stability study of BbrzSP-32 was performed by preincubating the enzyme for 30 min at room temperature with in Tris–HCl buffer on different pH values (5.0–11.0) and then a reaction was triggered by adding the chromogenic substrate S-2238. Hydrolytic activity was assayed as mentioned in Section 2.10.

2.12. Thermal stability on bapna

The thermal stability was measured after preincubating 2 μ g BbrzSP-32 diluted in Tris–HCl buffer (50 mM, pH 8.0) for 30 min at ranging temperature incubation values (20, 30, 37, 40, 50, 60 and 70 °C). The amidolytic activity was assayed in a 500 μ L solution containing 1% N $^{\alpha}$ -Benzoyl-DL-Arginyl-p-nitroanilide (BAPNA) in 50 mM Tris–HCl pH 8.0. The product of the reaction was analyzed at 405 nm using a value of 8800 M^{−1} cm^{−1} as the molar extinction coefficient of p-nitroanilide. A unit of enzymatic activity was defined as the quantity of enzyme capable of releasing 1 μ mol p-nitroanilide/min, corresponding to the increase of 0.009 absorbance units measured at A405 nm.

2.13. Statistical analysis

Results are expressed as means $\pm$ SEM obtained with the indicated number of experiments performed. The statistical significance of differences among experimental groups was evaluated using Analysis of variance (ANOVA) and multiple comparisons by the Tukey's method and *p* values of ≤ 0.05 were considered statistically significant.

3. Results

The enzyme was isolated by two chromatographic steps: (i) bioaffinity chromatography in a Benzamidine-Sepharose column and (ii) Reverse Phase in a C2/C18 column. Three peaks having absorbance at 280 nm resulted from the fractionation of *B. brazili* venom on a Benzamidine-Sepharose (Fig. 1A), the last one showed the highest coagulant activity (data not shown) and then, it was subjected to reverse phase chromatography in a C2/C18 column, then resulting in

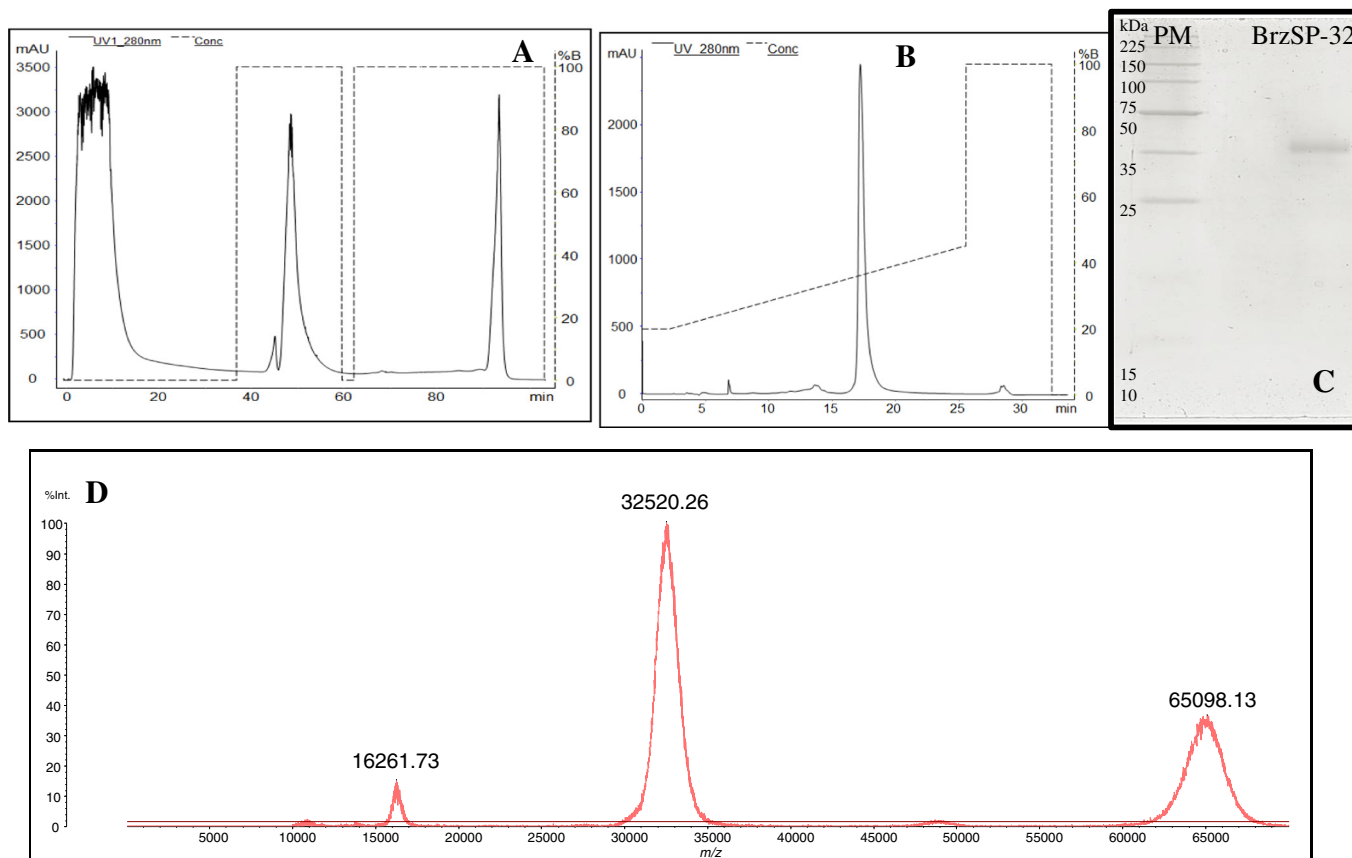


Fig. 1. Isolation and characterization of BbrzSP-32. A) Liquid chromatography in a Benzamidine Column, the third peak was submitted to reversed phase. B) High Performance Liquid Chromatography using a C2/C18 column (10 mm × 4.6 mm, 3 μm, 120 Å). C) SDS-PAGE denaturing conditions. Line 1: molecular mass standard, V849A (Promega) (10–225 kDa). Lines: 2 – BbrzSP-32. D) MS spectrum of BbrzSP-32 obtained by MALDI-TOF showing 32,520.26 m/z and its doubly-charged (16,261.73 m/z) and mono-charged dimer ions (65,098.13 m/z).

one peak (Fig. 1B). As shown in Fig. 1C, the isolated enzyme gave a single protein band of, approximately, 32 kDa on SDS-PAGE under reduced conditions, its molecular weight was confirmed by mass spectrometry in an AXIMA TOF² system as well as its homogeneity (Fig. 1D). The isolated serine protease was denoted BbrzSP-32.

The amino acid sequence of BbrzSP-32 was almost completely identified using normalized collision energy (NCE) for higher energy collisionally activated dissociation (HCD) MS/MS spectra of BbrzSP-32 tryptic peptides, which were extracted and searched using MASCOT engine against the NCBI nrSerpentes database. Sixteen tryptic peptides had their sequences identified and their alignment with amino acid sequences of others homologous thrombin-like enzymes from *Agkistrodon halys* (gi_383280398) *B. jararaca* (gi:14,285,806), *B. atrox* (gi:114,837), *B. leucurus* (gi:357,580,550) and *B. jararacussu* (gi:123,895,619) in order to elucidate BbrzSP-32 primary structure (Fig. 2 and Supplementary material). However, four little gaps in high conserved regions remained unelucidated, probably due to negatively net charge of the fragments, which promoted suppression effects in MS/MS analysis.

In order to create the molecular modeling of BbrzSP-32, LC-MS/MS sequencing was used and the gaps were filled in by homology with a thrombin-like enzyme from *Agkistrodon halys* venom (PDB ID: 4E7N) (Zeng et al., 2013). Glycosylation sites were predicted on residues Asn96 and Asn138 (Fig. 3).

According to the fibrinogenolytic activity by SDS-PAGE, BbrzSP-32 can be classified as SVTLE-A, because it acts on the α-chain of fibrinogen. The cleavage of the α-chain started from the first analysis time, i.e. five minutes (Fig. 4A). Besides degrading fibrinogen, thus, generating fibrinopeptides, BbrzSP-32 also has fibrinolytic activity (Fig. 4B),

i.e., the enzyme has the ability to degrade fibrin networks formed by copolymerization agarose, in a dose-dependent way. The enzymatic activity on fibrinogen of BbrzSP-32 (8 μg) was higher than crude venom of *B. brazili* (40 μg).

The thrombolytic activity (Fig. 4C) is also related to the time of incubation; after 48 h of incubation the crude venom completely degraded the clot. You can also see that other proteins present in the crude venom of *B. brazili* also have thrombolytic activity or that the synergistic action of proteins consumes the clot more efficiently when compared to the action of BbrzSP-32 alone.

The crude venom and purified serine protease presented procoagulant activity in a concentration-dependent manner, as depicted in the reduced clotting time for human plasma. The MCD upon plasma of *B. brazili* venom and serine protease was 2.4 μg/mL (Fig. 5 A and B). Benzamidine inhibited plasma clotting induced by crude venom. On the other hand, the isolated serine protease was inhibited by benzamidine and PMSF (Fig. 5C and D). Neither DMSO (1.0% or 3.0% v/v, final concentration) nor saline alone interfered with clotting times of both assays.

Activity assays were performed on enzyme substrates S-2238 (for thrombin-like enzymes) and S-2288 (for serine proteases) aiming to evaluate the hydrolysis capability of said enzyme as well as crude venom, conducted both in the presence and absence of protease inhibitors: Benzamidine, EDTA and PMSF. *B. brazili* crude venom (6 μg/mL) and serine protease enzyme (25 μg/mL) were able to hydrolyze S-2238 (0.5 mM) and S-2288 (0.5 mM) (data not shown). Both *B. brazili* and serine protease activity upon S-2238 and S-2288 were significantly reduced by PMSF or benzamidine and in a lesser degree by EDTA (Fig. 6).

BbrzSP-32 did not induce platelet aggregation on washed-platelets as well as did not inhibit collagen-induced platelet aggregation at the

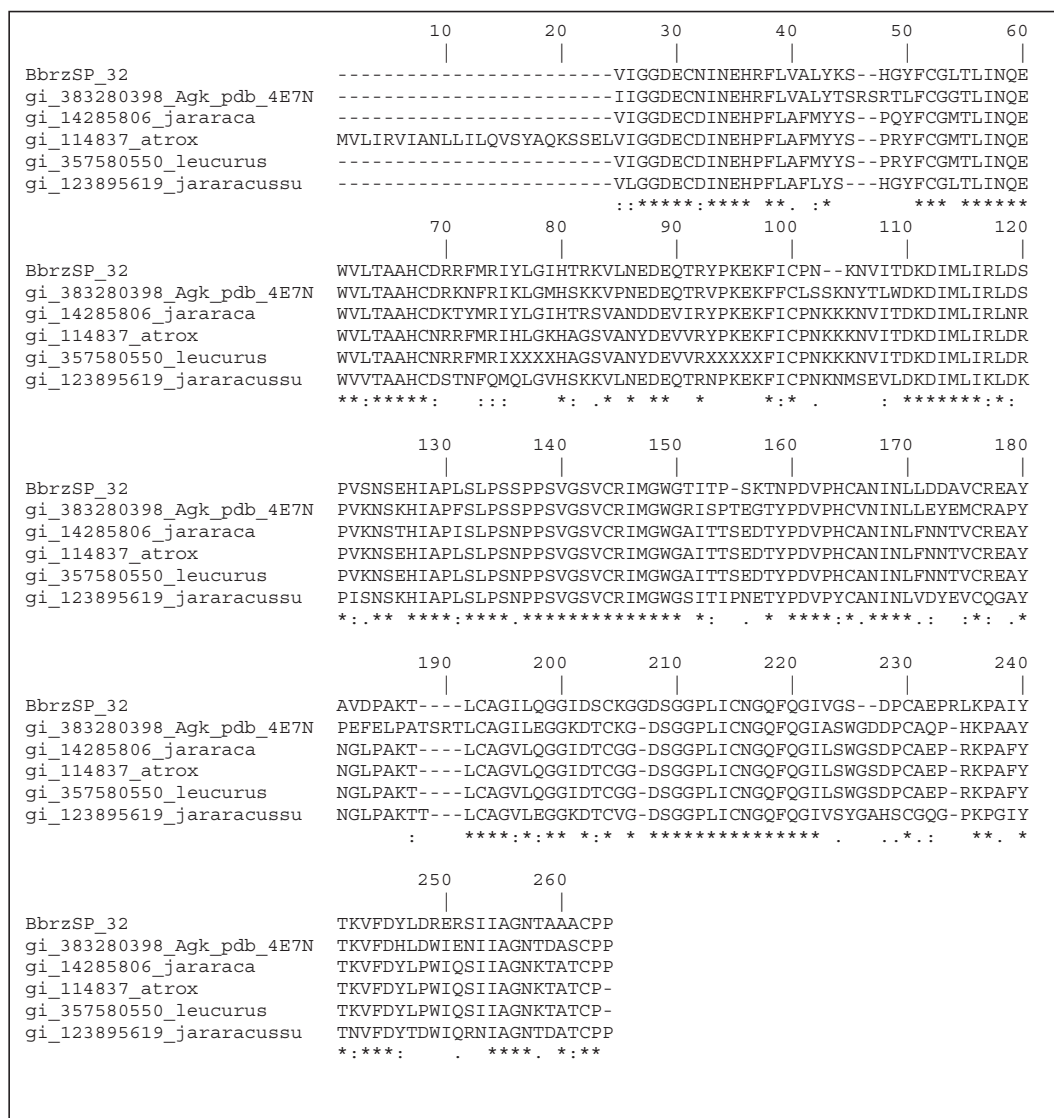


Fig. 2. Multiple sequence alignment between BbrzSP-32 tryptic peptides and thrombin-like enzymes (EC:3.4.21) from *Agkistrodon halys* (gi_383280398), *B. jararaca* (gi:14,285,806), *B. atrox* (gi:114,837), *B. leucurus* (gi:357,580,550) and *B. jararacussu* (gi:123,895,619). Asterisk indicates identical amino acid residues. Colon indicates conservation between groups of strongly similar properties. Period indicates conservation between groups of weakly similar properties. "-" means an unknown amino acid residue.

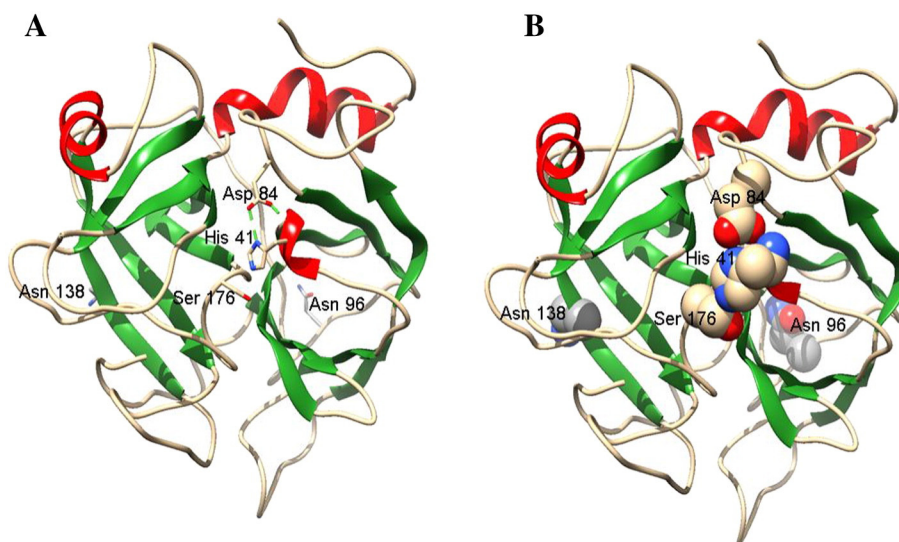


Fig. 3. Representation in "ribbon" of BbrzSP-32 performed on the Swiss-PDB Viewer and rendered with POV-ray. The catalytic triad (His41, Asp84, and Ser176) and the predicted N-linked oligosaccharides sites (Asn96 and Asn138) were detached in Sticks (A) and Spheres (B).

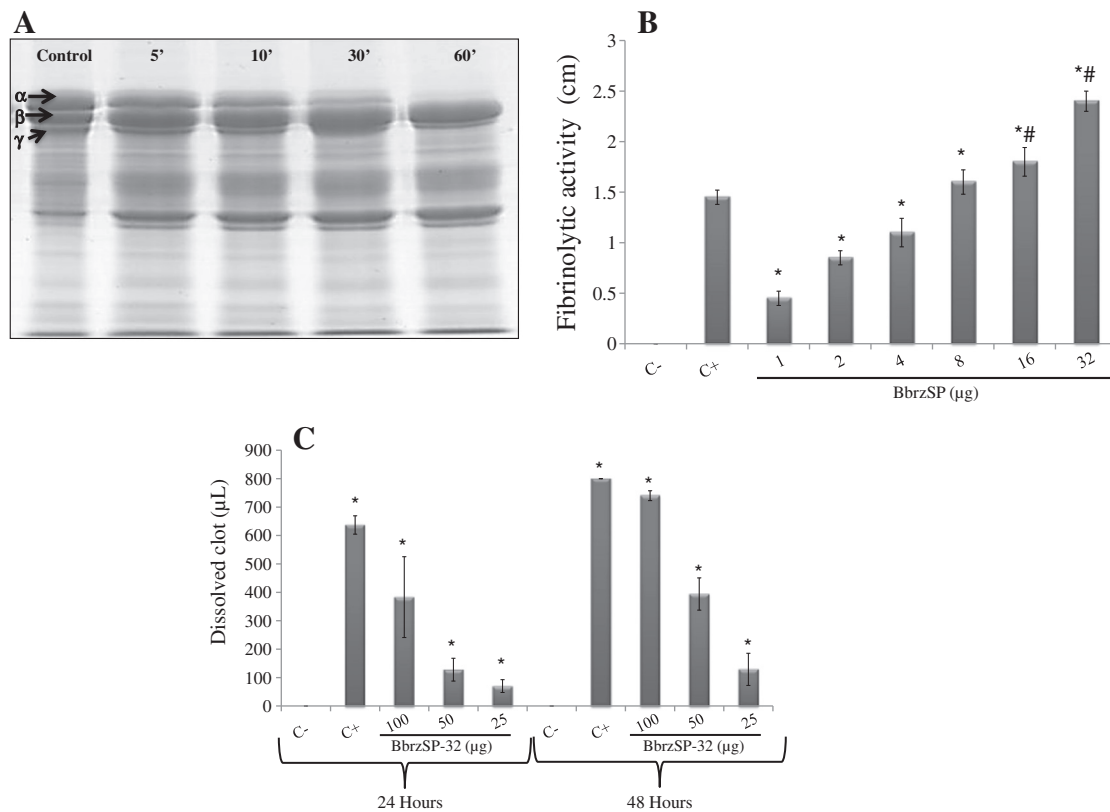


Fig. 4. A) Fibrinogenolytic activity of *B. brazili* serine protease. 5 µg of BbrzSP-32 was incubated with 50 µL of fibrinogen solution (2 mg/mL) at 37 °C for different times (5, 10, 30 and 60 min). B) Fibrinolytic activity. Results after incubation were assessed by measurement of degradation halos (cm) for varying amounts of BbrzSP-32 (1, 2, 4, 8, 16, and 32 µg) and 40 µg of crude venom of *B. brazili* (C⁺) or milliQ water (C⁻) with the fibrin network copolymerized with gelatin *p ≤ 0.05 compared to the negative control, and #p ≤ 0.05 compared to the positive control (ANOVA). C) Thrombolytic activity assay was performed with human blood incubated for 24 to 48 h at 37 °C with different concentrations of BbrzSP-32 (25, 50 and 100 µg in 300 µL), crude venom of *B. brazili* (50 mg/300 µL) (C⁺) and MilliQ water (300 µL) (C⁻) * p ≤ 0.05 compared to the negative control.

conditions assayed. The inedited serine protease isolated from *B. brazili* snake venom showed pH stability upon chromogenic substrate S-2238. At pHs ranging from 6.8 to 11 (Fig. 7A) the enzyme showed the highest activity. Furthermore, when tested in a temperature range (−20, −8, 20, 30, 37, 40 and 50) the enzyme was able to produce *p*-nitroanilide, thus showing a thermal stability (Fig. 7B). But, at temperature above 70 °C, its enzymatic activity was lost.

4. Discussion

Viperidae and Crotalidae snakes have venoms that generally induce persistent bleeding, since their venoms contain a large variety of proteins and peptides that have activities upon the hemostatic system. These compounds are known as coagulant, anticoagulant or fibrinolytic factors and some of these proteins may induce a considerable degradation of fibrinogen and other coagulation factors preventing clot formation (Braud et al., 2000; Costa et al., 2010, 2007).

Snake Venom Serine Proteases (SVSPs) are known enzymes that directly affect the hemostatic system. This article reports an efficient procedure for the isolation of an new serine protease from the crude venom of the Amazonian *B. brazili* snake using two chromatographic procedures (Fig. 1A and B) followed by the characterization of its structural and biological properties. Its molecular mass was showed to be 32,519.25 Da by MALDI-TOF/MS, which is in accordance with molecular mass of others SVSPs, that are single-chained proteins, with molecular weight ranging from 26 to 67 kDa, depending on the amount of carbohydrate (Kini, 2005; Serrano and Maroun, 2005).

BbrzSP-32 showed around 79% homology with other SVSPs (Fig. 2 and Supplementary material). Homology modelling is usually the method of choice when a clear relationship of homology between the

sequence of the target protein and at least one known structure is found. This approach gives reasonable results based on the assumption that the tertiary structures of two proteins will be similar if their sequences are related (Kroemer et al., 1996).

To evaluate the validity of 4E7N as a structural template for BbrzSP-32 modelling, we examined the sequence homologies. The alignment of BbrzSP-32 yielded 71% identity with 4E7N. The percentage of residues lying in the favored regions of a Ramachandran plot (Ramachandran et al., 1963) is one of the best guides to check the stereo chemical quality of a protein model based on the assumption that a good template should have more than 90% of the residues in the allowed regions (Laskowski et al., 1993). The analysis of the Ramachandran plot for the structure of BbrzSP-32 showed that 90.8% of the amino acids are in favorable regions (Fig. 8). The quality of the model was also assessed by comparing the predicted structure with the template structure via superimposition and RMS deviation (RMSD) assessment of atomic positions. The fact that the RMSD of Cα trace between the homology structure and the template is 1.93 Å supports that the generated model is reasonably good and quite similar to the template. The structure has two α helices on the outside and ten uniformly distributed β sheets. Most SVSPs are glycoproteins showing a variable number of N- or O-glycosylation sites in sequence positions that differ between SVSPs (Serrano and Maroun, 2005).

With respect to biological activities, BbrzSP-32 was able to initiate the degradation of the α-chain of bovine fibrinogen since the first time tested. Many serine proteases from Viperidae snake are capable of converting fibrinogen into fibrin by cleaving fibrinopeptides A and/or B (FPB) (Pirkle and Theodor, 1990; Stocker et al., 1982). By mimicking this function of thrombin, these enzymes are referred to as thrombin-like and are classified according to their preference on the catalytic

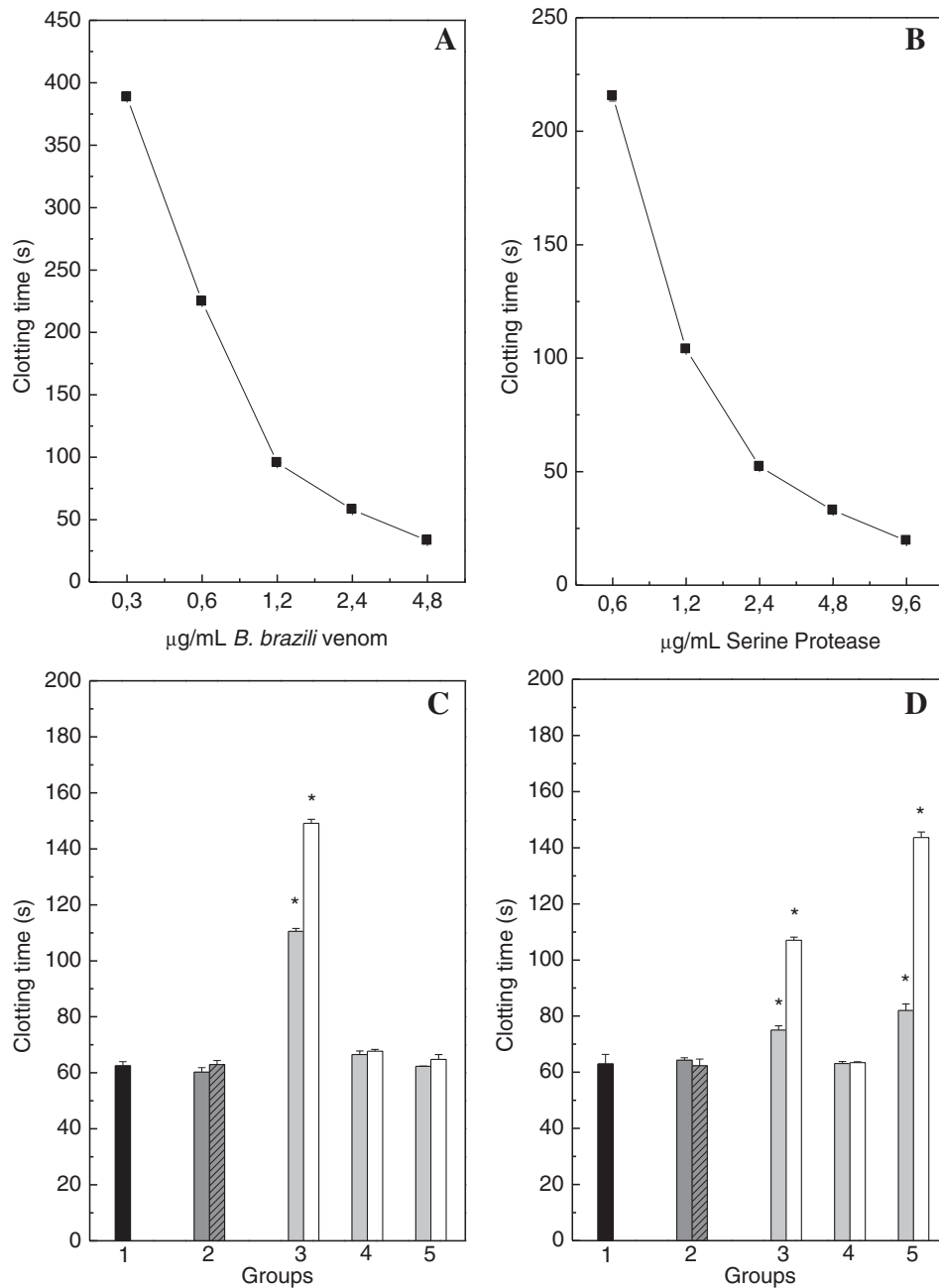


Fig. 5. Effect of *B. brazili* (panel A) and Bbrz-32 (panel B) on clotting. Different concentrations (0.3–4.8 μg/mL) of *B. brazili* venom and of purified serine protease (0.6–9.6 μg/mL) were tested upon plasma as described in the experimental section. Data expressed as mean ± SD of two individual experiments (n = 3). Effect of inhibitors on clotting activity induced by *B. brazili* venom and by the purified serine protease. Inhibitors were incubated for 30 min. at room temperature with 2.4 μg/mL of *B. brazili* venom and 2.4 μg/mL of the serine protease, respectively (panel C and D). Groups 1: *B. brazili* venom or BbrzSP-32 incubated with NaCl (black columns); Groups 2: *B. brazili* venom or BbrzSP-32 incubated with 1% DMSO (gray column) or 3% DMSO (hatched gray column); Groups 3: *B. brazili* venom or BbrzSP-32 incubated with benzamidine 5 mM (gray column) or 10 mM (white column); Groups 4: *B. brazili* venom or BbrzSP-32 incubated with 5 mM (gray column) or 10 mM (white column) EDTA; Groups 5: *B. brazili* venom or BbrzSP-32 incubated with 1 mM (gray column) or 3 mM (white column) PMSF. Data expressed as mean ± SD of two individuals experiments (n = 3). * Significance level (p < 0.05), when compared to columns 1 and 2.

activities of fibrinogen chains α, β or α and β in SVTLE-A, -B or SVTLE-SVTLE-AB, respectively (Castro et al., 2004; F.S.J. Markland, 1998). BbrzSP-32 is considered an α-thrombin-like (SVTLE-A); most SVSPs are classified as clotting enzymes and the majority releases only fibrinopeptides A (FPA) from fibrinogen (Serrano and Maroun, 2005).

The proteases which cleave preferentially only α or β chains of fibrinogen lead to an increase of fibrinopeptides A or B, respectively, thereby causing abnormal clot formation. Furthermore, in most cases, these proteins did not have activity on coagulation factor XIII, so the produced clot will be an abnormal fibrin clot (F.S. Markland, 1998) of

short polymers that are rapidly dispersed and perhaps lack the susceptibility to serpins. This has generated interest in their potential therapeutic application for the treatment of patients with occlusive arterial or venous thrombotic diseases without stimulating the endogenous fibrinolysis system (Matsui et al., 2000; White, 2005). There are serine proteases isolated from snakes being applied in clinical medicine as defibrinogenating agents, as is the case of batroxobin, isolated from *B. atrox moojeni* (now *B. moojeni*) (Stocker and Barlow, 1976) registered under the trade name Defibrase, already been used in patients suffering from thrombosis, myocardial infarction, peripheral vascular disease,

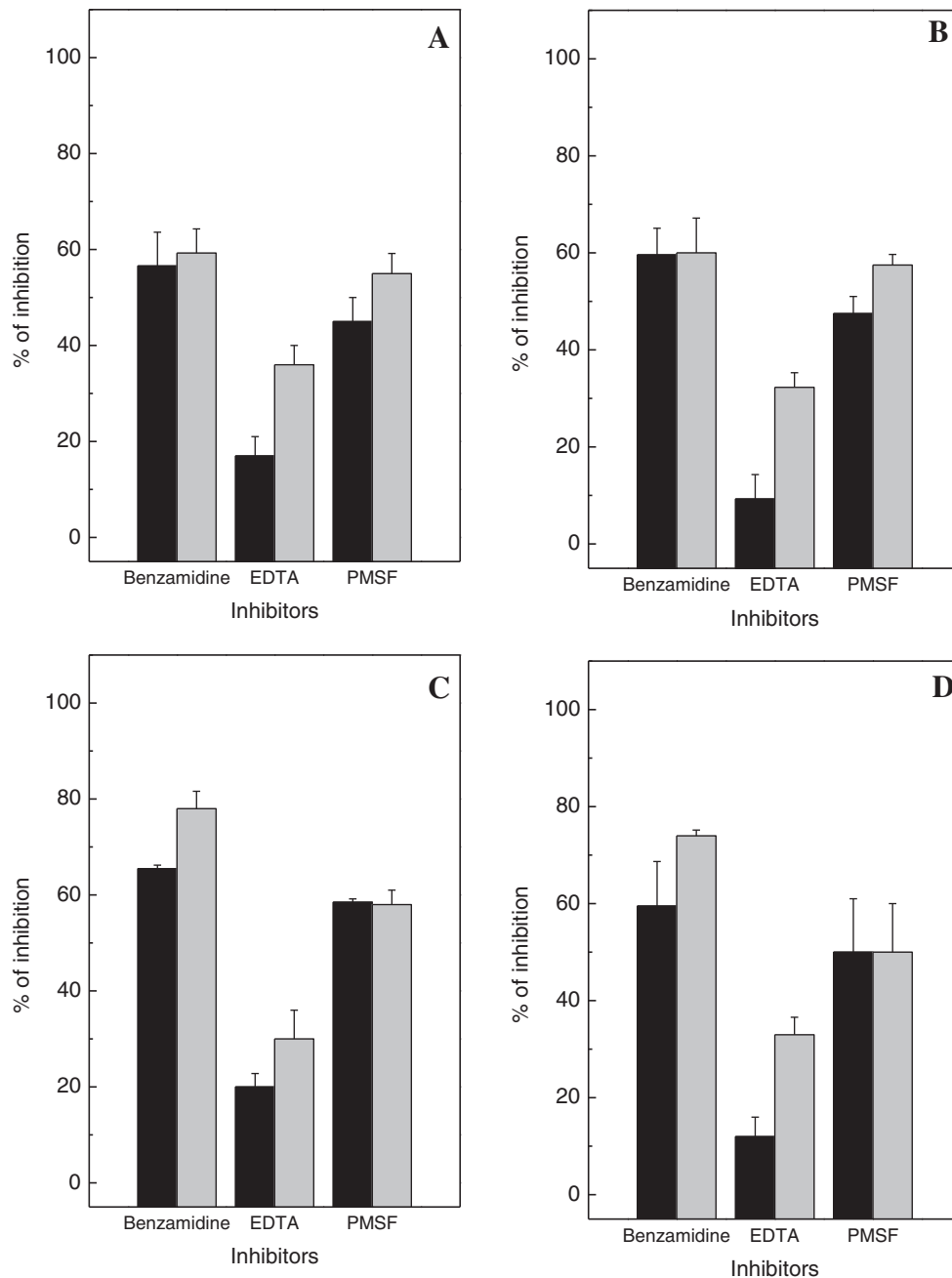


Fig. 6. Effect of inhibitors upon *B. brazili* and BbrzSP-32 activity. Inhibitors were incubated for 30 min. at room temperature with *B. brazili* venom (6 $\mu\text{g/mL}$), and then the enzymatic activity upon S-2238 (Panel A) or S-2288 (Panel B) was performed; and with BbrzSP-32 (25 $\mu\text{g/mL}$), and then the enzymatic activity upon S-2238 (Panel C) or S-2288 (Panel D) was performed. Inhibitors: Benzamidine: 5 mM (black column) or 10 mM (gray column); EDTA: 5 mM (black column) or 10 mM (gray column); PMSF: 1 mM (black column) or 3 mM (gray column). Data expressed as mean $\pm$ SEM of two individual experiments ($n = 3$).

acute ischemia and renal transplant rejection (Niewiarowski et al., 1979; Stocker et al., 1982). The same enzyme is also used in the preparation of fibrin adhesives, which are used as an alternative or complement to conventional suturing processes (Dascombe et al., 1997).

The majority of serine proteases may act on several natural and synthetic substrates. The clotting activity of Viperidae family venoms is associated with specific proteases groups: metalloproteases and serine proteases. And their enzymatic activities are generally affected by specific inhibitors such as benzamidine, PMSF and in a lesser degree by EDTA (metalloprotease inhibitor/ Ca^{2+} chelator). The clotting activity of the crude venom was only reduced after pre-incubation with benzamidine; this result is explained by the presence of other proteases that have clotting activity and did not have their activities reduced/

inhibited by the inhibitors tested. On the other hand, BbrzSP-32's dose-dependent clotting activity was reduced by PMSF and benzamidine; this reduction is acceptable since serine proteases can undergo reduction or avoidance of its activities after treatment with specific inhibitors, these inhibitors in turn can act reversibly or irreversibly. PMSF is an example of an inhibitor which has the capacity to bind in a specific serine residue at the catalytic site of serine, forming an irreversible bond that inactivates the activity of these enzymes. The inhibitors leupeptin and benzamidine bind reversibly and compete for the active site of serine proteases. Serine proteases has the amino acids arginine and lysine, which are residues for which the benzamidine have greater specificity; benzamidine and leupeptin can be used as insulating material to aid the enzyme in question. Generally, snake

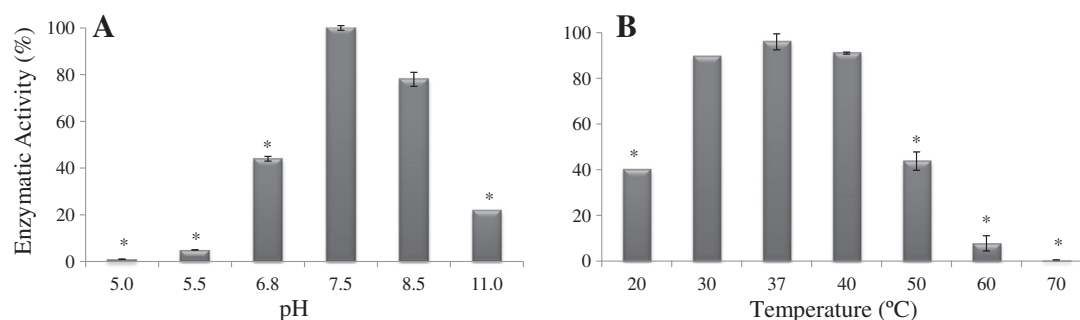


Fig. 7. A) Effect of pH on enzymatic activity. BbrzSP-32 was incubated for 30 min at room temperature with buffers of different pH values, and then the reaction was triggered adding S-2238. B) Effect of temperature. BbrzSP-32 was incubated for 30 min at different temperatures values, and then a reaction was triggered by the addition of BAPNA.

serine proteases are not sensitive to the action of endogenous inhibitors of serpin, such as antithrombin III and aprotinin (Serrano and Maroun, 2005).

Similar data could be observed by testing with substrates S-2238 and S-2288 where both the crude venom and BbrzSP-32 had reduced their activities after pre-incubation with benzamidine and PMSF. This result corroborates with other serine proteases isolated from other species: such as: BjuSSP-I, a thrombin-like isolated from *B. jararacussu* snake venom that showed its clotting, esterase and amidolytic activity to be reduced after incubation with PMSF (Sant' Ana et al., 2008), BpiSP27 and BpiSP41 isolated from *B. pirajai* snake venom that had reduced their hydrolytic activities upon S-2238 substrate by PMSF and benzamidine (Menaldo et al., 2012), Agacutase, isolated from *Deinagkistrodon acutus* snake venom, showed its clotting activity reduced by PMSF (Tang et al., 2013), Da-36, isolated from *Deinagkistrodon acutus* snake venom that had reduced its hydrolytic activity upon TAME by PMSF and weakly decreased by benzamidine (Zheng et al., 2013), among others.

Platelets form a vital part of the haemostatic process. They act as the 'front line' in plugging any vascular deficiency, as well as providing activating surfaces for the coagulation cascade. They are metabolically active and subject to many forms of attack. There are two likely principal effects of snake venoms on platelets; (I) inhibition of platelet activity, thus reducing their effectiveness in hemostasis; and (II) promotion of

platelet activity, increasing their contribution to hemostasis (White, 2005). Both activities were tested by incubating BbrzSP-32 with washed-platelets and the enzyme was not able to influence in platelet aggregation neither inducing nor inhibiting it. Basic serine proteases usually display direct platelet-aggregating activity while acidic proteins are described to have a variety of proteolytic activities on substrates related to hemostasis (Serrano and Maroun, 2005).

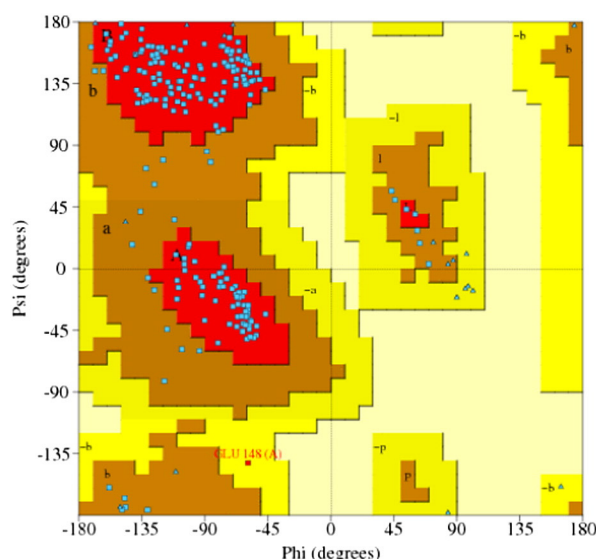
BbrzSP-32 demonstrated to be a resistant enzyme when tested in heat and pH ranges. In general, serine fibrinogenolytic enzymes are proteins that show a large resistance to inactivation by heat and pH extremes and this resistance to denaturation is probably provided by covalently bound carbohydrates (Swenson and Markland, 2005); based on its enzymatic activities, the protein proved to be a new serine protease from snake venom and the first isolated from *B. brazili*.

In conclusion, based on its biochemical and enzymatic characteristics, BbrzSP-32 was identified as the first thrombin-like enzyme reported from *B. brazili* snake venom.

Supplementary data to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpa.2016.01.021>.

Conflict of interest

There are no conflicts of interest.



1. Ramachandran Plot statistics

	No. of residues	%-tage
Most favoured regions [A,B,L]	174	90.6%
Additional allowed regions [a,b,l,p]	16	8.3%
Generously allowed regions [-a,-b,-l,-p]	2	1.0%
Disallowed regions [XX]	0	0.0%
Non-glycine and non-proline residues	192	100.0%
End-residues (excl. Gly and Pro)	1	
Glycine residues	19	
Proline residues	17	
Total number of residues	229	

Fig. 8. Analysis of the Ramachandran of BbrzSP-32. The result shows 90.8% of the amino acids in favorable regions.

Acknowledgment

The authors express their gratitude to Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, No. 550854/2010-0 and No. 404358/2012-8), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, EDITAL 047/2012 PRÓ-AMAZÔNIA), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Toxinas (INCT-Tox), Secretaria de Estado do Planejamento e Coordenação Geral (CNPQ-SEPLAN-RO), CICYT (CTQ2009-07758) and the *Generalitat de Catalunya* (2009SGR 1024) for financial support, and to Conselho de Gestão do Patrimônio Genético (CGEN/MMA) for the authorization number 010627/2011-1. This study was authorized by CGEN/CNPq (010627/2011-1), IBAMA (27131-2) and human research committee CAAE: 14204413.5.0000.0011. The authors thank the Program for Technological Development in Tools for Health-PDTIS-FIOCRUZ for use of its facilities. The authors thank the Dra. Maria Antonia O. Caballol (CIBER-BBN, Barcelona Science Park, Barcelona, Spain) for the technical assistance in Proteomic Platform. Amy Grabner provided the English editing of the manuscript.

References

- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., Lipman, D.J., 1990. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215, 403–410. [http://dx.doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2).
- Braud, S., Bon, C., Wisner, A., 2000. Snake venom proteins acting on hemostasis. *Biochimie* [http://dx.doi.org/10.1016/S0300-9084\(00\)01178-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0300-9084(00)01178-0).
- Calderon, L.A., Sobrinho, J.C., Zaqueo, K.D., De Moura, A.A., Grabner, A.N., Mazzi, M.V., Marcussi, S., Nomizo, A., Fernandes, C.F.C., Zuliani, J.P., Carvalho, B.M.A., Da Silva, S.L., Stábili, R.G., Soares, A.M., 2014. Antitumoral activity of snake venom proteins: new trends in cancer therapy. *Biomed. Res. Int.* <http://dx.doi.org/10.1155/2014/203639>.
- Castro, H.C., Zingali, R.B., Albuquerque, M.G., Pujol-Luz, M., Rodrigues, C.R., 2004. Snake venom thrombin-like enzymes: from reptilase to now. *Cell. Mol. Life Sci.* <http://dx.doi.org/10.1007/s00018-003-3325-z>.
- Cominetti, M.R., Terruggi, C.H.B., Ramos, O.H.P., Fox, J.W., Mariano-Oliveira, A., De Freitas, M.S., Figueiredo, C.C., Morandi, V., Selistree-de-Araujo, H.S., 2004. Alternagin-C, a disintegrin-like protein, induces vascular endothelial cell growth factor (VEGF) expression and endothelial cell proliferation in vitro. *J. Biol. Chem.* 279, 18247–18255. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M311771200>.
- Costa, J.O., Petric, C.B., Hamaguchi, A., Homs-Brandeburgo, M.I., Oliveira, C.Z., Soares, A.M., Oliveira, F., 2007. Purification and functional characterization of two fibrinolytic enzymes from *Bothrops alternatus* Venom. *J. Venomous Anim. Toxins Incl. Trop. Dis.*
- Costa, T.R., Menaldo, D.L., Oliveira, C.Z., Santos-Filho, N.A., Teixeira, S.S., Nomizo, A., Fuly, A.L., Monteiro, M.C., de Souza, B.M., Palma, M.S., Stábili, R.G., Sampaio, S.V., Soares, A.M., 2008. Myotoxic phospholipases A₂ isolated from *Bothrops brazili* snake venom and synthetic peptides derived from their C-terminal region: cytotoxic effect on microorganism and tumor cells. *Peptides* 29, 1645–1656. <http://dx.doi.org/10.1016/j.peptides.2008.05.021>.
- Costa, J.D.O., Fonseca, K.C., Garrote-Filho, M.S., Cunha, C.C., De Freitas, M.V., Silva, H.S., Araújo, R.B., Penha-Silva, N., De Oliveira, F., 2010. Structural and functional comparison of proteolytic enzymes from plant latex and snake venoms. *Biochimie* <http://dx.doi.org/10.1016/j.biochi.2010.09.002>.
- Dascombe, W.H., Dumanian, G., Hong, C., Heil, B.V., Labadie, K., Hessel, B., Blomback, B., Johnson, P.C., 1997. Application of thrombin based fibrin glue and non-thrombin based batroxobin glue on intact human blood vessels: evidence for transmembrane thrombin activity. *Thromb. Haemost.* 78, 947–951.
- Du, X.Y., Clemetson, J.M., Navdaev, A., Magnenat, E.M., Wells, T.N.C., Clemetson, K.J., 2002. Ophioluxin, a convulxin-like C-type lectin from *Ophiophagus hannah* (king cobra) is a powerful platelet activator via glycoprotein VI. *J. Biol. Chem.* 277, 35124–35132. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M204372200>.
- Fuly, A.L., De Miranda, A.L.P., Zingali, R.B., Guimarães, J.A., 2002. Purification and characterization of a phospholipase A₂ isoenzyme isolated from *Lachesis muta* snake venom. *Biochem. Pharmacol.* 63, 1589–1597. [http://dx.doi.org/10.1016/S0006-2952\(02\)00873-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0006-2952(02)00873-0).
- Gay, C.C., Leiva, L.C., Maruñak, S., Teibler, P., Acosta De Pérez, O., 2005. Proteolytic, edematogenic and myotoxic activities of a hemorrhagic metalloproteinase isolated from *Bothrops alternatus* venom. *Toxicon* 46, 546–554. <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2005.06.019>.
- Ghorbanpur, M., Zare Mirakabadi, A., Zokaei, F., Zolfagharian, H., Rabiei, H., 2009. Purification and partial characterization of a coagulant serine protease from the venom of the Iranian snake *Agkistrodon halys*. *J. Venomous Anim. Toxins Incl. Trop. Dis.*
- Guex, N., Peitsch, M.C., 1997. SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis* 18, 2714–2723. <http://dx.doi.org/10.1002/elps.1150181505>.
- 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. <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2005.02.029>.
- Hammond, J.B., Kruger, N.J., 1988. The Bradford method for protein quantitation. *Methods Mol. Biol.* 3, 25–32. <http://dx.doi.org/10.1385/0-89603-126-8-25>.
- Huancachure-Vega, S., Ponce-Soto, L.A., Martins-de-Souza, D., Marangoni, S., 2009. Structural and functional characterization of brazilitoxins II and III (BbTX-II and -III), two myotoxins from the venom of *Bothrops brazili* snake. *Toxicon* 54, 818–827. <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2009.06.008>.
- Kamiguti, A.S., Zuzel, M., Theakston, R.D.G., 1998. Snake venom metalloproteinases and disintegrins: interactions with cells. *Braz. J. Med. Biol. Res.* <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-879X1998000700001>.
- Kayano, A.M., Simões-Silva, R., Medeiros, P.S.M., Maltarollo, V.G., Honório, K.M., Oliveira, E., Albericio, F., da Silva, S.L., Aguiar, A.C.C., Krettli, A.U., Fernandes, C.F.C., Zuliani, J.P., Calderon, L.A., Stábili, R.G., Soares, A.M., 2015. BbMP-1, a new metalloproteinase isolated from *Bothrops brazili* snake venom with in vitro antiparasitoid properties. *Toxicon* <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2015.09.005>.
- Kini, R.M., 2005. Serine proteases affecting blood coagulation and fibrinolysis from snake venoms. *Pathophysiol. Haemost. Thromb.* 34, 200–204. <http://dx.doi.org/10.1159/000092424>.
- Kroemer, R.T., Doughty, S.W., Robinson, A.J., Richards, W.G., 1996. Prediction of the three-dimensional structure of human interleukin-7 by homology modeling. *Protein Eng.* 9, 493–498. <http://dx.doi.org/10.1093/protein/9.6.493>.
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–685. <http://dx.doi.org/10.1038/227680a0>.
- Laskowski, R.A., MacArthur, M.W., Moss, D.S., Thornton, J.M., 1993. PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *J. Appl. Crystallogr.* <http://dx.doi.org/10.1107/S0021889892009944>.
- Markland, F.S., 1998a. Snake venom fibrinogenolytic and fibrinolytic enzymes: an updated inventory. *Registry of Exogenous Hemostatic Factors of the Scientific and Standardization Committee of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. Thromb. Haemost.* 79, 668–674.
- Markland, F.S., 1998b. Snake venoms and the hemostatic system. *Toxicon* [http://dx.doi.org/10.1016/S0041-0101\(98\)00126-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0041-0101(98)00126-3).
- Matsui, T., Fujimura, Y., Titani, K., 2000. Snake venom proteases affecting hemostasis and thrombolysis. *Biochim. Biophys. Acta Protein Struct. Mol. Enzymol.* [http://dx.doi.org/10.1016/S0167-4838\(99\)00268-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0167-4838(99)00268-X).
- Menaldo, D.L., Bernardes, C.P., Santos-Filho, N.A., Moura, L.D.A., Fuly, A.L., Arantes, E.C., Sampaio, S.V., 2012. Biochemical characterization and comparative analysis of two distinct serine proteases from *Bothrops pirajai* snake venom. *Biochimie* 94, 2545–2558. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biochi.2012.07.007>.
- Niewiarowski, S., Kirby, E.P., Brudzynski, T.M., Stocker, K., 1979. Thrombocytin, a serine protease from *Bothrops atrox* venom. 2. Interaction with platelets and plasma-clotting factors. *Biochemistry* 18, 3570–3577.
- Pirkle, H., Theodor, I., 1990. Thrombin-Like Venom Enzymes: Structure and Function. In: Liu, C., Chien, S. (Eds.), *Fibrinogen, Thrombolysis, Coagulation, and Fibrinolysis SE – 16, Advances in Experimental Medicine and Biology*. Springer, US, pp. 165–175 http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4615-3806-6_16.
- Ramachandran, G.N., Ramakrishnan, C., Sasisekharan, V., 1963. Stereochemistry of polypeptide chain configurations. *J. Mol. Biol.* 7, 95–99. [http://dx.doi.org/10.1016/S0022-2836\(63\)80023-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0022-2836(63)80023-6).
- Sali, A., Blundell, T.L., 1993. Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. *J. Mol. Biol.* 234, 779–815. <http://dx.doi.org/10.1006/jmbi.1993.1626>.
- Sant' Ana, C.D., Ticli, F.K., Oliveira, L.L., Giglio, J.R., Rechia, C.G.V., Fuly, A.L., Selistree de Araújo, H.S., Franco, J.J., Stábili, R.G., Soares, A.M., Sampaio, S.V., 2008. BjusSP-I: a new thrombin-like enzyme isolated from *Bothrops jararacussu* snake venom. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* 151, 443–454. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpa.2007.02.036>.
- Serrano, S.M.T., Maroun, R.C., 2005. Snake venom serine proteinases: sequence homology vs. substrate specificity, a paradox to be solved. *Toxicon* <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2005.02.020>.
- Six, D.A., Dennis, E.A., 2000. The expanding superfamily of phospholipase A₂ enzymes: classification and characterization. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Biol. Lipids* [http://dx.doi.org/10.1016/S1388-1981\(00\)00105-0](http://dx.doi.org/10.1016/S1388-1981(00)00105-0).
- Stocker, K., Barlow, G.H., 1976. The coagulant enzyme from *Bothrops atrox* venom (batroxobin). *Methods Enzymol.* 45, 214–223.
- Stocker, K., Fischer, H., Meier, J., 1982. Thrombin-like snake venom proteinases. *Toxicon* 20, 265–273. [http://dx.doi.org/10.1016/0041-0101\(82\)90225-2](http://dx.doi.org/10.1016/0041-0101(82)90225-2).
- Swenson, S., Markland, F.S., 2005. Snake venom fibrin(ogen)olytic enzymes. *Toxicon* <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2005.02.027>.
- Tang, S.S., Wang, X.H., Zhang, J.H., Tang, B.S., Qian, L., Li, P.Y., Luo, L.W., 2013. Biochemical properties and comparative pharmacology of a coagulant from *Deinagkistrodon acutus* snake venom. *Eur. J. Pharm. Sci.* 49, 90–98. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejps.2013.02.002>.
- Theakston, R.D.G., Kamiguti, A.S., 2002. A list of animal toxins and some other natural products with biological activity. *Toxicon* 40, 579–651.
- 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. <http://dx.doi.org/10.1093/nar/22.22.4673>.
- White, J., 2005. Snake venoms and coagulopathy. *Toxicon* <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2005.02.030>.
- Zelanis, A., de Souza Ventura, J., Chudzinski-Tavassi, A.M., Furtado, M. d F.D., 2007. Variability in expression of *Bothrops insularis* snake venom proteases: an ontogenetic

- approach. *Comp. Biochem. Physiol. C: Toxicol. Pharmacol.* 145, 601–609. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpc.2007.02.009>.
- Zeng, F., Shen, B., Zhu, Z., Zhang, P., Ji, Y., Niu, L., Li, X., Teng, M., 2013. Crystal structure and activating effect on RyRs of AhV-TL-I, a glycosylated thrombin-like enzyme from *Agkistrodon halys* snake venom. *Arch. Toxicol.* 87, 535–545. <http://dx.doi.org/10.1007/s00204-012-0957-5>.
- Zheng, Y., Ye, F.P., Wang, J., Liao, G.Y., Zhang, Y., Fan, Q.S., Lee, W.H., 2013. Purification, characterization and gene cloning of Da-36, a novel serine protease from *Deinagkistrodon acutus* venom. *Toxicon* 67, 1–11. <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2013.01.021>.

8 REFERÊNCIAS

- ÅGREN, M. S.; RASMUSSEN, K.; PAKKENBERG, B.; JØRGENSEN, B. Growth factor and proteinase profile of Vivostat® platelet-rich fibrin linked to tissue repair. **Vox Sanguinis**, v. 107, n. 1, p. 37–43, 2014.
- ALBUQUERQUE, U. P. de; HANAZAKI, N. **As pesquisas etnodirigidas na descoberta de novos fármacos de interesse médico e farmacêutico: fragilidades e perspectivas**Revista Brasileira de Farmacognosia, 2006. .
- ALIROL, E.; SHARMA, S. K.; BAWASKAR, H. S.; KUCH, U.; CHAPPUIS, F. **Snake bite in south asia: A review**PLoS Neglected Tropical Diseases, 2010. .
- ALTSCHUL, S. F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E. W.; LIPMAN, D. J. Basic local alignment search tool. **Journal of molecular biology**, v. 215, p. 403–410, 1990.
- ALVES, R. R. N.; ROSA, I. L. From cnidarians to mammals: The use of animals as remedies in fishing communities in NE Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 107, n. 2, p. 259–276, 2006.
- ANTUNES, A. L. S.; TRENTIN, D. S.; BONFANTI, J. W.; PINTO, C. C. F.; PEREZ, L. R. R.; MACEDO, A. J.; BARTH, A. L. Application of a feasible method for determination of biofilm antimicrobial susceptibility in staphylococci. **APMIS**, v. 118, n. 11, p. 873–877, 2010.
- ÁVILA-PIRES, T. C. S.; HOOGMOED, M. S.; VITT, L. J. Herpetofauna da Amazônia. In: **Herpetologia no Brasil II**. [s.l: s.n.]p. 13–43.
- BARREIRO, E. J.; BOLZANI, V. D. S. Biodiversidade: fonte potencial para a descoberta de fármacos. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 679–688, 2009.
- BARRETT, A. J.; RAWLINGS, N. D. **Evolutionary lines of cysteine peptidases**Biological Chemistry, 2001. .
- BARROS, L. C.; FERREIRA, R. S.; BARRAVIERA, S. R. C. S.; STOLF, H. O.; THOMAZINI-SANTOS, I. A.; MENDES-GIANNINI, M. J. S.; TOSCANO, E.; BARRAVIERA, B. A new fibrin sealant from *Crotalus durissus terrificus* venom: applications in medicine. **Journal of toxicology and environmental health. Part B, Critical reviews**, v. 12, n. 8, p. 553–571, 2009.
- BELBOUL, A.; DERNEVIK, L.; ALJASSIM, O.; SKRBIC, B.; RÅDBERG, G.; ROBERTS, D. The effect of autologous fibrin sealant (Vivostat®) on morbidity after pulmonary lobectomy: A prospective randomised, blinded study. **European Journal of Cardio-thoracic Surgery**, v. 26, n. 6, p. 1187–1191, 2004.
- BELL, W. R. Defibrinogenating enzymes. **Drugs**, v. 54 Suppl 3, p. 18–30; discussion 30–31, 1997.

BERENDSEN, H. J. C.; VAN DER SPOEL, D.; VANDRUNEN, R. GROMACS - a message - passing parallel molecular-dynamics implementation. **Comp Phys Comm**, v. 91, n. 1-3, p. 43–56, 1995.

BERNARDE, P. S.; DE ALBUQUERQUE, S.; BARROS, T. O.; TURCI, L. C. B. Snakes of Rondônia state, Brazil . **Serpentes do estado de Rondônia, Brasil**, v. 12, p. 155–182, 2012.

BERNARDES, C. P.; MENALDO, D. L.; CAMACHO, E.; ROSA, J. C.; ESCALANTE, T.; RUCAVADO, A.; LOMONTE, B.; GUTIÉRREZ, J. M.; SAMPAIO, S. V. Proteomic analysis of *Bothrops pirajai* snake venom and characterization of BpirMP, a new P-I metalloproteinase. **Journal of Proteomics**, v. 80, p. 250–267, 2013.

BÉRNILS, R. S.; COSTA, H. C. **Répteis brasileiros: Lista de espécies. Versão 2012.1**. Disponível em: <m <http://www.sbherpetologia.org.br/>>. Acesso em: 25 jun. 2015.

BLOM, N.; SICHERITZ-PONTÉN, T.; GUPTA, R.; GAMMELTOFT, S.; BRUNAK, S. **Prediction of post-translational glycosylation and phosphorylation of proteins from the amino acid sequence** *Proteomics*, 2004. .

BLOMBÄCK, B.; BARK, N. **Fibrinopeptides and fibrin gel structure** *Biophysical Chemistry*, 2004. .

BOCHNER, R.; STRUCHINER, C. J. Epidemiologia dos acidentes ofídicos nos últimos 100 anos no Brasil : uma revisão. **Cad. Saúde Pública**, v. 19, n. 1, p. 7–16, 2003.

BODE, W.; TURK, D.; KARSHIKOV, A. The refined 1.9-Å X-ray crystal structure of D-Phe-Pro-Arg chloromethylketone-inhibited human alpha-thrombin: structure analysis, overall structure, electrostatic properties, detailed active-site geometry, and structure-function relationships. **Protein science : a publication of the Protein Society**, v. 1, p. 426–471, 1992.

BÖHME, H.; SCHMIDT, P.; HÜTTEL, E. Defibrination with the snake venom enzyme arwin in peripheral arterial obstructive disease. Possibilities and limitations (author's transl). **MMW, Munchener medizinische Wochenschrift**, v. 120, n. 45, p. 1501–1504, 1978.

BRADSHAW, M. J.; SAVIOLA, A. J.; FESLER, E.; MACKESSY, S. P. Evaluation of Cytotoxic Activities of Snake Venoms toward Breast (MCF-7) and Skin Cancer (A-375) Cell Lines. **Cytotechnology**, nov. 2014.

BRASIL. **SinanWeb**. Disponível em: <<http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/tabnet/dh?sinannet/animaisp/bases/animaisbrnet.def>>. Acesso em: 10 ago. 2015.

BRAUD, S.; BON, C.; WISNER, A. **Snake venom proteins acting on hemostasis** *Biochimie*, 2000. .

- BROADBENT, A. **Defining neglected disease** *BioSocieties*, 2011. .
- BUCHTA, C.; HEDRICH, H. C.; MACHER, M.; HÖCKER, P.; REDL, H. Biochemical characterization of autologous fibrin sealants produced by CryoSeal® and Vivostat® in comparison to the homologous fibrin sealant product Tissucol/Tisseel®. **Biomaterials**, v. 26, n. 31, p. 6233–6241, 2005.
- BURIN, S. M.; AYRES, L. R.; NEVES, R. P.; AMBRÓSIO, L.; DE MORAIS, F. R.; DIAS-BARUFFI, M.; SAMPAIO, S. V.; PEREIRA-CROTT, L. S.; DE CASTRO, F. A. L-amino acid oxidase isolated from bothrops pirajai induces apoptosis in BCR-ABL-positive cells and potentiates imatinib mesylate effect. **Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology**, v. 113, p. 103–112, 2013.
- BUTCHART, S. H. M.; WALPOLE, M.; COLLEN, B.; VAN STRIEN, A.; SCHARLEMANN, J. P. W.; ALMOND, R. E. A.; BAILLIE, J. E. M.; BOMHARD, B.; BROWN, C.; BRUNO, J.; CARPENTER, K. E.; CARR, G. M.; CHANSON, J.; CHENERY, A. M.; CSIRKE, J.; DAVIDSON, N. C.; DENTENER, F.; FOSTER, M.; GALLI, A.; GALLOWAY, J. N.; GENOVESI, P.; GREGORY, R. D.; HOCKINGS, M.; KAPOV, V.; LAMARQUE, J.-F.; LEVERINGTON, F.; LOH, J.; MCGEOCH, M. A.; MCRAE, L.; MINASYAN, A.; HERNÁNDEZ MORCILLO, M.; OLDFIELD, T. E. E.; PAULY, D.; QUADER, S.; REVENGA, C.; SAUER, J. R.; SKOLNIK, B.; SPEAR, D.; STANWELL-SMITH, D.; STUART, S. N.; SYMES, A.; TIERNEY, M.; TYRRELL, T. D.; VIÉ, J.-C.; WATSON, R. Global biodiversity: indicators of recent declines. **Science (New York, N.Y.)**, v. 328, n. 5982, p. 1164–1168, 2010.
- CAI, X.; ZHU, Z.; ZHANG, M.; GUO, J.; WANG, H. [Effect of plasma fibrinogen level-based defibrase therapy in patients with acute cerebral infarction]. **Nan fang yi ke da xue xue bao = Journal of Southern Medical University**, v. 29, n. 10, p. 2124–2127, 2009.
- CALDERON, L. A.; SOBRINHO, J. C.; ZAQUEO, K. D.; DE MOURA, A. A.; GRABNER, A. N.; MAZZI, M. V.; MARCUSSI, S.; NOMIZO, A.; FERNANDES, C. F. C.; ZULIANI, J. P.; CARVALHO, B. M. A.; DA SILVA, S. L.; STÁBELI, R. G.; SOARES, A. M. Antitumoral activity of snake venom proteins: New trends in cancer therapy. **BioMed Research International**, 2014. .
- CALDERON, L. de A.; SILVA-JARDIM, I.; ZULIANI, J. P.; SILVA, A. de A. e; CIANCAGLINI, P.; SILVA, L. H. P. da; STÁBELI, R. G. Amazonian biodiversity: a view of drug development for leishmaniasis and malaria. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, 2009. .
- CALVETE, J. J.; JUÁREZ, P.; SANZ, L. Snake venomomics. Strategy and applications. In: *Journal of Mass Spectrometry*, 11, **Anais...**2007.
- CANDURI, F.; MANCUSO, L. C.; SOARES, A. M.; GIGLIO, J. R.; WARD, R. J.; ARNI, R. K. Crystallization of piratoxin I, A myotoxic LYS49-phospholipase A2 homologue isolated from the venom of *Bothrops pirajai*. **Toxicon**, v. 36, p. 547–551, 1998.

- CARDOSO, J. L. C.; FRANÇA, F. O. S.; WEN, F. H.; MÁLAQUE, C. M. S.; HADDAD JR., V. Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, 2003. .
- CARR, M. E.; GABRIEL, D. A.; MCDONAGH, J. Influence of Ca²⁺ on the structure of reptilase-derived and thrombin-derived fibrin gels. **The Biochemical journal**, v. 239, n. 3, p. 513–516, 1986.
- CASTRO, H. C.; SILVA, D. M.; CRAIK, C.; ZINGALI, R. B. Structural features of a snake venom thrombin-like enzyme: Thrombin and trypsin on a single catalytic platform? **Biochimica et Biophysica Acta - Protein Structure and Molecular Enzymology**, v. 1547, p. 183–195, 2001.
- CASTRO, H. C.; ZINGALI, R. B.; ALBUQUERQUE, M. G.; PUJOL-LUZ, M.; RODRIGUES, C. R. Snake venom thrombin-like enzymes: From reptilase to now. **Cellular and Molecular Life Sciences**, 2004. .
- CHAPIN, F. S.; ZAVALA, E. S.; EVINER, V. T.; NAYLOR, R. L.; VITOUSEK, P. M.; REYNOLDS, H. L.; HOOPER, D. U.; LAVOREL, S.; SALA, O. E.; HOBBIE, S. E.; MACK, M. C.; DÍAZ, S. Consequences of changing biodiversity. **Nature**, v. 405, n. 6783, p. 234–242, 2000.
- CHIPPAUX, J. P. **Snake-bites: Appraisal of the global situation** **Bulletin of the World Health Organization**, 1998. .
- CHIPPAUX, J. P. Estimate of the burden of snakebites in sub-Saharan Africa: A meta-analytic approach. **Toxicon**, v. 57, p. 586–599, 2011.
- CHIPPAUX, J. P. Epidemiology of snakebites in Europe: A systematic review of the literature. **Toxicon**, 2012. .
- CHIVIAN, E. **Biodiversity: Its Importance to Human Health** **Health (San Francisco)**. [s.l: s.n.].
- CHOTHIA, C.; LESK, A. M. The relation between the divergence of sequence and structure in proteins. **The EMBO journal**, v. 5, p. 823–826, 1986.
- CIPRANDI, A.; DE OLIVEIRA, S. K.; MASUDA, A.; HORN, F.; TERMIGNONI, C. *Boophilus microplus*: Its saliva contains microphilin, a small thrombin inhibitor. **Experimental Parasitology**, v. 114, n. 1, p. 40–46, 2006.
- CISCOTTO, P.; MACHADO DE AVILA, R. A.; COELHO, E. A. F.; OLIVEIRA, J.; DINIZ, C. G.; FARÍAS, L. M.; DE CARVALHO, M. A. R.; MARIA, W. S.; SANCHEZ, E. F.; BORGES, A.; CHÁVEZ-OLÓRTEGUI, C. Antigenic, microbicidal and antiparasitic properties of an l-amino acid oxidase isolated from *Bothrops jararaca* snake venom. **Toxicon**, v. 53, n. 3, p. 330–341, 2009.
- COHEN, J.; DIBNER, M. S.; WILSON, A. Development of and access to products for neglected diseases. **PLoS ONE**, v. 5, n. 5, 2010.

- COMINETTI, M. R.; TERRUGGI, C. H. B.; RAMOS, O. H. P.; FOX, J. W.; MARIANO-OLIVEIRA, A.; DE FREITAS, M. S.; FIGUEIREDO, C. C.; MORANDI, V.; SELISTRE-DE-ARAUJO, H. S. Alternagin-C, a disintegrin-like protein, induces vascular endothelial cell growth factor (VEGF) expression and endothelial cell proliferation in vitro. **The Journal of biological chemistry**, v. 279, p. 18247–18255, 2004.
- CORREA, J. M. C.; MARIA, D. A.; MOURA-DA-SILVA, A. M.; PIZZOCARO, K. F.; RUIZ, I. R. G. Inhibition of melanoma cells tumorigenicity by the snake venom toxin jararhagin. **Toxicon**, v. 40, n. 6, p. 739–748, 2002.
- COSTA, J. D. O.; FONSECA, K. C.; GARROTE-FILHO, M. S.; CUNHA, C. C.; DE FREITAS, M. V.; SILVA, H. S.; ARAÚJO, R. B.; PENHA-SILVA, N.; OLIVEIRA, F. De. Structural and functional comparison of proteolytic enzymes from plant latex and snake venoms. **Biochimie**, 2010. .
- COSTA, J. O.; PETRIC, C. B.; HAMAGUCHI, A.; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I.; OLIVEIRA, C. Z.; SOARES, A. M.; OLIVEIRA, F. Purification and functional characterization of two fibrinogenolytic enzymes from *Bothrops alternatus* venom. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases** scielo , , 2007. .
- COSTA, T. R.; MENALDO, D. L.; OLIVEIRA, C. Z.; SANTOS-FILHO, N. A.; TEIXEIRA, S. S.; NOMIZO, A.; FULY, A. L.; MONTEIRO, M. C.; DE SOUZA, B. M.; PALMA, M. S.; STÁBELI, R. G.; SAMPAIO, S. V.; SOARES, A. M. Myotoxic phospholipases A2 isolated from *Bothrops brazili* snake venom and synthetic peptides derived from their C-terminal region: Cytotoxic effect on microorganism and tumor cells. **Peptides**, v. 29, p. 1645–1656, 2008.
- COSTERTON, A. J. W.; STEWART, P. S.; GREENBERG, E. P. Bacterial Biofilms : Persistent Common Cause of Persistent Infection. **Science**, v. 284, n. 5418, p. 1318–1322, 2011.
- COSTERTON, J. W.; STEWART, P. S.; GREENBERG, E. P. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. **Science (New York, N.Y.)**, v. 284, n. 5418, p. 1318–1322, 1999.
- COURA, J. R.; DE CASTRO, S. L. A critical review on chagas disease chemotherapy. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, 2002. .
- COURA, J. R.; JUNQUEIRA, A. C. V; FERNANDES, O.; VALENTE, S. A. S.; MILES, M. A. Emerging Chagas disease in Amazonian Brazil. **Trends in Parasitology**, 2002. .
- CROFT, S. L.; SUNDAR, S.; FAIRLAMB, A. H. Drug resistance in leishmaniasis. **Clinical Microbiology Reviews**, 2006. .
- CYRANOSKI, D. Biodiversity: logging: the new conservation. **Nature**, 2007. .

DA SILVA, S. M.; RIBEIRO, V. M.; RIBEIRO, R. R.; TAFURI, W. L.; MELO, M. N.; MICHALICK, M. S. M. First report of vertical transmission of *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum* in a naturally infected bitch from Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 166, n. 1-2, p. 159–162, 2009.

DA SILVA TRENTIN, D.; GIORDANI, R. B.; MACEDO, A. J. Biofilmes bacterianos patogênicos: aspectos gerais, importância clínica e estratégias de combate1. **Revista Liberato**, v. 14, n. 22, p. 213–236, 2013.

DAHROUG, M. A. A.; ALMEIDA, A. B. P. F.; SOUSA, V. R. F.; DUTRA, V.; TURBINO, N. C. M. R.; NAKAZATO, L.; DE SOUZA, R. L. *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi* in captive wild felids in Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 104, n. 1, p. 73–74, 2010.

DASCOMBE, W. H.; DUMANIAN, G.; HONG, C.; HEIL, B. V.; LABADIE, K.; HESSEL, B.; BLOMBACK, B.; JOHNSON, P. C. Application of Thrombin Based Fibrin Glue and Non-Thrombin Based Batroxobin Glue on Intact Human Blood Vessels: Evidence for Transmural Thrombin Activity. **Thrombosis and haemostasis**, v. 78, n. 2, p. 947–951, ago. 1997.

DE ANDRADE MOURA, L.; MARQUI DE ALMEIDA, A. C.; DOMINGOS, T. F. S.; ORTIZ-RAMIREZ, F.; CAVALCANTI, D. N.; TEIXEIRA, V. L.; FULY, A. L. Antiplatelet and anticoagulant effects of diterpenes isolated from the marine alga, *Dictyota menstrualis*. **Marine drugs**, v. 12, n. 5, p. 2471–84, 2014.

DE AZEVEDO, W. F.; WARD, R. J.; CANDURI, F.; SOARES, A.; GIGLIO, J. R.; ARNI, R. K. Crystal structure of piratoxin-I: A calcium-independent, myotoxic phospholipase A2-homologue from *Bothrops pirajai* venom. **Toxicon**, v. 36, p. 1395–1406, 1998.

DE AZEVEDO-MARQUES, M. M.; CUPO, P.; HERING, S. E. Acidentes por animais peçonhentos: Serpentes peçonhentas. In: Medicina, **Anais...**2003.

DE MARCO ALMEIDA, F.; DE CASTRO PIMENTA, A. M.; OLIVEIRA, M. C.; DE LIMA, M. E. Venoms, Toxins and Derivatives from the Brazilian Fauna: Valuable Sources for Drug Discovery. **Sheng li xue bao : [Acta physiologica Sinica]**, v. 67, n. 3, p. 261–270, jun. 2015.

DEOLINDO, P.; TEIXEIRA-FERREIRA, A. S.; MELO, E. J. T.; ARNHOLDT, A. C. V.; DE SOUZA, W.; ALVES, E. W.; DAMATTA, R. A. Programmed cell death in *Trypanosoma cruzi* induced by *Bothrops jararaca* venom. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, n. 1, p. 33–38, 2005.

DIAS, J. C. P. Notas sobre o *Trypanosoma cruzi* e suas características bio-ecológicas, como agente de enfermidades transmitidas por alimentos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 2006. .

DIAS, J. C. P. Elimination of chagas disease transmission: Perspectives. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. SUPPL. 1, p. 41–45, 2009.

- DIAS, J. C. P.; SILVEIRA, a C.; SCHOFIELD, C. J. The impact of Chagas disease control in Latin America: a review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 5, p. 603–12, 2002.
- DIAS, L. C.; DESSOY, M. A.; SILVA, J. J. N.; THIEMANN, O. H.; OLIVA, G.; ANDRICOPULO, A. D. CHEMOTHERAPY OF CHAGAS' DISEASE: STATE OF THE ART AND PERSPECTIVES FOR THE DEVELOPMENT OF NEW DRUGS. **Quimica Nova**, v. 32, n. 9, p. 2444–2457, 2009a.
- DIAS, L.; DESSOY, M.; SILVA, J.; THIEMANN, O.; OLIVA, G.; ANDRICOPULO, A. Quimioterapia da doença de Chagas: estado da arte e perspectivas no desenvolvimento de novos fármacos. **Quim. Nova**, v. 32, n. 9, p. 2444–2457, 2009b.
- DISEASE, C.; TRYPANOSOMIASIS, H. A. Research priorities for Chagas disease, human African trypanosomiasis and leishmaniasis. **World Health Organization technical report series**, n. 975, p. v–xii, 1–100, 2012.
- DOLEY, R.; KINI, R. M. Protein complexes in snake venom. **Cellular and molecular life sciences : CMLS**, v. 66, n. 17, p. 2851–2871, 2009.
- DONLAN, R. M.; COSTERTON, J. W. **Biofilms: Survival mechanisms of clinically relevant microorganisms** *Clinical Microbiology Reviews*, 2002. .
- DOOLITTLE, W. F. Bacterial evolution. **Canadian journal of microbiology**, v. 34, n. 4, p. 547–551, 1988.
- DOS SANTOS, J. I.; CARDOSO, F. F.; SOARES, A. M.; DAL PAI SILVA, M.; GALLACCI, M.; FONTES, M. R. M. Structural and functional studies of a bothropic myotoxin complexed to rosmarinic acid: new insights into Lys49-PLA₂ inhibition. **PloS one**, v. 6, p. e28521, 2011.
- DOS SANTOS, J. I.; SANTOS-FILHO, N. A.; SOARES, A. M.; FONTES, M. R. M. Crystallization and preliminary X-ray crystallographic studies of a Lys49-phospholipase A₂ homologue from *Bothrops pirajai* venom complexed with rosmarinic acid. **Acta Crystallographica Section F: Structural Biology and Crystallization Communications**, v. 66, p. 699–701, 2010.
- DRAKE, D. B.; WONG, L. G. Hemostatic effect of Vivostat patient-derived fibrin sealant on split-thickness skin graft donor sites. **Annals of plastic surgery**. [s.l: s.n.].
- DUFTON, M. J. Could domain movements be involved in the mechanism of trypsin-like serine proteases? **FEBS Letters**, 1990. .
- EDMAN, P. Method for determination of the amino acid sequence in peptides. **Acta Chemica Scandinavica**, v. 4, p. 283–293, 1950.
- FEASEY, N.; WANSBROUGH-JONES, M.; MABEY, D. C. W.; SOLOMON, A. W. Neglected tropical diseases. **British Medical Bulletin**, 2010. .

FENARD, D.; LAMBEAU, G.; VALENTIN, E.; LEFEBVRE, J. C.; LAZDUNSKI, M.; DOGLIO, A. Secreted phospholipases A2, a new class of HIV inhibitors that block virus entry into host cells. **Journal of Clinical Investigation**, v. 104, p. 611–618, 1999.

FERNANDES, C. A. H.; COMPARETTI, E. J.; BORGES, R. J.; HUANCAHUIRE-VEGA, S.; PONCE-SOTO, L. A.; MARANGONI, S.; SOARES, A. M.; FONTES, M. R. M. Structural bases for a complete myotoxic mechanism: Crystal structures of two non-catalytic phospholipases A2-like from *Bothrops brazili* venom. **Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics**, v. 1834, p. 2772–2781, 2013.

FERNANDEZ-GOMEZ, R.; ZERROUK, H.; SEBTI, F.; LOYENS, M.; BENSLIMANE, A.; ALI OUAISSI, M. Growth inhibition of *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania donovani infantum* by different snake venoms: Preliminary identification of proteins from *Cerastes cerastes* venom which interact with the parasites. **Toxicon**, v. 32, n. 8, p. 875–882, 1994.

FOX, J. W. A brief review of the scientific history of several lesser-known snake venom proteins: L-amino acid oxidases, hyaluronidases and phosphodiesterases. **Toxicon**, 2013.

FRANCO, R. F. Fisiologia da coagulação, anticoagulação e fibrinólise. In: Medicina, 3-4, **Anais...**2001.

FRY, B. G.; CASEWELL, N. R.; W??STER, W.; VIDAL, N.; YOUNG, B.; JACKSON, T. N. W. The structural and functional diversification of the Toxicofera reptile venom system. **Toxicon**, v. 60, p. 434–448, 2012.

GOMES, A.; BHATTACHARJEE, P.; MISHRA, R.; BISWAS, A. K.; DASGUPTA, S. C.; GIRI, B.; DEBNATH, A.; GUPTA, S. Das; DAS, T.; GOMES, A. Anticancer potential of animal venoms and toxins. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 48, n. 2, p. 93–103, 2010.

GONÇALVES, A. R.; SOARES, M. J.; DE SOUZA, W.; DAMATTA, R. A.; ALVES, E. W. Ultrastructural alterations and growth inhibition of *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania major* induced by *Bothrops jararaca* venom. **Parasitology Research**, v. 88, n. 7, p. 598–602, 2002.

GUEDES, H. L. M.; SILVA, F. P.; NETTO, C. C.; DE SALLES, C. M. C.; ALEXANDRE, G.; OLIVEIRA, C. L. P.; TORRIANI, Í.; DE SIMONE, S. G. Structural characterization and low-resolution model of BJ-48, a thrombin-like enzyme from *Bothrops jararacussu* venom. **Biophysical Chemistry**, v. 132, p. 159–164, 2008.

GUERX, N.; PEITSCH, M. C. SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: An environment for comparative protein modeling. **Electrophoresis**, v. 18, p. 2714–2723, 1997.

GUTIÉRREZ, J. Comprendiendo los venenos de serpientes: 50 años de investigaciones en América Latina. **Revista de biología tropical**, v. 50, p. 377–394, 2002.

GUTIÉRREZ, J. M.; THEAKSTON, R. D. G.; WARRELL, D. A. Confronting the neglected problem of snake bite envenoming: The need for a global partnership. **PLoS Medicine**, 2006. .

GUTIÉRREZ, J. M.; WILLIAMS, D.; FAN, H. W.; WARRELL, D. a. Snakebite envenoming from a global perspective: Towards an integrated approach. **Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology**, v. 56, n. 7, p. 1223–35, dez. 2010.

HALL-STOODLEY, L.; COSTERTON, J. W.; STOODLEY, P. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. **Nature reviews. Microbiology**, v. 2, n. 2, p. 95–108, 2004.

HALL-STOODLEY, L.; STOODLEY, P. Biofilm formation and dispersal and the transmission of human pathogens. **Trends in Microbiology**, 2005. .

HARRISON, R. a; HARGREAVES, A.; WAGSTAFF, S. C.; FARAGHER, B.; LALLOO, D. G. Snake envenoming: a disease of poverty. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 3, n. 12, p. e569, jan. 2009.

HART, C.; SPANNAGL, M. [Coagulation disorders in the intensive care station]. **Der Internist**, v. 55, n. 5, p. 521–8, 2014.

HAVT, A.; TOYAMA, M. H.; DO NASCIMENTO, N. R. F.; TOYAMA, D. O.; NOBRE, A. C. L.; MARTINS, A. M. C.; BARBOSA, P. S. F.; NOVELLO, J. C.; BOSCHERO, A. C.; CARNEIRO, E. M.; FONTELES, M. C.; MONTEIRO, H. S. A. A new C-type animal lectin isolated from *Bothrops pirajai* is responsible for the snake venom major effects in the isolated kidney. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 37, p. 130–141, 2005.

[CSL STYLE ERROR: reference with no printed form.]

HERPETOLOGIA, S. B. De; GOMES, F.; ANDRADE, D.; ÁVILA-PIRES, T. C. Herpetologia Brasileira. **Revista Herpetologia Brasileira**, v. 2, p. 24, 2013.

HESS, H.; KEIL-KURI, E.; MARSHALL, M. **Clinical experience with Arwin (author's transl)MMW, Munchener medizinische Wochenschrift**. [s.l: s.n.].

HIFUMI, T.; SAKAI, A.; KONDO, Y.; YAMAMOTO, A.; MORINE, N.; ATO, M.; SHIBAYAMA, K.; UMEZAWA, K.; KIRIU, N.; KATO, H.; KOIDO, Y.; INOUE, J.; KAWAKITA, K.; KURODA, Y. Venomous Snake Bites: Clinical Diagnosis and Treatment. **Journal of intensive care**, v. 3, n. 1, p. 16, 2015.

HODGSON, W. C.; ISBISTER, G. K. The application of toxins and venoms to cardiovascular drug discovery. **Current Opinion in Pharmacology**, 2009. .

HOLM, L.; SANDER, C. Protein structure comparison by alignment of distance matrices. **Journal of molecular biology**, v. 233, p. 123–138, 1993.

HUANG, D. X.; GAI, L. Y.; WANG, S. R.; LI, T. D.; YANG, T. S.; GUANG, Z.; DU, L. S.; LI, L. H. Defibrase, a purified fibrinolytic protease from snake venom in acute myocardial infarction. **Acta Cardiologica**, v. 47, n. 5, p. 445–458, 1992.

HUNG, C.; CHIOU, S. Fibrinogenolytic proteases isolated from the snake venom of Taiwan Habu: serine proteases with kallikrein-like and angiotensin-degrading activities. **Biochemical and biophysical research ...**, 2001. Disponível em: <<http://www.witathens.org/wp-content/uploads/2011/12/WIT-scs-Solutions.pdf>>. Acesso em: 30 jul. 2014.

IZIDORO, L. F. M.; RIBEIRO, M. C.; SOUZA, G. R. L.; SANT&APOS;ANA, C. D.; HAMAGUCHI, A.; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I.; GOULART, L. R.; BELEBONI, R. O.; NOMIZO, A.; SAMPAIO, S. V.; SOARES, A. M.; RODRIGUES, V. M. Biochemical and functional characterization of an l-amino acid oxidase isolated from *Bothrops pirajai* snake venom. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 14, p. 7034–7043, 2006.

JACKSON, K. The evolution of venom-delivery systems in snakes. **Zoological Journal of the Linnean Society**, v. 137, n. 3, p. 337–354, 2003.

JACKSON, M. R. Fibrin sealants in surgical practice: An overview. **American journal of surgery**, v. 182, n. 2 Suppl, p. 1S–7S, 2001.

JAIN, D.; KUMAR, S. Snake venom: A potent anticancer agentAsian Pacific. **Journal of Cancer Prevention**, 2012. .

JANMEY, P. A.; WINER, J. P.; WEISEL, J. W. Fibrin gels and their clinical and bioengineering applications. **Journal of the Royal Society, Interface / the Royal Society**, v. 6, n. 30, p. 1–10, 2009.

JEPSON, P.; CANNEY, S. Biodiversity hotspots: Hot for what? **Global Ecology and Biogeography**, v. 10, n. 3, p. 225–227, 2001.

KASTURIRATNE, A.; WICKREMASINGHE, A. R.; DE SILVA, N.; GUNAWARDENA, N. K.; PATHMESWARAN, A.; PREMARATNA, R.; SAVIOLI, L.; LALLOO, D. G.; DE SILVA, H. J. **The global burden of snakebite: A literature analysis and modelling based on regional estimates of envenoming and deaths**PLoS Medicine, 2008. .

KAYANO, A. M.; SIMÕES-SILVA, R.; MEDEIROS, P. S. M.; MALTAROLLO, V. G.; HONORIO, K. M.; OLIVEIRA, E.; ALBERICIO, F.; DA SILVA, S. L.; AGUIAR, A. C. C.; KRETTLI, A. U.; FERNANDES, C. F. C.; ZULIANI, J. P.; CALDERON, L. A.; STÁBELI, R. G.; SOARES, A. M. BbMP-1, a new metalloproteinase isolated from *Bothrops brazili* snake venom with in vitro antiplasmodial properties. **Toxicon**, 2015. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0041010115300647>>.

KINI, R. M. Serine proteases affecting blood coagulation and fibrinolysis from snake venoms. **Pathophysiology of haemostasis and thrombosis**, v. 34, n. 4-5, p. 200–4, jan.

2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16707928>>. Acesso em: 23 maio. 2014.
- KINI, R. M. Anticoagulant proteins from snake venoms: structure, function and mechanism. **The Biochemical journal**, v. 397, n. 3, p. 377–387, 2006.
- KJAERGARD, H. K.; TRUMBULL, H. R. **Vivostat system autologous fibrin sealant: preliminary study in elective coronary bypass grafting.** **The Annals of thoracic surgery**. [s.l.: s.n.].
- KJAERGARD, H. K.; TRUMBULL, H. R. Vivostat system autologous fibrin sealant: preliminary study in elective coronary bypass grafting. **Annals of Thoracic Surgery**, v. 66, n. 2, p. 482–486, 1998b.
- KOH, C. Y.; KINI, R. M. From snake venom toxins to therapeutics--cardiovascular examples. **Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology**, v. 59, n. 4, p. 497–506, 2012.
- KOH, D. C. I.; ARMUGAM, A.; JEYASEELAN, K. Snake venom components and their applications in biomedicine. **Cellular and Molecular Life Sciences**, 2006. .
- KOH, Y. S.; CHUNG, K. H.; KIM, D. S. Biochemical characterization of a thrombin-like enzyme and a fibrinolytic serine protease from snake (*Agkistrodon saxatilis*) venom. **Toxicon**, v. 39, p. 555–560, 2001.
- KROEMER, R. T.; DOUGHTY, S. W.; ROBINSON, A. J.; RICHARDS, W. G. Prediction of the three-dimensional structure of human interleukin-7 by homology modeling. **Protein engineering**, v. 9, p. 493–498, 1996.
- KUBISZ, P.; SURANOVA, J. Reptilase clot retraction test. (Its cofactors and relation to other platelet functions). **Pathologie-biologie**, v. 23, n. 4, p. 269–275, 1975.
- L??BO DE ARAÚJO, A.; DONATO, J. L.; BON, C. Purification from *Bothrops lanceolatus* (Fer de Lance) venom of a fibrino(geno)lytic enzyme with esterolytic activity. **Toxicon**, v. 36, p. 745–758, 1998.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680–685, 1970.
- LASKOWSKI, R. A.; MACARTHUR, M. W.; MOSS, D. S.; THORNTON, J. M. PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. **Journal of Applied Crystallography**, 1993. .
- LEE, W. H.; GONCALEZ, M. C.; RAMALHEIRA, R. M. F.; KUSER, P. R.; TOYAMA, M. H.; OLIVEIRA, B.; GIGLIO, J. R.; MARANGONI, S.; POLIKARPOV, I. Crystallization and preliminary X-ray diffraction studies of piratoxin II, a phospholipase A2 isolated from the venom of *Bothrops pirajai*. **Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography**, v. 54, p. 1437–1439, 1998.

- LEITÃO, D. P. S.; POLIZELLO, A. C. M.; ROTHSCILD, Z. Coagulation and fibrinolysis in capybara (*Hydrochaeris hydrochaeris*), a close relative of the guinea-pig (*Cavia porcellus*). **Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology**, v. 125, n. 1, p. 113–120, 2000.
- LESK, A. M.; FORDHAM, W. D. Conservation and variability in the structures of serine proteinases of the chymotrypsin family. **Journal of molecular biology**, v. 258, p. 501–537, 1996.
- LI, T. D.; GAI, L. Y.; WANG, S. R. **Coronary thrombolysis with defibrase Zhonghua nei ke za zhi [Chinese journal of internal medicine]**. [s.l: s.n.].
- LINDAHL, E.; HESS, B.; VAN DER SPOEL, D. GROMACS 3.0: A package for molecular simulation and trajectory analysis. **Journal of Molecular Modeling**, 2001.
- LIU, S.; SUN, M. Z.; SUN, C.; ZHAO, B.; GREENAWAY, F. T.; ZHENG, Q. A novel serine protease from the snake venom of *Agkistrodon blomhoffii ussurensis*. **Toxicon**, v. 52, p. 760–768, 2008.
- LOVELL, S. C.; DAVIS, I. W.; ARENDALL, W. B.; DE BAKKER, P. I. W.; WORD, J. M.; PRISANT, M. G.; RICHARDSON, J. S.; RICHARDSON, D. C. Structure validation by *Calpha geometry*: phi,psi and Cbeta deviation. **Proteins**, v. 50, n. 3, p. 437–450, 2003.
- MACGILLIVRAY, T. E. Fibrin Sealants and Glues. In: Journal of Cardiac Surgery, 6, **Anais...**2003.
- MACHADO, A. B. M. Lista da fauna brasileira ameaçada de extinção: incluindo as espécies quase ameaçadas e deficientes em dados. [s.l: s.n.]
- MAGALHÃES, A.; MAGALHÃES, H. P. B.; RICHARDSON, M.; GONTIJO, S.; FERREIRA, R. N.; ALMEIDA, A. P.; SANCHEZ, E. F. Purification and properties of a coagulant thrombin-like enzyme from the venom of *Bothrops leucurus*. **Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology**, v. 146, p. 565–575, 2007.
- MAGNANI, C.; DIAS, J. C. P.; GONTIJO, E. D. Como as ações de saúde pensam o homem e como o homem as repensa: uma análise antropológica do controle da doença de Chagas. **Cadernos de Saúde Pública**, 2009. .
- MAN, C. C.; FERREIRA, E. I.; SANTOS, J. L.; GIAROLLA, J.; RANDO, D. G.; ALMEIDA, A. E.; BOSQUESI, P. L.; MENEGON, R. F.; BLAU, L. **Prodrugs for the treatment of neglected diseasesMolecules**, 2008. .
- MANCUSO, L. C.; CORREA, M. M.; VIEIRA, C. A.; CUNHA, O. A. B.; LACHAT, J. J.; DEARAUJO, H. S. S.; OWNBY, C. L.; GIGLIO, J. R. Fractionation of *Bothrops pirajai* Snake-Venom - Isolation and Characterization of Piratoxin-I, a New Myotoxic Protein. **Toxicon**, v. 33, p. 615–626, 1995a.

- MANCUSO, L. C.; CORREA, M. M.; VIEIRA, C. A.; CUNHA, O. A.; LACHAT, J. J.; DE ARAUJO, H. S.; OWNBY, C. L.; GIGLIO, J. R. Fractionation of *Bothrops pirajai* snake venom: isolation and characterization of piratoxin-I, a new myotoxic protein. **Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology**, v. 33, p. 615–626, 1995b.
- MARIN-NETO, J. A.; CUNHA-NETO, E.; MACIEL, B. C.; SIMÕES, M. V. **Pathogenesis of chronic Chagas heart disease** *Circulation*, 2007. .
- MARKLAND, F. S. **Snake venoms and the hemostatic system** *Toxicon*, 1998. .
- MARRAKCHI, N.; BARBOUCHE, R.; GUERMAZI, S.; KAROUI, H.; BON, C.; EL AYE, M. Cerastotin, a serine protease from *Cerastes cerastes* venom, with platelet-aggregating and agglutinating properties. **European journal of biochemistry / FEBS**, v. 247, p. 121–128, 1997.
- MATSUI, T.; FUJIMURA, Y.; TITANI, K. Snake venom proteases affecting hemostasis and thrombosis. **Biochimica et Biophysica Acta - Protein Structure and Molecular Enzymology**, 2000. .
- MAYA, J. D.; ORELLANA, M.; FERREIRA, J.; KEMMERLING, U.; LÓPEZ-MUÑOZ, R.; MORELLO, A. Chagas disease: Present status of pathogenic mechanisms and chemotherapy. **Biological Research**, v. 43, n. 3, p. 323–331, 2010.
- MENALDO, D. L.; BERNARDES, C. P.; PEREIRA, J. C.; SILVEIRA, D. S. C.; MAMEDE, C. C. N.; STANZIOLA, L.; OLIVEIRA, F. De; PEREIRA-CROTT, L. S.; FACCIOLO, L. H.; SAMPAIO, S. V. Effects of two serine proteases from *Bothrops pirajai* snake venom on the complement system and the inflammatory response. **International Immunopharmacology**, v. 15, p. 764–771, 2013.
- MENALDO, D. L.; BERNARDES, C. P.; SANTOS-FILHO, N. A.; MOURA, L. D. A.; FULY, A. L.; ARANTES, E. C.; SAMPAIO, S. V. Biochemical characterization and comparative analysis of two distinct serine proteases from *Bothrops pirajai* snake venom. **Biochimie**, v. 94, p. 2545–2558, 2012.
- MERKEL, P.; BECK, A.; MUHAMMAD, K.; ALI, S. A.; SCHNITZLER, C.; VOELTER, W.; DUSZENKO, M. Spermine isolated and identified as the major trypanocidal compound from the snake venom of *Eristocophis macmahoni* causes autophagy in *Trypanosoma brucei*. **Toxicon**, v. 50, p. 457–469, 2007.
- MIRÓ, G.; CARDOSO, L.; PENNISI, M. G.; OLIVA, G.; BANETH, G. Canine leishmaniasis - new concepts and insights on an expanding zoonosis: part two. **Trends in Parasitology**, 2008. .
- MONZOTE, L. Current treatment of leishmaniasis: a review. **Open Antimicrobial Agents J**, v. 1, p. 9–19, 2009.
- MOSESSON, M. W. Fibrinogen and fibrin structure and functions. In: Journal of Thrombosis and Haemostasis, 8, **Anais...**2005.

- MULLER, V. D. M.; RUSSO, R. R.; OLIVEIRA CINTRA, A. C.; SARTIM, M. A.; DE MELO ALVES-PAIVA, R.; FIGUEIREDO, L. T. M.; SAMPAIO, S. V.; AQUINO, V. H. Crotoxin and phospholipases A 2 from *Crotalus durissus terrificus* showed antiviral activity against dengue and yellow fever viruses. **Toxicon**, v. 59, p. 507–515, 2012.
- MUNIZ, E. G.; MARIA, W. S.; ESTEVÃO-COSTA, M. I.; BUHRNHEIM, P.; CHÁVEZ-OLÓRTEGUI, C. Neutralizing potency of horse antithrombotic Brazilian antivenom against *Bothrops* snake venoms from the Amazonian rain forest. **Toxicon**, 2000. .
- MUSK, D. J.; BANKO, D. A.; HERGENROTHER, P. J. Iron salts perturb biofilm formation and disrupt existing biofilms of *Pseudomonas aeruginosa*. **Chemistry and Biology**, v. 12, n. 7, p. 789–796, 2005.
- MYERS, N.; MYERS, N.; MITTERMEIER, R. A.; MITTERMEIER, R. A.; FONSECA, G. A. B.; FONSECA, G. A. B.; KENT, J.; KENT, J. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, v. 403, n. 6772, p. 853–8, 2000.
- NELSEN, D. R.; NISANI, Z.; COOPER, A. M.; FOX, G. A.; GREN, E. C. K.; CORBIT, A. G.; HAYES, W. K. Poisons, toxins, and venoms: Redefining and classifying toxic biological secretions and the organisms that employ them. **Biological Reviews**, 2013.
- NEUGEBAUER, G. Improvement of flow properties using Arwin in acute experimental infarct. **Zeitschrift für Kardiologie**, v. 65, n. 11, p. 1010–1021, 1976.
- NIEMIAROWSKI, S.; KIRBY, E. P.; BRUDZYNSKI, T. M.; STOCKER, K. Thrombocytin, a Serine Protease from *Bothrops atrox* Venom. 2. Interaction with Platelets and Plasma-Clotting Factors. **Biochemistry**, v. 18, n. 16, p. 3570–3577, ago. 1979.
- NOWACK, B.; FEDERAL, S. Critical Review Environmental Chemistry of Aminopolycarboxylate Chelating Agents. **Environmental Science & Technology**, v. 36, n. 19, p. 4009–4016, 2002.
- O'TOOLE, G.; KAPLAN, H. B.; KOLTER, R. Biofilm formation as microbial development. **Annual review of microbiology**, v. 54, p. 49–79, 2000.
- OLIVEIRA-CARVALHO, A. L.; GUIMARÃES, P. R.; ABREU, P. A.; DUTRA, D. L. S.; JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO, I. L. M.; RODRIGUES, C. R.; HO, P. L.; CASTRO, H. C.; ZINGALI, R. B. Identification and characterization of a new member of snake venom thrombin inhibitors from *Bothrops insularis* using a proteomic approach. **Toxicon**, v. 51, p. 659–671, 2008.
- ORGANIZATION, W. H.; LEISHMANIASSES, C. Control of the leishmaniasis: report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis, Geneva, 22-26 March 2010. **World Health Organization technical report series**, p. xii, 2010.
- OTTO, M. Staphylococcus epidermidis--the “accidental” pathogen. **Nature reviews. Microbiology**, v. 7, n. 8, p. 555–567, 2009.

- P. SAMY, R.; G. STILES, B.; GOPALAKRISHNAKONE, P.; T.K. CHOW, V. Antimicrobial Proteins from Snake Venoms: Direct Bacterial Damage and Activation of Innate Immunity Against *Staphylococcus aureus* Skin Infection. **Current Medicinal Chemistry**, 2011. .
- PAL, S. K.; GOMES, A.; DASGUPTA, S. C.; GOMES, A. Snake venom as therapeutic agents: From toxin to drug development. **Indian Journal of Experimental Biology**, 2002. .
- PASSERO, L. F. D.; TOMOKANE, T. Y.; CORBETT, C. E. P.; LAURENTI, M. D.; TOYAMA, M. H. Comparative studies of the anti-leishmanial activity of three *Crotalus durissus* ssp. venoms. **Parasitology Research**, v. 101, p. 1365–1371, 2007.
- PÉREZ, A. V.; RUCAVADO, A.; SANZ, L.; CALVETE, J. J.; GUTIÉRREZ, J. M. Isolation and characterization of a serine proteinase with thrombin-like activity from the venom of the snake *Bothrops asper*. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 41, p. 12–17, 2008.
- PIGOTT, D. M.; BHATT, S.; GOLDING, N.; DUDA, K. A.; BATTLE, K. E.; BRADY, O. J.; MESSINA, J. P.; BALARD, Y.; BASTIEN, P.; PRATLONG, F.; BROWNSTEIN, J. S.; FREIFELD, C. C.; MEKARU, S. R.; GETHING, P. W.; GEORGE, D. B.; MYERS, M. F.; REITHINGER, R.; HAY, S. I. Global distribution maps of the Leishmaniasis. **eLife**, v. 2014, n. 3, 2014.
- PIRKLE, H. Thrombin-like Enzymes from Snake Venoms: An Updated Inventory On Behalf of the Scientific and Standardization Committee's Registry of Exogenous Hemostatic Factors. **Thrombosis and Haemostasis**, v. 79, n. 3, p. 675–683, 1998. Disponível em: <<http://www.schattauer.de/t3page/1214.html?manuscript=4464&L=1>>.
- PIZZATTO, L.; ALMEIDA-SANTOS, S. M. De; MARQUES, AUGUSTO, O. Herpetologia no Brasil II Biologia reprodutiva de serpentes brasileiras Herpetologia no Brasil. In: **HERPETOLOGIA NO BRASIL**. [s.l: s.n.]p. 201–221.
- PONCE-SOTO, L. A.; BONFIM, V. L.; NOVELLO, J. C.; NAVARRO OVIEDO, R.; YARLEQUÉ CHOCAS, A.; MARANGONI, S. Isolation and characterization of a serine protease, Ba III-4, from Peruvian *Bothrops atrox* venom. **Protein Journal**, v. 26, p. 387–394, 2007.
- PRADNIWAT, P.; ROJNUCKARIN, P. Snake venom thrombin-like enzymes. **Toxin Reviews**, p. 1–7, 2013.
- PRASAD, S.; KASHYAP, R. S.; DEOPUJARI, J. Y.; PUROHIT, H. J.; TAORI, G. M.; DAGINAWALA, H. F. Development of an in vitro model to study clot lysis activity of thrombolytic drugs. **Thrombosis journal**, v. 4, p. 14, 2006.
- RAHME, L. G.; STEVENS, E. J.; WOLFORTH, S. F.; SHAO, J.; TOMPKINS, R. G.; AUSUBEL, F. M. Common virulence factors for bacterial pathogenicity in plants and animals. **Science (New York, N.Y.)**, v. 268, n. 5219, p. 1899–1902, 1995.

- RAMACHANDRAN, G. N.; RAMAKRISHNAN, C.; SASISEKHARAN, V. Stereochemistry of polypeptide chain configurations. **Journal of molecular biology**, v. 7, p. 95–99, 1963.
- RAMOS, O. H. P.; SELISTRE-DE-ARAUJO, H. S. Snake venom metalloproteases - Structure and function of catalytic and disintegrin domains. **Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology**, 2006. .
- RANGWALA, H.; KARYPIS, G. fRMSDPred: Predicting local RMSD between structural fragments using sequence information. **Proteins: Structure, Function and Genetics**, v. 72, n. 3, p. 1005–1018, 2008.
- RASSI, A.; MARCONDES DE REZENDE, J. American trypanosomiasis (Chagas disease). **Infectious disease clinics of North America**, v. 26, n. 2, p. 275–91, 2012.
- RASSI, A.; MARIN-NETO, J. A. Chagas disease. **Lancet**, v. 375, n. 9723, p. 1388–402, 2010.
- RASSI JR, A.; RASSI, A.; MARIN-NETO, J. A. Chagas disease. **Lancet**, v. 375, n. 9723, p. 1388–402, 2010.
- READY, P. D. **Epidemiology of visceral leishmaniasis** **Clinical Epidemiology**, 2014. .
- REEKS, T. A.; FRY, B. G.; ALEWOOD, P. F. Privileged Frameworks from Snake Venom. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 72, n. 10, p. 1939–1958, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s00018-015-1844-z>>.
- RIGDEN, D. J.; HWA, L. W.; MARANGONI, S.; TOYAMA, M. H.; POLIKARPOV, I. The structure of the D49 phospholipase A2 piratoxin III from *Bothrops pirajai* reveals unprecedented structural displacement of the calcium-binding loop: Possible relationship to cooperative substrate binding. **Acta Crystallographica - Section D Biological Crystallography**, v. 59, p. 255–262, 2003.
- RODRIGUES, V. M.; SOARES, A. M.; GUERRA-SÁ, R.; RODRIGUES, V.; FONTES, M. R.; GIGLIO, J. R. Structural and functional characterization of newwiedase, a nonhemorrhagic fibrin(ogen)olytic metalloprotease from *Bothrops newwiedi* snake venom. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 381, p. 213–224, 2000.
- ROSENTHAL, V. D.; BIJIE, H.; MAKI, D. G.; MEHTA, Y.; APISARNTHANARAK, A.; MEDEIROS, E. A.; LEBLEBICIOGLU, H.; FISHER, D.; ÁLVAREZ-MORENO, C.; KHADER, I. A.; DEL ROCÍO GONZÁLEZ MARTÍNEZ, M.; CUELLAR, L. E.; NAVOA-NG, J. A.; ABOUQAL, R.; GUANCHE GARCELL, H.; MITREV, Z.; PIREZ GARCÍA, M. C.; HAMDI, A.; DUEÑAS, L.; CANCEL, E.; GURSKIS, V.; RASSLAN, O.; AHMED, A.; KANJ, S. S.; UGALDE, O. C.; MAPP, T.; RAKA, L.; YUET MENG, C.; THU, L. T. A.; GHAZAL, S.; GIKAS, A.; NARVÁEZ, L. P.; MEJÍA, N.; HADJIEVA, N.; GAMAR ELANBYA, M. O.; GUZMÁN SIRITT, M. E.; JAYATILLEKE, K. International Nosocomial Infection Control Consortium (INICC) report, data summary of 36 countries, for 2004-2009. **American Journal of Infection Control**, v. 40, n. 5, p. 396–407, 2012.

REFERÊNCIAS

- ROSENTHAL, V. D.; MAKI, D. G.; JAMULITRAT, S.; MEDEIROS, E. A.; TODI, S. K.; GOMEZ, D. Y.; LEBLEBICIOGLU, H.; ABU KHADER, I.; MIRANDA NOVALES, M. G.; BERBA, R.; RAMÍREZ WONG, F. M.; BARKAT, A.; PINO, O. R.; DUEÑAS, L.; MITREV, Z.; BIJE, H.; GURSKIS, V.; KANJ, S. S.; MAPP, T.; HIDALGO, R. F.; BEN JABALLAH, N.; RAKA, L.; GIKAS, A.; AHMED, A.; THU, L. T. A.; GUZMÁN SIRITT, M. E. International Nosocomial Infection Control Consortium (INICC) report, data summary for 2003-2008, issued June 2009. **American Journal of Infection Control**, v. 38, n. 2, 2010.
- ROSENTHAL, V. D.; MAKI, D. G.; MEHTA, A.; ÁLVAREZ-MORENO, C.; LEBLEBICIOGLU, H.; HIGUERA, F.; CUELLAR, L. E.; MADANI, N.; MITREV, Z.; DUEÑAS, L.; NAVOA-NG, J. A.; GARCELL, H. G.; RAKA, L.; HIDALGO, R. F.; MEDEIROS, E. A.; KANJ, S. S.; ABUBAKAR, S.; NERCELLES, P.; PRATESI, R. D. International Nosocomial Infection Control Consortium report, data summary for 2002-2007, issued January 2008. **American Journal of Infection Control**, v. 36, n. 9, p. 627–637, 2008.
- SAJEVIC, T.; LEONARDI, A.; KRIPPAJ, I. **Haemostatically active proteins in snake venoms**Toxicon, 2011. .
- SALI, A.; BLUNDELL, T. L. Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. **Journal of molecular biology**, v. 234, p. 779–815, 1993.
- SAMY, R. P.; GOPALAKRISHNAKONE, P.; STILES, B. G.; GIRISH, K. S.; SWAMY, S. N.; HEMSHEKHAR, M.; TAN, K. S.; ROWAN, E. G.; SETHI, G.; CHOW, V. T. K. Snake venom phospholipases A(2): a novel tool against bacterial diseases. **Current medicinal chemistry**, v. 19, n. 36, p. 6150–62, 2012.
- SAMY, R. P.; GOPALAKRISHNAKONE, P.; THWIN, M. M.; CHOW, T. K. V; BOW, H.; YAP, E. H.; THONG, T. W. J. Antibacterial activity of snake, scorpion and bee venoms: A comparison with purified venom phospholipase A2 enzymes. **Journal of Applied Microbiology**, v. 102, n. 3, p. 650–659, 2007.
- SANT’ANA, C. D.; TICLI, F. K.; OLIVEIRA, L. L.; GIGLIO, J. R.; RECHIA, C. G. V; FULY, A. L.; SELISTRE DE ARAÚJO, H. S.; FRANCO, J. J.; STABELI, R. G.; SOARES, A. M.; SAMPAIO, S. V. BjussuSP-I: A new thrombin-like enzyme isolated from *Bothrops jararacussu* snake venom. **Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology**, v. 151, p. 443–454, 2008.
- SANTOS FILHO, O. A.; BICCA DE ALENCASTRO, R. Modelagem de proteínas por homologia. **Química Nova**, v. 26, p. 253–259, 2003.
- SARIDOMICHELAKIS, M. N.; KOUTINAS, A. F. Cutaneous involvement in canine leishmaniosis due to *Leishmania infantum* (syn. *L. chagasi*). **Veterinary Dermatology**, v. 25, n. 2, 2014.
- SCHÄGGER, H. Tricine-SDS-PAGE. **Nature protocols**, v. 1, n. 1, p. 16–22, 2006.
- SCHIPS, L.; DALPIAZ, O.; CESTARI, A.; LIPSKY, K.; GIDARO, S.; ZIGEUNER, R.; PETRITSCH, P. Autologous Fibrin Glue Using the Vivostat System for Hemostasis

in Laparoscopic Partial Nephrectomy. **European Urology**, v. 50, n. 4, p. 801–805, 2006.

SELISTRE, H. S.; GIGLIO, J. R. Isolation and characterization of a thrombin-like enzyme from the venom of the snake *Bothrops insularis* (jararaca ilhoa). **Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology**, v. 25, p. 1135–1144, 1987.

SERRANO, S. M. T. The long road of research on snake venom serine proteinases. **Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology**, v. 62, p. 19–26, fev. 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23010164>>.

SERRANO, S. M. T.; MAROUN, R. C. Snake venom serine proteinases: Sequence homology vs. substrate specificity, a paradox to be solved. **Toxicon**, 2005. .

SHARMA, A.; RADHA KISHAN, K. V. Serine protease inhibitor mediated peptide bond re-synthesis in diverse protein molecules. **FEBS Letters**, v. 585, n. 21, p. 3465–3470, 2011.

SILVA, F. P.; DE-SIMONE, S. G. S1 subsite in snake venom thrombin-like enzymes: Can S1 subsite lipophilicity be used to sort binding affinities of trypsin-like enzymes to small-molecule inhibitors? **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 12, p. 2571–2587, 2004.

SIPPL, M. J. Recognition of errors in three-dimensional structures of proteins. **Proteins: Structure, Function and Genetics**, v. 17, p. 355–362, 1993.

SMITH, J. B.; CUSUMANO, J. C.; BABBS, C. F. Quantitative effects of iron chelators on hydroxyl radical production by the superoxide-driven fenton reaction. **Free radical research communications**, v. 8, n. 2, p. 101–106, 1990.

SNOEK-VAN BEURDEN, P. A. M.; VON DEN HOFF, J. W. Zymographic techniques for the analysis of matrix metalloproteinases and their inhibitors. **BioTechniques**, 2005. .

SOARES, A. M.; ANDRIÃO-ESCARSO, S. H.; BORTOLETO, R. K.; RODRIGUES-SIMIONI, L.; ARNI, R. K.; WARD, R. J.; GUTIÉRREZ, J. M.; GIGLIO, J. R. Dissociation of enzymatic and pharmacological properties of piratoxins-I and -III, two myotoxic phospholipases A2 from *Bothrops pirajai* snake venom. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 387, p. 188–196, 2001.

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

SOARES, C. S. A.; DUARTE, S. C.; SOUSA, S. R. What Do We Know about Feline Leishmaniosis? **Journal of feline medicine and surgery**, jun. 2015.

- SÖDING, J.; BIEGERT, A.; LUPAS, A. N. The HHpred interactive server for protein homology detection and structure prediction. **Nucleic Acids Research**, v. 33, 2005.
- SOLOMON, S.; HORAN, T.; ANDRUS, M.; EDWARDS, J.; EMORI, G.; FRIDKIN, S.; PEAVY, G.; TOLSON, J.; UPADHYAYULA, S.; YI, B. National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) System report, data summary from January 1992 to June 2002, issued August 2002. **American Journal of Infection Control**, v. 30, n. 8, p. 458–475, 2002.
- STÁBELI, R. G.; AMUI, S. F.; SANT’ANA, C. D.; PIRES, M. G.; NOMIZO, A.; MONTEIRO, M. C.; ROMÃO, P. R. T.; GUERRA-SÁ, R.; VIEIRA, C. A.; GIGLIO, J. R.; FONTES, M. R. M.; SOARES, A. M. *Bothrops moojeni* myotoxin-II, a Lys49-phospholipase A2 homologue: An example of function versatility of snake venom proteins. **Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology**, v. 142, p. 371–381, 2006.
- STÁBELI, R.; SIMOES-SILVA, R.; M., A.; S., G.; A., A.; S. CALDEIRA, C. A.; COUTINHO-NETO, A.; D., K.; P., J.; A., L.; M., A. Purification of Phospholipases A2 from American Snake Venoms. In: **Chromatography - The Most Versatile Method of Chemical Analysis**. [s.l.] InTech, 2012.
- STEPANOVIĆ, S.; VUKOVIĆ, D.; HOLA, V.; DI BONAVENTURA, G.; DJUKIĆ, S.; ĆIRKOVIĆ, I.; RUZICKA, F. Quantification of biofilm in microtiter plates: Overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. **APMIS**, v. 115, n. 8, p. 891–899, 2007.
- STOCKER, K.; BARLOW, G. H. The Coagulant Enzyme from *Bothrops Atrox* Venom (batroxobin). **Methods in enzymology**, v. 45, p. 214–223, 1976.
- STOCKER, K.; FISCHER, H.; MEIER, J. Thrombin-like snake venom proteinases. **Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology**, v. 20, p. 265–273, 1982.
- STULBERG, D. L.; PENROD, M. A.; BLATNY, R. A. Common bacterial skin infections. **American Family Physician**, v. 66, n. 1, p. 119–124, 2002.
- STUTESMAN, D. Snake. **Toxins**, v. 2, n. 9, p. 2606–21, 2010.
- SUDARSHAN, S.; DHANANJAYA, B. L. Antibacterial Potential of a Basic Phospholipase A2 (VRV-PL-V) of *Daboia Russellii Pulchella* (Russell’s Viper) Venom. **Biochemistry. Biokhimiia**, v. 79, n. 11, p. 1237–1244, nov. 2014.
- SWENSON, S.; MARKLAND, F. S. Snake venom fibrin(ogen)olytic enzymes **Toxicon**, 2005. .
- TAN, G.; GYLLENHAAL, C.; SOEJARTO, D. D. Biodiversity as a source of anticancer drugs. **Current drug targets**, v. 7, n. 3, p. 265–277, 2006.

TAN, N. H. Isolation and characterization of the thrombin-like enzyme from *Cryptelytrops purpureomaculatus* venom. **Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology**, v. 151, p. 131–136, 2010.

TEIXEIRA, S. S.; SILVEIRA, L. B.; DA SILVA, F. M. N.; MARCHI-SALVADOR, D. P.; SILVA, F. P.; IZIDORO, L. F. M.; FULY, A. L.; JULIANO, M. A.; DOS SANTOS, C. R.; MURAKAMI, M. T.; SAMPAIO, S. V.; DA SILVA, S. L.; SOARES, A. M. Molecular characterization of an acidic phospholipase A 2 from *Bothrops pirajai* snake venom: Synthetic C-terminal peptide identifies its antiplatelet region. **Archives of Toxicology**, v. 85, p. 1219–1233, 2011.

TEMPONE, A. G.; ANDRADE, H. F.; SPENCER, P. J.; LOURENÇO, C. O.; ROGERO, J. R.; NASCIMENTO, N. *Bothrops moojeni* venom kills *Leishmania* spp. with hydrogen peroxide generated by its L-amino acid oxidase. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 280, p. 620–624, 2001.

THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G.; GIBSON, T. J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic acids research**, v. 22, p. 4673–4680, 1994.

TORRES, A.; DANTAS, R.; MENEZES, R.; TOYAMA, M.; FILHO, E.; OLIVEIRA, M.; NOGUEIRA, N.; OLIVEIRA, M.; MONTEIRO, H.; MARTINS, A. Antimicrobial activity of an L-amino acid oxidase isolated from *Bothrops leucurus* snake venom. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, 2010. .

TOYAMA, M. H.; COSTA, P. D.; NOVELLO, J. C.; DE OLIVEIRA, B.; GIGLIO, J. R.; DA CRUZ-HÖFLING, M. A.; MARANGONI, S. Purification and amino acid sequence of MP-III 4R D49 phospholipase A2 from *Bothrops pirajai* snake venom, a toxin with moderate PLA2 and anticoagulant activities and high myotoxic activity. **Journal of Protein Chemistry**, v. 18, p. 371–378, 1999.

TOYAMA, M. H.; SOARES, A. M.; WEN-HWA, L.; POLIKARPOV, I.; GIGLIO, J. R.; MARANGONI, S. Amino acid sequence of piratoxin-II, a myotoxic Lys49 phospholipase A2 homologue from *Bothrops pirajai* venom. **Biochimie**, v. 82, p. 245–250, 2000.

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

TRENTIN, D. D. S.; GIORDANI, R. B.; ZIMMER, K. R.; DA SILVA, A. G.; DA SILVA, M. V.; CORREIA, M. T. D. S.; BAUMVOL, I. J. R.; MACEDO, A. J. Potential of medicinal plants from the Brazilian semi-arid region (Caatinga) against *Staphylococcus epidermidis* planktonic and biofilm lifestyles. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 137, n. 1, p. 327–335, 2011.

UETZ, P.; HOŠEK, J. **The Reptile Database**.

- VACHEETHASANEE, K.; TEMENOFF, J. S.; HIGASHI, J. M.; GARY, A.; ANDERSON, J. M.; BAYSTON, R.; MARCHANT, R. E. Bacterial surface properties of clinically isolated *Staphylococcus epidermidis* strains determine adhesion on polyethylene. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 42, n. 3, p. 425–432, 1998.
- VAN DER SPOEL, D.; LINDAHL, E.; HESS, B.; GROENHOF, G.; MARK, A. E.; BERENDSEN, H. J. C. **GROMACS: Fast, flexible, and free** *Journal of Computational Chemistry*, 2005. .
- VAN DER VAART, R.; DROSSAERT, C. H. C.; TAAL, E.; TEN KLOOSTER, P. M.; HILDERINK-KOERTSHUIS, R. T. E.; KLAASE, J. M.; VAN DE LAAR, M. a F. J.; SYKES, S.; WILLS, J.; ROWLANDS, G.; POPPLE, K.; SØRENSEN, K. et al; ROTHMAN, R. L.; YIN, H. S.; MULVANEY, S.; CO, J. P. T.; HOMER, C.; LANNON, C.; NUTBEAM, D.; MENDES, E. V.; MARTINS, S.; II, P.; CSDH; LEE, S.-Y. D.; AROZULLAH, A. M.; CHO, Y. I.; JORDAN, J. E.; OSBORNE, R. H.; BUCHBINDER, R.; HEINRICH, C.; FREEDMAN, D. a; BESS, K. D.; TUCKER, H. a; BOYD, D. L.; TUCHMAN, A. M.; WALLSTON, K. a; COLEMAN, C.; CHINN, D.; MCCARTHY, C.; CHEW, L. D.; BRADLEY, K. a; BOYKO, E. J.; CAVACO, A.; BRASIL; BAKER, D. W.; MORRIS, N. S.; MACLEAN, C. D.; LITTENBERG, B.; BARRETO, M. L.; TEIXEIRA, M. G.; BASTOS, F. I.; XIMENES, R. a a; BARATA, R. B.; RODRIGUES, L. C. Doenças negligenciadas : estratégias do Ministério da Saúde Neglected diseases : the strategies of. **BMC public health**, v. 36, n. 8, p. 515, 2012.
- VAN GUNSTEREN, F. W.; BILLETER, S. R.; EISING, A. A.; HÜNENBERGER, P. H.; KRÜGER, P.; MARK, A. E.; SCOTT, W. R. P.; TIRONI, I. G. **Biomolecular simulation: the gromos96 manual and user guide**. [s.l: s.n.]
- VEGA, C.; ROLÓN, M.; MARTÍNEZ-FERNÁNDEZ, A. R.; ESCARIO, J. A.; GÓMEZ-BARRIO, A. A new pharmacological screening assay with Trypanosoma cruzi epimastigotes expressing β -galactosidase. **Parasitology Research**, v. 95, p. 296–298, 2005.
- VELADA, J. L.; HOLLINGSBEE, D. A.; MENZIES, A. R.; CORNWELL, R.; DODD, R. A. Reproducibility of the mechanical properties of Vivostat?? system patient-derived fibrin sealant. **Biomaterials**, v. 23, n. 10, p. 2249–2254, 2002.
- VIEIRA, D. F.; WATANABE, L.; SANT’ANA, C. D.; MARCUSSI, S.; SAMPAIO, S. V; SOARES, A. M.; ARNI, R. K. Purification and characterization of jararassin-I, A thrombin-like enzyme from *Bothrops jararaca* snake venom. **Acta biochimica et biophysica Sinica**, v. 36, p. 798–802, 2004.
- VILCA-QUISPE, A.; PONCE-SOTO, L. A.; WINCK, F. V.; MARANGONI, S. Isolation and characterization of a new serine protease with thrombin-like activity (TLBm) from the venom of the snake *Bothrops marajoensis*. **Toxicon**, v. 55, p. 745–753, 2010.
- VINHAES, M. C.; DIAS, J. C. P. **Doença de Chagas no Brasil** *Cadernos de Saúde Pública*, 2000. .

- VONK, F. J.; JACKSON, K.; DOLEY, R.; MADARAS, F.; MIRTSCHEIN, P. J.; VIDAL, N. Snake venom: From fieldwork to the clinic: Recent insights into snake biology, together with new technology allowing high-throughput screening of venom, bring new hope for drug discovery. **BioEssays**, 2011. .
- VUONG, C.; OTTO, M. *Staphylococcus epidermidis* infections. **Microbes and Infection**, 2002. .
- WARRELL, D. A. Bites of venomous snakes. **The New England journal of medicine**, 2002. .
- WARRELL, D. A. Snake bite. **Lancet**, v. 375, n. 9708, p. 77–88, jan. 2010.
- WEINSTEIN, S. A. Snake venoms: A brief treatise on etymology, origins of terminology, and definitions. **Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology**, v. 103, p. 188–195, 10 jul. 2015. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0041010115300155>>. Acesso em: 29 jul. 2015.
- WEN-HWA, L.; TOYAMA, M. H.; SOARES, A. M.; GIGLIO, J. R.; MARANGONI, S.; POLIKARPOV, I. Crystallization and preliminary X-ray diffraction studies of piratoxin III, a D-49 phospholipase A2 from the venom of *Bothrops pirajai*. **Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography**, v. 55, p. 1229–1230, 1999.
- WHITE, J. **Snake venoms and coagulopathy** *Toxicon*, 2005. .
- WHO, W. H. O. Sustaining the drive to overcome the global impact of neglected tropical diseases. **Second WHO report on neglected tropical diseases**, v. 3.9, p. 67–71, 2013.
- WIEDERSTEIN, M.; SIPPL, M. J. ProSA-web: Interactive web service for the recognition of errors in three-dimensional structures of proteins. **Nucleic Acids Research**, v. 35, 2007.
- WILLIAMS, D.; GUTIÉRREZ, J. M.; HARRISON, R.; WARRELL, D. A.; WHITE, J.; WINKEL, K. D.; GOPALAKRISHNAKONE, P. The Global Snake Bite Initiative: an antidote for snake bite. **The Lancet**, v. 375, p. 89–91, 2010.
- WOLBERG, A. S. Thrombin generation and fibrin clot structure. **Blood Reviews**, v. 21, n. 3, p. 131–142, 2007.
- WOLBERG, A. S.; CAMPBELL, R. A. Thrombin generation, fibrin clot formation and hemostasis. **Transfusion and Apheresis Science**, v. 38, n. 1, p. 15–23, 2008.
- WOLF, G. K. Arwin® in peripheral arterial circulatory disorders: Controlled multicentre trials. **European Journal of Clinical Pharmacology**, v. 9, n. 5-6, p. 387–392, 1976.

World Health Organization. Disponível em:

<<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs337/en/#.VbjycDVF67s.mendeley>>.

Acesso em: 29 jul. 2015.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Control of the leishmaniasis. **World Health Organization technical report series**, n. 949, 2010.

WORLD HEALTH ORGANIZATION; WHO, W. H. O. World Health Statistics 2012. In: **World Health Statistics 2012**. [s.l: s.n.]27p. 171.

WU, G.; HUANG, F. P. Effects of venom defibrase on brain edema after intracerebral hemorrhage in rats. In: *Acta Neurochirurgica, Supplementum*, 95, **Anais...**2005.

WU, J. F.; WANG, S. H. Therapeutic effect of defibrase in chronic glomerulonephritis with chronic renal failure. **Zhonghua nei ke za zhi [Chinese journal of internal medicine]**, v. 28, n. 3, p. 171–173, 188, 1989.

WU, J.; JIN, Y.; ZHONG, S.; CHEN, R.; ZHU, S.; WANG, W.; LU, Q.; XIONG, Y. A unique group of inactive serine protease homologues from snake venom. **Toxicon**, v. 52, p. 277–284, 2008.

YAMAZAKI, Y.; MORITA, T. **Structure and function of snake venom cysteine-rich secretory proteins****Toxicon**, 2004. .

ZAQUEO, K. D.; KAYANO, A. M.; SIMÕES-SILVA, R.; MOREIRA-DILL, L. S.; FERNANDES, C. F. C.; FULY, A. L.; MALTAROLLO, V. G.; HON??RIO, K. M.; DA SILVA, S. L.; ACOSTA, G.; CABALLOL, M. A. O.; DE OLIVEIRA, E.; ALBERICIO, F.; CALDERON, L. A.; SOARES, A. M.; STÁBELI, R. G. Isolation and biochemical characterization of a new thrombin-like serine protease from *Bothrops pirajai* snake venom. **BioMed Research International**, v. 2014, 2014.

ZELANIS, A.; HUESGEN, P. F.; OLIVEIRA, A. K.; TASHIMA, A. K.; SERRANO, S. M. T.; OVERALL, C. M. Snake venom serine proteinases specificity mapping by proteomic identification of cleavage sites. **Journal of Proteomics**, v. 113, p. 260–267, 15 jan. 2015. Disponível em:

<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1874391914004655>>.

ZENG, F.; SHEN, B.; ZHU, Z.; ZHANG, P.; JI, Y.; NIU, L.; LI, X.; TENG, M. Crystal structure and activating effect on RyRs of AhV-TL-I, a glycosylated thrombin-like enzyme from *Agkistrodon halys* snake venom. **Archives of Toxicology**, v. 87, p. 535–545, 2013.

ZHENG, Y.; YE, F. P.; WANG, J.; LIAO, G. Y.; ZHANG, Y.; FAN, Q. S.; LEE, W. H. Purification, characterization and gene cloning of Da-36, a novel serine protease from *Deinagkistrodon acutus* venom. **Toxicon**, v. 67, p. 1–11, 2013.

ZHU, Z.; LIANG, Z.; ZHANG, T.; ZHU, Z.; XU, W.; TENG, M.; NIU, L. Crystal structures and amidolytic activities of two glycosylated snake venom serine proteinases. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, p. 10524–10529, 2005.

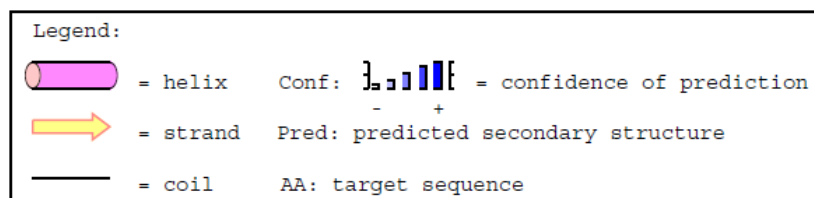
ZIELER, H.; KEISTER, D. B.; DVORAK, J. A.; RIBEIRO, J. M. A snake venom phospholipase A(2) blocks malaria parasite development in the mosquito midgut by inhibiting ookinete association with the midgut surface. **The Journal of experimental biology**, v. 204, n. Pt 23, p. 4157–4167, 2001.

ZULIANI, J. P.; KAYANO, A. M.; ZAQUEO, K. D.; NETO, A. C.; SAMPAIO, S. V.; SOARES, A. M.; STABELI, R. G. Snake venom L-amino acid oxidases: some consideration about their functional characterization. **Protein and peptide letters**, v. 16, n. 8, p. 908–912, 2009.

APÊNDICES

APÊNDICE 1

Fragmentos	Monoisótopos m/z (Da)
VIGGNECDINEHR	756.84729
FLVALYGK	455.7738
SHGYFCGLTLINQEWVLTAHCDR	712.83868
NFQMQLGVHSK	435.55118
SVANDDEVIR	559.27924
FLCPNGK	418.2104
NDDALDKDLMLVR	511.92477
LNRPVSNSEHIAPLSLPSSPPSVGSVcYVMGWGK	906.46228
ETYPDVPHCAK	658.80084
INILDHAVcR	605.82306
AAYPELPAEYR	640.31946
TLCAGVLQGGIDTCK	796.89240
LCNGQFQGILLSWGSK	863.9153
VCAQPR	365.6873
KPALYLK	416.76868
VSDYTERFK	572.7803
SIIAGNTAAACPP	621.81256



ANEXOS

ANEXO 1

Termo De Consentimento Livre e Esclarecido

Titulo da pesquisa:

Avaliação dos venenos animais sobre a hemostasia

Prezado (a) Senhor (a) pedimos que por gentileza leia atentamente o seguinte documento.

Gostaríamos de convidá-lo (a) a participar como voluntário da pesquisa “**Avaliação dos venenos animais sobre a hemostasia**”, realizada no “**CENTRO DE ESTUDOS DE BIOMOLÉCULAS APLICADAS À SAÚDE**” localizado no campus da Universidade Federal de Rondônia BR 364, Km 9,5 em Porto Velho (RO). O objetivo da pesquisa é a análise dos efeitos provocados pelos venenos animais (serpente, vespa, aranha e anuros) sobre o sangue humano. **Caso aceite ser voluntário sua participação contará com a doação de 10 mL de sangue que será realizada através de punção venosa periférica. A sua doação é voluntária, não haverá nenhuma forma de pagamento por parte dos pesquisadores, tão pouco pelo doador voluntário.** Informamos que, de acordo com a Resolução 196/96 a referida pesquisa enquadra-se em Risco Mínimo, pois, constará da extração de sangue por punção venosa em adultos em bom estado de saúde, com frequência máxima de duas vezes por semana, não excedendo o volume máximo de 160 ml em dois meses. No momento da coleta de sangue poderá ocorrer algum desconforto ou mesmo dor, no local onde a agulha for inserida. Acidentes ou complicações durante o procedimento são incomuns. Informamos ainda, que se houver pequeno extravasamento de sangue no local de retirada, possivelmente ocorrerá pequeno edema que desaparecerá em poucos dias.

A sua participação neste estudo poderá não lhe trazer benefício algum. No entanto, com base nos resultados obtidos, espera-se que, em longo prazo, possamos conhecer mais sobre os sintomas provocados após o envenenamento e assim contribuir com o conhecimento científico. Os resultados obtidos poderão ser divulgados em revistas científicas nacionais e internacionais ou mesmo em congressos científicos, porém garantimos a confidencialidade absoluta dos doadores. O sangue coletado será mantido no CENTRO DE ESTUDOS DE BIOMOLÉCULAS APLICADAS À SAÚDE.

Na ocorrência de novas perguntas ou dúvidas sobre o estudo após a coleta de sangue, você poderá entrar em contato com os pesquisadores Kayena Delaix Zaqueo (fones: (69) 9249-6615 ou (69) 8154-2495) e Anderson Makoto Kayano (fone: (69) 8406-7204).

No caso de aceitar fazer parte do estudo, assine ao final deste documento, que está em duas vias. Uma delas é sua e a outra é do pesquisador responsável.

Ao assinar este documento, estará concordando que leu todas as informações pertinentes ao procedimento de doação de sangue e teve suas dúvidas esclarecidas com o pesquisador responsável. Declaramos que está absolutamente livre para recusar-se a participar deste estudo e poderá desistir do consentimento a qualquer momento, inclusive durante o próprio procedimento. Em caso de recusa você não será penalizado (a) de forma alguma.

Assim sendo,

Eu, _____,
sob CPF nº _____, manifesto meu livre consentimento em participar da pesquisa doando voluntariamente 10 mL de sangue, estando totalmente ciente dos procedimentos que serão realizados, objetivos da pesquisa e divulgação dos resultados.

Participante da pesquisa

Profissionais habilitados a fazerem a punção venosa periférica:

Anderson Makoto Kayano CRF313

Fone: (69) 8406-7204

Antônio Coutinho CRF/RO 561

Fone: (69) 9227-7338

Pesquisador responsável: Kayena Delaix Zaqueo

CRBio 73792/06D

Fone: (69)8154-2495

Porto Velho, _____ de _____ de 20____.

ANEXO 2**Publicações De Trabalhos Científicos em Revistas
Indexadas durante o doutoramento**

Dentre os resultados obtidos, durante o período de doutorado, destacam-se:

(i) Artigos publicados, relacionados diretamente à tese:

- **ZAQUEO, K. D.**; KAYANO, A. M.; SIMÕES-SILVA, R.; MOREIRA-DILL, L. S.; FERNANDES, C. F. C.; FULY, A. L.; MALTAROLLO, V. G.; HONÓRIO, K. M.; DA SILVA, S. L.; ACOSTA, G.; CABALLLO, M. A. O.; DE OLIVEIRA, E. ALBERICIO, F.; CALDERON, L. A.; SOARES, A. M.; STÁBELI, R. G. Isolation and Biochemical Characterization of a New Thrombin-Like Serine Protease from *Bothrops pirajai* Snake Venom. **BioMed Research International**, v. 2014, p. 1-13, 2014.
- **ZAQUEO, K. D.**; KAYANO, A. M.; DOMINGOS, T. F. S.; MOURA, L. A.; FULY, A. L.; DA SILVA, S. L.; ACOSTA, G.; OLIVEIRA, E.; ALBERICIO, F.; ZANCHI, F. B.; ZULIANI, J. P.; CALDERON, L. A.; STÁBELI, R. G.; SOARES, A. M. BbrzSP-32 the first serine protease isolated from *Bothrops brazili* venom: Purification and characterization. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 195, p. 15–25, 2016.

(ii) Artigos ou capítulo de livro publicados e/ou submetidos, relacionados à áreas de interesse em biotecnología, toxinologia e biodiversidade

- RORIZ, K. R. S.; SETUBAL, S. S.; KATSURAGAWA, T. H.; DA SILVA, R. R.; FERNANDES, C. F. C.; **ZAQUEO, K. D.**; CALDERON, L. A.; SOARES, A. M.; STÁBELI, R. G.; ZULIANI, J. P. Epidemiology of snakebites in Northern Amazonia: a study of patients at the center of tropical medicine of Rondonia (CEMETRON). Submitted, 2016.
- DELAIX-ZAQUEO, K.; SERRANO, R. O. P.; **ZAQUEO, K. D.**; HUNGRIA, D. B.; STÁBELI, R. G.; ZULIANI, J. P.; SOARES, A. M. e CALDERON, L. A. Amphibia, Anura, Microhylidae, Gastrophryninae, *Elachistocleis Bicolor* Guérin Méneville, 1838: **Distribution Extension and Geographic Distribution Map**. Volume 13 Issue 5, 2013.
- S ETÚBAL, S. S.; PONTES, A. S.; NÉRY, N.M.; BASTOS, J. S. F.; CASTRO, B.C.; PIRES, W. L.; **ZAQUEO, K.D.**; CALDERON, L.A.; STÁBELI, R.G.; SOARES, A. M.; ZULIANI, J. P. Effect of *Bothrops bilineata* snake venom on neutrophil function. **Toxicon**, v. 76, p. 143-149, 2013.

- FURTADO, J. L.; OLIVEIRA, G. A.; PONTES, A. S.; SETÚBAL, S. S.; XAVIER, C. V.; LACOUTH-SILVA, F.; LIMA, B. F.; **ZAQUEO, K. D.**; KAYANO, A. M.; CALDERON, L. A.; STÁBELI, R. G.; SOARES, A. M.; ZULIANI, J. P. Activation of J77A.1 macrophages by three phospholipases A₂ isolated from *Bothrops atrox* snake venom. **BioMed Research International**, v. 2014, p. 1-13, 2014.
- CALDERON, L. A.; SOBRINHO, J. C.; **ZAQUEO, K. D.**; DE MOURA, A. A.; GRABNER, A. N.; MAZZI, M. V.; MARCUSSI, S.; NOMIZO, A.; FERNANDES, C. F. C.; ZULIANI, J. P.; CARVALHO, B. M. A.; DA SILVA, S. L.; STÁBELI, R. G.; SOARES, A. M. Antitumoral activity of snake venom proteins: New trends in cancer therapy. **BioMed Research International**, v. 2014, p. 1-20, 2014.
- COUTINHO-NETO, A.; CALDEIRA, C. A. S.; SOUZA, G. H. M. F.; **ZAQUEO, K. D.**; KAYANO, A. M.; SILVA, R. S.; ZULIANI, J. P.; SOARES, A. M.; STÁBELI, R. G.; CALDERON, L. A. ESI-MS/MS identification of a bradykinin-potentiating peptide from Amazon *Bothrops atrox* Snake Venom using a hybrid Qq-TOF mass spectrometer. **Toxins**, v. 5, p. 327–335. 2013.
- SOUZA, C. A. T.; SETÚBAL, S. S.; KAYANO, A. M.; PONTES, A. S.; FURTADO, J. L.; KWASNIEWSKI, F.H.; **ZAQUEO, K. D.**; SOARES, A. M.; STÁBELI, R. G.; ZULIANI, J. P. Local and systemic biochemical alterations induced by *Bothrops atrox* snake venom in mice. **Journal of Venom Research**, v. 3, p. 28-32, 2012.
- STÁBELI, R. G.; KAYANO, A. M.; NETO, A.C.; MOURA, A. A.; GIMENEZ, G. S.; **ZAQUEO, K. D.**; SILVA, R. S.; CALDEIRA, C. A. S.; CALDERON, L. A.; ZULIANI, J. P.; SOARES, A. M. Purification of Phospholipases A₂ from American Snake Venoms. In: CALDERON, L. A. (Org.). Chromatography the most Versatile Method of Chemical Analysis. Book edited by Leonardo de Azevedo Calderon, ISBN 978-953-51-0813-9. 2012.