

ANDRÉ LUIZ SANSON

CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL E FUNCIONAL DE
UMA PROTEÍNA ISOLADA DO PLASMA DE SERPENTES
Bothrops jararaca, RELACIONADA AO CININOGENIO DE
MAMÍFEROS.

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Toxinologia do Instituto
Butantan, para Obtenção do título de Mestre
em Ciências

São Paulo
2012

ANDRÉ LUIZ SANSON

CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL E FUNCIONAL DE UMA
PROTEÍNA ISOLADA DO PLASMA DE SERPENTES *Bothrops*
jararaca, RELACIONADA AO CININOGENIO DE MAMÍFEROS.

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Toxinologia do Instituto
Butantan, para Obtenção do título de Mestre
em Ciências

Orientador:
Luís Roberto de Camargo Gonçalves

São Paulo
2012

FICHA CATALOGRÁFICA

Sanson, André Luiz

Caracterização estrutural e funcional de uma proteína isolada do plasma de serpentes *Bothrops jararaca*, relacionada ao cininogênio de alta massa molecular de mamíferos/ André Luiz Sanson; orientador Luís Roberto de Camargo Gonçalves São Paulo.

88 fls. : il. color. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Toxinologia, Instituto Butantan, 2012.

1. Espectrometria de Massas. 2. Purificação de proteínas. 3. Serpentes 4. Cininogênio. 5. Calicreína. I. Orientador (Camargo Gonçalves,

Luís). II. Programa de Pós-Graduação em Toxinologia.

Instituto Butantan. III. Caracterização estrutural e funcional de uma proteína isolada do plasma de serpentes *Bothrops jararaca*, relacionada ao cininogênio de alta massa molecular de mamíferos.

CDD 615.9

POS-GRADUAÇÃO EM TOXINOLOGIA
INSTITUTO BUTANTAN

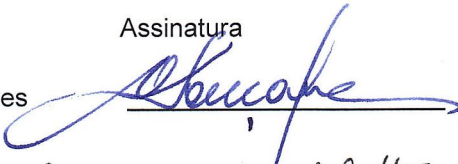
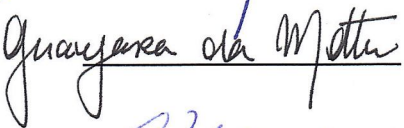

RESULTADO DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO

MESTRADO

NOME DO ALUNO: ANDRÉ LUIZ SANSON

DATA DO EXAME: 04/05/2012

BANCA EXAMINADORA: Profs. Drs.

NOME	Assinatura	Aprovado	Reprovado
Luís R. Camargo Gonçalves (Presidente)		(X)	()
Guacyara da Motta		(X)	()
Ana M. Moura da Silva		(X)	()

DECISÃO FINAL: APROVADO (X)

REPROVADO ()

Comentários da Banca (opcional):



COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
INSTITUTO BUTANTAN

Av. Vital Brazil, 1500, CEP 05503-900, São Paulo, SP, Brazil
Telefone: (55) (011) 3726-7222 ramal 2106 - Fax: (55) (011) 3726-1505

CERTIFICADO

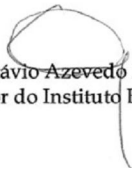
Certificamos que o Projeto intitulado "Caracterização estrutural e funcional de uma proteína isolada do plasma de serpentes *Bothrops jararaca*, relacionada ao cininogênio de alto peso molecular de mamíferos" **protocolo n° 745/10**, sob a responsabilidade de Luís Roberto de Camargo Gonçalves, André Luiz Sanson e Bianca Cestari Zychar, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DO INSTITUTO BUTANTAN (CEUAIB) em reunião de **17/06/2010**.

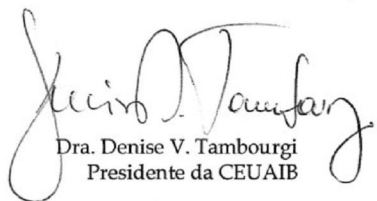
We certify that the research entitled "Structural and functional characterization of a protein isolated from *Bothrops jararaca* snake plasma, related to the mammalian high molecular weight kininogen", **protocol n° 745/10**, under the responsibility of Luís Roberto de Camargo Gonçalves, André Luiz Sanson and Bianca Cestari Zychar, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Research, adopted by the Brazilian College of Animal Experimentation, and was approved by the ETHICAL COMMITTEE FOR ANIMAL RESEARCH of BUTANTAN INSTITUTE in the meeting of 06/17/2010

Vigência do Projeto:	N° de animais/espécie
06/2010 – 07/2012 Laboratório de Fisiopatologia	20 serpentes <i>Bothrops jararaca</i> 965 camundongos Swiss Machos

São Paulo, 30 de junho de 2010.

De acordo:


Dr. Otávio Azevedo Mercadante
Diretor do Instituto Butantan


Dra. Denise V. Tambourgi
Presidente da CEUAIB

Eu André Luiz Sanson, através desta declaração autorizo a divulgação da tese, por mídia impressa, eletrônica ou outra qualquer, após defesa.

De acordo: _____

Luís Roberto de Camargo Gonçalves
Orientador

Dedico este trabalho

Aos meus pais, Osvaldo e Maria Luiza,

pelo carinho, amor e compreensão...

Não tenho palavras para agradecer por tudo o que vocês fizeram e fazem por mim.

Obrigado por existirem!!!

As minhas irmãs, Daniela, Luciana e Marisângela,

pelos conselhos, cumplicidade e carinho!

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Luís, pelos ensinamentos, amizade, apoio e paciência.

Ao Valdemir Melechco Carvalho, pela importante colaboração neste trabalho.

À Fernanda Portaro, por ter ajudado no andamento deste trabalho.

À Iracema, por ter conquistado meu carinho e respeito, sendo uma mulher séria e ao mesmo tempo divertida.

À Edna, pessoa que adotei como madrinha.

À Neusa, de tão brava acaba sendo engraçada, sem contar seus origamis...

Ao Juscelino, Meire, Ângela, Jane e Cintia, pelo carinho e respeito.

À Sâmella, por ser minha amiga e conselheira.

À Priscila, por sua simpatia.

Ao Márcio, pela amizade.

Ao André, pelas piadas, momentos divertidos e canções engraçadas.

À Karina, pela alegria contagiante.

À Eliane, pelas palavras de incentivo, cumplicidade e puxões de orelha.

À Kimie, por ser uma pessoa altruísta.

À Dra. Ida e ao Marcelo Santoro, pelos ensinamentos.

À Patrícia, por sua compreensão.

Aos meus amigos do centro de biotecnologia André, Sueli e Zé, pelos momentos de alegria.

A minha querida amiga Luana e sua família, pela amizade, alegria e cumplicidade.

A minha namorada Camile, por deixar minha alma e coração em paz.

Aos colegas de laboratório que me ajudaram de alguma forma.

Muito obrigado!

"Só existem dois dias no ano em que nada pode ser feito.
Um se chama ontem e o outro se chama amanhã,
portanto, hoje é o dia certo para amar, acreditar,
fazer e, principalmente, viver!"
Dalai Lama

RESUMO

Sanson, André Luiz. Caracterização estrutural e funcional de uma proteína isolada do plasma de serpentes *Bothrops jararaca*, relacionada ao cininogênio de alta massa molecular de mamíferos. 2012. 80 f. Dissertação (Toxinologia). Instituto Butantan, São Paulo, 2012.

O plasma da serpente *Bothrops jararaca* é rico em inibidores de proteases, alguns dos quais com atividade inibitória sobre toxinas presentes no veneno de serpentes da mesma espécie. Um desses inibidores apresenta massa molecular de 110 kDa, é um potente inibidor de cisteíno-peptidase e libera um peptídeo que induz contração de musculatura lisa homóloga. Por estas características, essa proteína, denominada BjHK (*Bothrops jararaca* High Molecular Weight Kininogen), foi correlacionada ao cininogênio de alta massa molecular de mamíferos. Além dessas propriedades, verificou-se que essa proteína inibe metaloproteases presentes no veneno de *B. jararaca*. Esse efeito também foi observado no cininogênio de alta massa molecular humano e correlacionado a porções do domínio 5 dessa proteína. O objetivo do presente projeto é procurar possíveis homologias entre a BjHK e o cininogênio humano, além de possíveis atividades inibitórias sobre agregação plaquetária e adesão celular, atividades estas também descritas no cininogênio de alta massa molecular humano. Por espectrometria de massas identificamos homologia para a proteína BJ46a isolada do plasma da mesma serpente, descrita com um fator anti-hemorrágico. A BJ46a (BjHK) não apresenta homologia com o cininogênio humano, porém possui características comuns a essa proteína. Foram identificadas prováveis regiões responsáveis pela inibição de cisteíno-peptidase e metaloproteases, além de sequências descritas como hipotensoras e inibidoras de agregação plaquetária. Quanto ao efeito sobre plaquetas, o BjHK apresentou uma atividade inibitória sobre plaquetas, quando foi utilizada a trombina como agonista. Além disso, o BjHK inibiu as alterações na interação leucócito-endotélio induzidas pelo veneno de *B. jararaca*, provavelmente devido a sua atividade inibitória sobre metaloproteases do veneno. Até o momento, nossos dados sugerem que a proteína BjHK e a BJ46a sejam a mesma proteína, encontradas em diferentes estados de complexação. A BjHK poderia ser a forma dimerizada ou trimerizada da BJ46a, sendo uma proteína pertencente a super família das cistatinas do tipo 3, devido ao fato de apresentar homologia estrutural as fetuínas.

Palavras-chave: Espectrometria de massas, Purificação de proteínas, Serpentes, Cininogênio e Calicreína.

ABSTRACT

Sanson, André Luiz. Structural and functional characterization of a protein isolated from *Bothrops jararaca* snake plasma, related to the mammalian high molecular weight kininogen. 2012. 80 p. Master thesis (Toxinology). Instituto Butantan, São Paulo, 2012.

The *Bothrops jararaca* snake plasma is rich in protease inhibitors, some of which have inhibitory activity on toxins from its own venom. One of these, which has a molecular mass of 110 kDa, is a potent inhibitor of cysteine-peptidase and releases a peptide that induces contraction of homologous smooth musculature. For these characteristics this protein, named BjHK (*Bothrops jararaca* High Molecular Weight Kininogen) was correlated to mammalian high molecular weight kininogens. Moreover, it was found that this protein inhibits metalloproteases present in the *B. jararaca* venom. This effect was also observed in human high molecular weight kininogen and correlated to portions of the domain 5 of this protein. The aim of this project is to search for homologies between BjHK and the human kininogen, as well as a possible inhibitory activity of this protein on platelet aggregation and cells adhesion. These activities were also described in human high molecular weight kininogen. By mass spectrometry we identified the presence of homology to the protein BJ46a isolated from the same snake plasma, described with an anti-hemorrhagic factor. The BJ46a (BjHK) shows no homology with the human kininogen, but it has common characteristics to this protein. We identified probable regions responsible for the cysteine-peptidase and metalloproteinases inhibition and sequences described as hypotensive peptides from *B. jararaca* plasma and a sequence possibly responsible for the inhibition of platelet aggregation. On platelets, the BjHK presented an inhibitory activity when thrombin was used as agonist. In addition, BjHK inhibited changes in leukocyte-endothelium interactions induced by the *B. jararaca* venom, probably due to its inhibitory activity on the venom metalloproteases. Our data have suggested that BjHK and BJ46a are the same protein, in different states of complex. The BjHK could be the dimerized or trimerized structure of BJ46a, being a protein belonging to the type 3 cystatins superfamily due to the fact that it has structural homology to the fetuins.

Key words: Mass spectrometry, Purification of protein, Snakes, Kininogen and Kallikrein

LISTA DE ABREVIÇÕES E SIGLAS

- ACE – Enzima conversora de angiotensina
- B. jararaca – *Bothrops jararaca*
- BjHK – *Bothrops jararaca* high molecular weight kininogen
- BK – Bradicinina
- CAPM – Cininogênio de alto peso molecular
- CBPM – Cininogênio de baixo peso molecular
- CM papaína – carboximetil-papaína
- CNBr – brometo de cianogênio
- DEAE – dietil amino etano
- DTT – DL-ditiotreitol
- E.C.3.4.22.2 – papaína
- EDTA – ácido etileno diamino tetra-acético
- FVII – Fator VII
- FXI – Fator XI
- FXIa – Fator XI ativado
- F XII – Fator de Hageman
- FXIIa – Fator XII ativado
- HCl – ácido clorídrico
- HPLC – High performance/pressure liquide cromatography
- kDa – kiloDalton
- KCl – Cloreto de potássio
- K_i – constante de inibição (dissociação do complexo enzima-inibidor)
- Lys-BK – Lisil-bradicinina
- MCA – 7-amino-4-metil-cumarina
- NaCl – cloreto de sódio
- NaHCO₃ – bicarbonato de sódio
- NaH₂PO₄ – fosfato de sódio
- NaOH – hidróxido de sódio
- NO – óxido nítrico
- PGE₁ – prostaglandina E₁
- PAR – receptores de atividades por proteases

PM – peso molecular

PMSF – Fluoreto de fenilmetilsufonila

QVVAG – Glutamina, Valina, Valina, Alanina e Glicina

RPPGF – arginina, prolina, glicina e fenilalanina

RNA_m – ácido ribonucléico mensageiro

SDS-PAGE – Sodium Dodecyl Sulphate – Polyacrilamide Gel Electrophoresis

TEMED – N-N-N'-N'-tetrametilenodiaminopropano

TFA – ácido trifluoroacético

t-PA – ativador de plasminogênio tecidual

UE – Unidade enzimática

VB_j – veneno de *Bothrops jararaca*

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Serpente <i>Bothrops jararaca</i>	18
Figura 2 – Componentes do Sistema Caliceína cinina.....	22
Figura 3 – Comparação da estrutura primária de bradicinina com a encontrada em anfíbios.....	24
Figura 4 – Estrutura dos cininogênios humano e seus domínios.....	27
Figura 5 – Estrutura do substrato comercial Z-FR-MCA.....	40
Figura 6 – Perfil cromatográfico troca iônica.....	46
Figura 7 – Perfil da cromatografia de afinidade.....	48
Figura 8 – Eletroforese em SDS-PAGE 12%.....	49
Figura 9 – Dixon-plot.....	51
Figura 10 – Valor da constante de inibição (ki).....	51
Figura 11 – Cobertura de sequenciamento da proteína BJ46a.....	54
Figura 12 – Espectro de dissociação.....	57
Figura 13 – Espectro de dissociação.....	58
Figura 14 – Espectro de dissociação.....	59
Figura 15 – Espectro de dissociação.....	60
Figura 16 – Espectro de dissociação.....	61
Figura 17 – Alinhamento das sequências primárias das proteínas BJ46a-BjHK, HSF e <i>Cavia porcellus</i>	62
Figura 18 A e B – Alinhamento das sequências primárias de duas regiões da proteína BJ46a-BjHK sobre dois peptídeos com ação hipotensora.....	62
Figura 19 – Alinhamento das sequências primárias de duas regiões da proteína BJ46a-BjHK sobre uma região da porção C-terminal da proteína S100A9 e CAMM.....	63
Figura 20 – Indução da agregação plaquetária com trombina.....	64
Figura 21 – Indução da agregação plaquetária com colágeno.....	64
Figura 19 – Interação leucócito-endotélio em vênulas pós-capilares.....	66
Figura 20 – Efeito da BjHK na alteração leucócito-endotélio 2 horas.....	67
Figura 21 - Efeito da BjHK na alteração leucócito-endotélio 24 horas.....	67

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Atividade inibitória das frações sobre a papaína.....	47
Tabela 2 – Rendimento da purificação da BjHK.....	48
Tabela 3 – Atividade inibitória da BjHK sobre a papaína.....	50
Tabela 4 – Proteínas identificadas na fração maior.....	53
Tabela 5 – Porcentagem de homologia entre CAMM, ave, anfíbio, peixe e BJ46a-BjHK.....	55

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	18
1.1.	O Sistema Caliceína-Cinina	20
1.2.	Cininogênio	25
1.3.	Resposta Inflamatória (Domínio 5)	28
1.4.	Inibição da agregação plaquetária e atividade antiadesiva do CAMM	29
1.5.	Ação da BjHK e do HK sobre metaloproteases de venenos ofídicos	29
2.	OBJETIVOS	31
3.	MATERIAL E MÉTODOS	32
3.1.	Material	32
3.1.1.	Animais.....	32
3.1.2.	Insumos/marcas.....	32
3.1.3.	Soluções e reagentes.....	33
3.1.4.	Resinas.....	35
3.1.5.	Equipamentos.....	36
3.2.	Métodos	36
3.2.1.	Coleta do sangue e obtenção do plasma.....	36
3.2.2.	Cromatografia Troca iônica.....	36
3.2.3.	Preparação da Resina de afinidade Carboximetil-papaína-Sepharose (CM-papaína Sepharose.....	37
3.2.4.	Cromatografia de afinidade.....	38
3.2.5.	Quantificação de proteínas.....	39
3.2.6.	Inibição da hidrólise do substrato, por inibidor de cisteíno-peptidase.....	39
3.2.7.	Cinética de Inibição da papaína.....	40
3.2.8.	Eletroforese em gel de poliacrilamida.....	41
3.2.9.	Exclusão molecular.....	41
3.2.10.	Espectrometria de massa.....	42
3.2.11.	Agregação plaquetária.....	43

3.2.12.	Efeito de BjHK na interação leucócito-endotélio.....	44
3.2.13.	Análises estatísticas.....	45
4.	RESULTADOS	46
4.1.	Purificação da proteína BjHK	46
4.2.	Tabela de rendimento da cromatografia	48
4.3.	Análise da proteína BjHK por eletroforese em gel de SDS-PAGE	49
4.4.	Teste de atividade inibitória sobre cisteíno-peptidase	50
4.5.	Cinética da inibição da papaína	51
4.6.	Resultados da espectrometria de massas	52
4.7.	Ação da BjHK sobre agregação plaquetária	63
4.8.	Efeito da BjHK na alteração de interação leucócito-endotélio induzidas por VBJ na microcirculação do músculo cremaster de camundongos	65
5.	DISCUSSÃO	68
6.	CONCLUSÃO	75
7.	BIBLIOGRAFIA	76

1. INTRODUÇÃO

Os acidentes ofídicos constituem um importante problema de saúde pública por sua frequência e gravidade, sendo, atualmente, reconhecidos pela Organização Mundial de Saúde como parte do grupo de Doenças Tropicais Negligenciadas (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2010). No Brasil, as serpentes do gênero *Bothrops* são responsáveis por 87% dos acidentes por serpentes peçonhentas (OLIVEIRA et al., 2009).

O gênero *Bothrops* compreende mais de 30 espécies e subespécies que estão distribuídas desde o sul do México até a Argentina, e em algumas Ilhas do Caribe. No Brasil, esse gênero compreende várias espécies, dentre as quais estão as serpentes popularmente conhecidas como jararaca (*Bothrops jararaca*) (figura 1), jararacussu (*Bothrops jararacussu*), urutu-cruzeiro (*Bothrops alternatus*), jararaca-pintada (*Bothrops neuwiedi*) e caíçaca (*Bothrops moojen*) (MELGAREJO, 2003).



Figura 1 – Serpente *Bothrops jararaca*

Bothrops jararaca é uma serpente peçonhenta cuja distribuição geográfica no Brasil compreende desde o sul da Bahia até o Rio Grande do Sul, sendo a espécie mais comum no Sudeste e a principal causadora de acidentes nesta vasta área

geográfica. Possui colorido muito variável, apresentando desde tons castanhos claros até coloração quase completamente preta, que formam figuras em padrões de “V” invertido. Ágil, sobe com facilidade em arbustos e telhados baixos.

O tamanho médio dessa serpente é de aproximadamente 1 metro de comprimento; nasce principalmente entre fevereiro e março, em ninhadas compostas de 3 a 35 filhotes, medindo em torno de 20 cm de comprimento, podendo atingir de 90 a 120 cm de comprimento na fase adulta. Sua dentição é solenóglifa: possui o osso maxilar reduzido e carrega em cada maxila um desenvolvido dente para inoculação de veneno, o qual possui internamente, ao longo do seu comprimento, um canal por onde passa o veneno (HOGE; ROMANO HOGE, 1978, 1979).

O aparelho de veneno consiste de pares de glândulas, dutos e presas. Com relação à glândula, esta é formada por uma bainha de tecido conjuntivo invadida por músculos que se contraem durante a descarga de veneno e se localiza na região supralabial, posterior aos olhos (KLEMMER, 1968).

Nos envenenamentos botrópicos ocorrem sérios distúrbios hemostáticos e intensa reação inflamatória no local da picada, com presença de edema, dor e hemorragia, podendo haver necrose, resultando em graves perdas teciduais com sequelas que podem desabilitar o indivíduo no trabalho (ROSENFELD, 1971; CARDOSO et al., 1993; FRANÇA; MÁLAQUE, 2003).

A resistência de serpentes e de alguns mamíferos aos efeitos tóxicos do veneno de serpentes é conhecida de longa data. Várias proteínas foram isoladas do sangue destes animais sendo descritas como fatores anti-hemorrágicos (DOMONT et al., 1991; THWIN; GOPALAKRISHNAKONE, 1998). Esses fatores são glicoproteínas acídicas, termoresistentes e sem atividade enzimática (DOMONT et al., 1991). Aparentemente inibem especificamente metaloproteinases dos venenos ofídicos através da formação de complexos não covalentes, não atuando sobre serinoproteinases (DOMONT et al., 1991; THWIN; GOPALAKRISHNAKONE, 1998).

O plasma de serpentes *Bothrops jararaca* é rico em inibidores de proteinases (CHUDZINSKI-TAVASSI et al., 1995). Duas proteínas foram isoladas do plasma da serpente *Bothrops jararaca* capazes de inibir metaloproteinases isoladas de venenos ofídicos tais como jararagina, atrolisina C e bothropasina (TANIZAKI et al., 1991; VALENTE et al., 2001).

Além destas, um potente inibidor de cisteíno-peptidases também foi isolado do plasma dessa serpente (CHUDZINSKI et al., 1989). Essa proteína foi relacionada ao cininogênio de mamíferos pertencente ao sistema calicreína-cinina e foi denominada de *Bothrops jararaca* High molecular weight Kininogen – **BjHK**. Essa relação deve-se ao fato dessa proteína apresentar massa molecular de 110 kDa, liberar peptídeo ativo sobre musculatura lisa homóloga, além de ser um potente inibidor de cisteíno-peptidases (CHUDZINSKI et al., 1989).

A BjHK, bem como o cininogênio de alta massa molecular isolado do plasma humano, apresentaram uma potente atividade inibitória sobre atividades hemorrágicas decorrentes do veneno de *Bothrops jararaca* dependentes de metaloproteinases, atividade até então não descrita para essas proteínas (GONÇALVES; CHUDZINSKI-TAVASSI, 2004).

Estudos posteriores mostraram que, no cininogênio humano, a região responsável pela inibição de jararagina, uma metaloproteinase isolada do veneno de *Bothrops jararaca*, é uma porção rica em histidina e glicina localizada no domínio 5 dessa proteína (GONÇALVES et al., 2003).

Quanto à BjHK, ou qualquer outro cininogênio de répteis, não se conhece a estrutura química ou função fisiológica.

1.1. O sistema calicreína-cinina

O sistema calicreína-cinina é composto de pró-calicreína, calicreína tecidual ou pré-calicreína, calicreína plasmática, cininogênios, cininas, cininases e enzimas conversoras de cininas. Pró-calicreína dá origem a calicreína tecidual que age sobre cininogênio de baixa massa molecular liberando calidina. A calidina pode sofrer ação de aminopeptidases dando origem a bradicinina. Cininases podem degradar tanto cininas quanto seus precursores. (MORAIS et al., 1999).

O primeiro relato sobre o sistema calicreína-cinina data de 1928 por Frey e Kraut. Esses autores observaram o efeito hipotensivo da urina humana quando injetada na corrente sanguínea de cachorros.

Anos depois, descobriu-se que a origem desta substância hipotensora era no pâncreas, resultando no nome de calicreína, pois em grego *Kallikreas* significa pâncreas. Eugen Werle, em 1937, realizou experimentos com calicreína misturada

ao soro sanguíneo e concluiu que uma nova substância estava sendo gerada, a qual era capaz de contrair o íleo isolado de cobaias.

A ativação do sistema calicreína-cinina por mecanismos fisiológicos e fisiopatológicos abrange várias atividades vasculares e celulares que derivam dessas vias. A atividade vascular do sistema calicreína-cinina inclui regulação da pressão sanguínea e risco de trombose. A atividade celular inclui proliferação celular, angiogênese, apoptose e inflamação (SCHMAIER; MCCRAE, 2007).

O contato do plasma com superfícies carregadas negativamente ocasiona a ligação e ativação do fator XII (fator Hageman), resulta na ativação da pré-calicreína plasmática para calicreína pela ativação do fator XII e clivagem do cininogênio de alta massa molecular pela calicreína produzindo bradicinina (KAPLAN, 1997).

A bradicinina foi relatada primeiramente em 1949 por Rocha e Silva e colaboradores, que descreveram um potente agente vasodilatador liberado do plasma humano utilizando o veneno da serpente *Bothrops jararaca*. Mais tarde estudos mostraram que a calicreína poderia ser encontrada em outros tecidos participando do sistema calicreína-cinina em uma grande diversidade de processos fisiopatológicos (COSTA-NETO et al., 2008).

As cininas fazem parte de um grupo de peptídeos que incluem um nonapeptídeo bradicinina (BK) e um decapeptídeo Lys-BK, também chamado de calidina. A Lys-BK pode ser convertida em bradicinina pela ação de aminopeptidases. A formação das cininas ocorre pela ação das calicreínas plasmática e tecidual, as quais clivam os cininogênios liberando um peptídeo vasoativo denominado cinina (bradicinina) ou lys-bradicinina (calidina). A calicreína plasmática é uma serinoproteinase sintetizada nos hepatócitos e circula no plasma na forma inativa pré-calicreína ligada ao cininogênio de alta massa molecular (BHOOLA, 1992; MANDLE, 1976). A calicreína tecidual é uma glicoproteína ácida, a qual difere da calicreína plasmática por possuir ampla distribuição em rins, vasos sanguíneos, sistema nervoso central, pâncreas, intestino, glândulas salivares, baço e neutrófilos (BHOOLA, 1992; ZHAO, 2001; MAHABEER et al., 2000). Calicreína tecidual é sintetizada como uma proenzima chamada pró-calicreína, a qual é ativada por plasmina ou calicreína plasmática. A calicreína tecidual libera Lys-BK pela ação da calicreína tecidual sobre o cininogênio de baixa massa molecular (DOBROVOLSKY et al., 2002).

As cininas desempenham um papel importante na contração da musculatura lisa visceral, vasodilatação por promover a liberação de óxido nítrico (NO) do endotélio vascular, aumento da permeabilidade vascular, promoção da quimiotaxia dos leucócitos, transmissão da resposta de dor através do nervo terminal sensorial e desenvolvimento de hipotensão sanguínea (SAXENA et al., 2011).

As ações biológicas e efeitos farmacológicos das cininas são mediados por dois tipos diferentes de receptor, denominados B1 e B2, que são membros da superfamília da proteína G (figura 2). As atividades das cininas estão diretamente relacionadas aos efeitos em seus receptores. Os receptores B1 e B2 estão localizados no endotélio vascular, nervo sensorial aferente, células da musculatura lisa e células epiteliais (SAXENA et al., 2011).

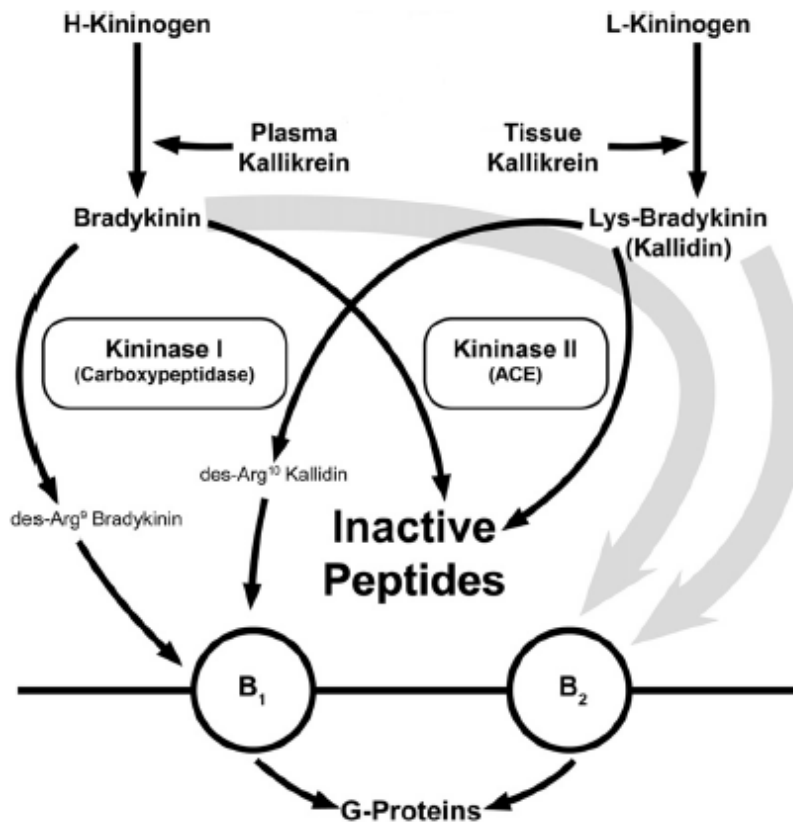


Figura 2 - Esquema de vários componentes do sistema calicreína-cinina adaptado de Saxena e cols. (2011).

Os receptores B1 raramente são expressos em tecido normal. Existe aumento do número de receptores B1 em tecidos inflamados, carcinomas, artrite reumatóide, rejeição a transplante e glomerulonefrite (BHOOLA, 1992; DRAY et al., 1993). A atividade farmacológica do receptor B1 é regulada por des-Arg9-BK e des-Arg10-kallidin (figura 2). Os receptores B2 estão presentes na maioria dos tecidos, sendo ativados pela BK e lys-BK, são responsáveis pela maioria dos efeitos das cininas. Sua ativação implica em hipotensão, broncoespasmo e no desenvolvimento de edema (WOLLERT et al., 1997).

A quantidade de cininas depende do aumento da produção e do metabolismo de um grupo de enzimas denominadas cininases. As cininas são degradadas em fluidos extracelulares e dentro de células por 2 enzimas (cininases I e II). A cininase I, uma carboxipeptidase, metaboliza a cinina pela remoção da arginina da porção carboxi-terminal; e a cininase II, pela remoção de Phe-Arg da porção carboxi-terminal. Cininase II é a mesma enzima conversora de angiotensina que inativa angiotensina I (SAXENA et al., 2011).

Em animais filogeneticamente distintos como os répteis, principalmente jacarés e tartarugas, ocorre a liberação de cininas quando o plasma entra em contato com superfícies carregadas negativamente, como observado em mamíferos. Durante a evolução, aves perderam uma enzima da fase de contato, possuindo todos os componentes menos o fator XII, no entanto esse fator pode ser transferido do plasma de mamíferos ou répteis, o que comprova essa perda (ERDÖS et al., 1967; SEKI et al., 1973; CONLON, 1998).

Por muitos anos, a existência do sistema calicreína-cinina em espécies diferentes dos mamíferos foi controversa. Estudos mostram que o tratamento do plasma de certas aves (ex. pombos e patos) e répteis (ex. jacarés e tartarugas) com esferas de vidro e/ou calicreína pancreática e pancreática porcina liberou um material como a bradicinina, que possui a capacidade de contrair útero de rata e induzir hipotensão em coelhos, no entanto a relação dessa substância com aquela de mamíferos é desconhecida (CONLON, 1998).

Do plasma de galinha isolou-se uma proteína de 74 kDa que induziu contração de musculatura lisa homóloga, a qual denominou-se ornito-cininogênio (KIMURA et al., 1987). Esta proteína foi incubada com o plasma bovino contendo calicreína, mas a ativação por contato do plasma de galinha com superfície

carregada negativamente não formava cinina, indicando a ausência de pré-caliceína, ativador análogo do fator XII de mamíferos.

O tratamento do plasma de tartaruga ou jacaré com esferas de vidro na presença de inibidor de cininase forma cinina com substituição de um resíduo de aminoácido conforme observado na figura 3, quando comparados com bradicinina. Fica claro a presença de componentes do sistema caliceína-cinina encontrados em mamíferos. No entanto, plasma de outros répteis quando submetidos às mesmas condições, não apresentam a liberação de cinina, existindo a hipótese de ausência do cininogênio no sangue.




Human	Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-  Pro-Phe-Arg
Chicken	- - - - - Thr - Leu -
Alligator	- - - - -  - - -
Python	Ala - - - - Thr - - -
Turtle	- - - - -  - - -

Figura 3 – Comparação da estrutura primária de bradicinina com a encontrada em anfíbios, adaptado de Colon e cols. (1998).

No sangue de anfíbios não existe a presença do sistema caliceína-cinina, contudo, na pele de alguns anfíbios foram detectados peptídeos relacionados com a bradicinina. Em peixes, o plasma tratado com esferas de vidro em condições já comparadas ao plasma de mamíferos e répteis não gera bradicinina, porém quando tratado com caliceína porcina tecidual ou plasmática, gera um peptídeo vasoativo, o que indica assim a presença de cininogênio (CONLON, 1998). Já foi isolado cininogênio do plasma de lampreia.

Em serpentes, particularmente *Bothrops jararaca*, tanto o sistema caliceína-cinina quanto os sistemas de controle da homeostasia têm muitas particularidades (NAHAS et al., 1973; LAVRAS et al., 1979; NAHAS et al., 1981; CHUDZINSKI-TAVASSI et al, 1995). Embora inicialmente descrito como desprovido do Fator XII, pré-caliceína e cininogênio (LAVRAS et al., 1979), verificou-se posteriormente que o

plasma dessa espécie de serpente quando incubado com tripsina gerava um peptídeo ativo em oviduto de serpentes. No entanto, esse peptídeo era inativo em preparações farmacológicas (ABDALLA et al., 1989).

1.2. Cininogênio

As cisteíno-peptidases podem ser inativadas por inibidores protéicos naturais, presentes em tecidos de mamíferos, que foram descritos pela primeira vez na década de 1950 e, posteriormente, denominados cistatinas (BARRET 1986, 1987). Atualmente são conhecidas três famílias de cistatinas (I, II e III). Na família I estão as cistatinas A e B (também denominadas estefinas A e B) e a estefina C bovina, que são proteínas pequenas (100 resíduos de aminoácidos, 11kDa) e sem pontes dissulfeto. As cistatinas C, D, S e a cistatina presente em ovo de galinha são membros da família II e são proteínas maiores (120 resíduos de aminoácidos, 13 kDa) e com duas pontes dissulfeto. Finalmente, na família III estão os cininogênios de alto (110 kDa) e de baixa massa molecular (60 kDa), produtos de um mesmo gene (KITAMURA et al, 1985; TAKAGAKI et al, 1985). Em ratos, um terceiro cininogênio foi identificado, o T-cininogênio (OKAMOTO; GREENBAUM, 1983), que também tem atividade inibitória sobre cisteíno-peptidases (MOREAU et al., 1986).

Passadas várias décadas, muitos cininogênios foram identificados em mamíferos (PIERCE, 1968; SEMBA et al., 2000) e em outros animais incluindo anfíbios (LAI et al., 2001; MCCRUDDEN et al., 2007), peixes (YLONEN et al., 1999, 2002) e insetos (ZHOU et al., 2006), os quais possuem diferentes estruturas e funções. No plasma de mamíferos, há 2 tipos de cininogênio: cininogênio de alta e baixa massa molecular (CAMM e CBMM, respectivamente), com exceção de ratos, os quais possuem um terceiro cininogênio denominado de T-cininogênio. Os CAMM e CBMM são derivados de um único gene K, com padrão combinado de *splicing* alternativo com calda polyA, enquanto que o T-cininogênio é codificado pelo gene T (ZHOU et al., 2007; LALMANACH et al., 2010).

Os cininogênios humano são glicoproteínas constituídas por cadeias polipeptídicas únicas, que após a ação das calicreínas e consequente liberação de cininas, ficam compostos por uma cadeia pesada N-terminal ligada por uma ponte dissulfeto a uma cadeia leve C-terminal (COLMAN; SCHMAIER, 1997; SAINZ;

PIXLEY; COLMAN, 2007). A cadeia pesada é a porção da molécula responsável pela inibição das cisteíno-peptidases. Quando esta é comparada com as sequências de aminoácidos dos inibidores de cisteíno-peptidases de baixa massa molecular cistatinas e estefina, verifica-se um alto grau de homologia, principalmente em relação à sequência mais conservada – Glutamina, Valina, Alanina e glicina (QVVAG) (OHKUBO et al., 1984). Alguns inibidores peptídicos sintéticos são baseados nesta sequência mais conservada das cistatinas (LALMANACH et al., 1993, 1995).

O mapa do gene corresponde a 3q26-qter, o qual possui localização homóloga a α_2 HS-glicoproteína rica em histidina (FONG et al., 1991; RIZZU et al., 1995). Possui 11 éxons e consiste de 27 Kb sintetizando um único RNAm para ambos os cininogênios de alta e baixa massa molecular por *splicing* alternativo. Os cininogênios compartilham a região que codifica os primeiros 9 éxons, uma parte do éxon 10 que contém a sequência da bradicinina, e os primeiros 12 aminoácidos seguintes a sequência carboxi-terminal da bradicinina (COLMAN; SCHMAIER, 1997).

Os 2 RNAm dos cininogênios codificam 2 proteínas separadas: o cininogênio de baixa massa molecular, uma β -globulina de 66 kDa com concentração no plasma de 160 μ g/ml (2,4 μ mol/l) e ponto isoelétrico de 4,7, e o cininogênio de alta massa molecular, uma α -globulina de 120 kDa com concentração no plasma de 80 μ g/ml (0,67 μ mol/l) e ponto isoelétrico de 4,3 (JACOBSEN, 1967).

Os cininogênios são sintetizados no fígado (TAKAGAKI et al., 1985; KITAMURA et al., 1985), mas nas células endoteliais da veia umbilical humana foi verificado RNAm para o cininogênio de alta massa molecular que é capaz de sintetizar a proteína (SCHMAIER, 1988).

Os cininogênios são proteínas compostas de múltiplos domínios, cada um associado a um tipo de atividade. A ligação do cininogênio com receptores celulares facilita a liberação da bradicinina, que pode ligar aos receptores, influenciando o local de ação celular. Os cininogênios estão divididos em 3 porções: a cadeia pesada que é comum para ambos os cininogênios, a bradicinina e a cadeia leve que é única para os cininogênios (Figura 4).

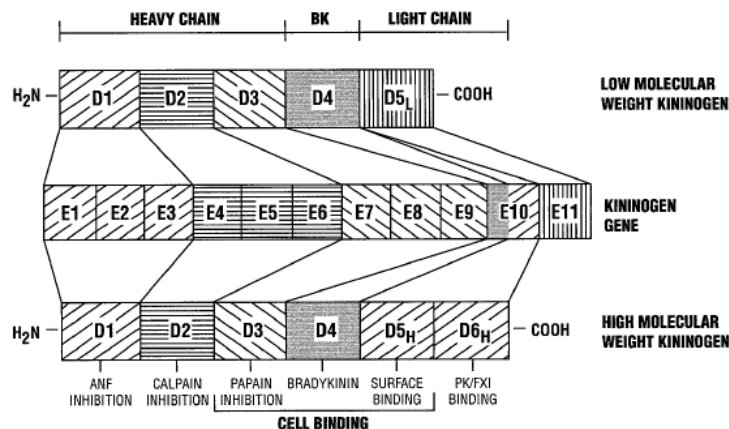


Figura 4 – Estrutura dos cininogênios humano e seus domínios adaptado de Colman e Schmaier, 1997.

Os domínios 1 ao 3 compreendem a cadeia pesada dos cininogênios. O domínio 4 é a região da bradicinina. O domínio 5, para o cininogênio de baixa massa molecular, é único com 4-kDa da cadeia leve. Os domínios 5 e 6 do cininogênio de alta massa molecular são únicos para essa proteína e correspondem à cadeia leve (COLMAN; SCHMAIER, 1997).

Pouco se sabe sobre as funções do domínio 1, exceto que possui uma alta afinidade com sítios de ligação de cálcio e é capaz de inibir o fator natriurético (ISHGURO et al., 1987).

Os domínios 2 e 3 contêm uma sequência de aminoácidos altamente conservados QVVAG presentes em inibidores de cisteíno-peptidase. O domínio 3 possui outras funções, pois apresenta uma sequência que liga às plaquetas e células endoteliais. Em plaquetas ativadas, uma sequência do domínio 3 é capaz de inibir α -trombina, ou seja, essa sequência compete com a trombina pela ligação com as plaquetas mimetizando a sequência GPIb das plaquetas pela ligação com a trombina (MELONI; SCHMAIER, 1991; JIANG et al., 1992; PURI et al., 1991).

O Cininogênio de alta massa molecular quando clivado pela calicreína libera bradicinina e forma o cininogênio de alta massa molecular ativado (CAMMa) que contém uma cadeia pesada ligada a cadeia leve por uma ponte dissulfeto (COLMAN; SCHMAIER, 1997; SAINZ; PIXLEY; COLMAN, 2007).

O domínio 4 é a região da bradicinina que é um nonapeptídeo (Arg¹-Pro²-Pro³-Gly⁴-Phe⁵-Ser⁶-Pro⁷-Phe⁸-Arg⁹) liberado pela clivagem do CAMM pela ação da calicreína que possui muitas funções, dentre elas a de inibidor de α -trombina (TAKAGAKI et al., 1985; KITAMURA et al., 1985), possui uma atividade vasodilatadora pela estimulação da produção de metabólitos de ácido aracdônico e óxido nítrico, é um potente estimulador para ativador de tecido tipo plasminogênio (t-PA) liberado em humanos e coelhos (BROWN et al., 1999), age em processos inflamatórios, edema e dor resultando em vasodilatação e no aumento da permeabilidade de microvasos (COLMAN; SCHMAIER, 1997; SAINZ; PIXLEY; COLMAN, 2007; LALMANACH et al., 2010).

A ligação do domínio 5 com células é responsável pela ação antiadesiva do CAMM que pode deslocar fibrinogênio de neutrófilos e plaquetas (GUSTAFSON et al., 1989) e inibir a adesão e espraiamento de células osteosarcoma sobre vitronectina, a proliferação de células endoteliais e a angiogênese (COLMAN et al., 2000).

Peptídeos derivados do domínio 5 do cininogênio de alta massa molecular, os quais estão classificados como região ligadora de células, induzem apoptose celular, inibem angiogênese e são bactericidas (ZHANG et al., 2002; NORDAHL et al., 2005).

O domínio 6 contém sítios de ligação para pré-calicreína e fator XI (COLMAN, 1994).

1.3. Resposta inflamatória (Domínio 5)

Além de participar do processo inflamatório agudo com a liberação da bradicinina, o cininogênio de alta massa molecular, uma vez clivado pela ação da calicreína, exibe propriedades antiadesiva e antiinflamatória (COLMAN, 1996).

Essas propriedades são relacionadas ao domínio 5 da proteína, que possui propriedades antiangiogênica (COLMAN et al., 2000), antiinflamatória (CHAVAKIS et al., 2001), de inibição da proliferação e de indução da apoptose de células endoteliais (GUO et al., 2001), anti-trombótica (CHAVAKIS et al., 2002b) e de inibição da agregação plaquetária induzida por trombina (CHAVAKIS et al., 2002a).

1.4. Inibição da agregação plaquetária e atividade antiadesiva do cininogênio de alta massa molecular humano (CAMM)

Os cininogênios possuem atividade anti-trombótica, tanto o de baixo quanto o de alta massa molecular, sendo que 5% de sua concentração fisiológica induz o bloqueio pela trombina da agregação plaquetária e libera serotonina pela inibição da trombina (MELONI; SCHMAIER, 1991). A região do cininogênio que inibe a trombina tem sido associada com os domínios 3 e 4, a região da bradiginina (JIANG et al., 1992; HASAN et al., 1996). Os 5 primeiros aminoácidos que compreendem o peptídeo da bradiginina – arginina, prolina, prolina, glicina e fenilalanina (RPPGF), promovem uma ligação forte no sítio da trombina pela ligação com receptores da atividade por proteinase (PAR) 1 e 4 para prevenir a clivagem pela trombina. A sequência RPPGF, *in vitro*, inibe a agregação plaquetária por colágeno, entretanto a mesma sequência em experimentos *in vivo* possui um efeito pró-agregante (HASAN et al., 1999, 2003).

Os cininogênios exercem atividade inibitória sobre agregação plaquetária por três porções da sua molécula: uma região do domínio 3 compete com a trombina para a ligação à glicoproteína Ib; metabólitos da bradiginina podem prevenir a clivagem do receptor PAR ativado por trombina e o domínio 5 no cininogênio de alta massa molecular inibe a adesão e a agregação plaquetária bloqueando a interação entre a integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ e vitronectina (CHAVAKIS et al., 2002a).

Além disso, o CAMM possui atividade antiadesiva, inibindo o espriamento de células de osteosarcoma e melanoma sobre uma matriz de vitronectina, e de células endoteliais, plaquetas e células mononucleares do sangue sobre matrizes de vitronectina ou fibrinogênio, particularmente após a clivagem pela ação da calicreína, resultando na proteína livre de cinina (CAMMa) (ASAKURA et al., 1992).

1.5. Ação da BjHK e do CAMM sobre metaloproteinases de venenos ofídicos

A BjHK foi capaz de inibir atividades do veneno de serpentes *Bothrops jararaca*, nas quais metaloproteinases estavam envolvidas direta ou indiretamente (GONÇALVES; CHUDZINSKI-TAVASSI, 2004), entretanto, diferentemente do

descrito para outros fatores anti-hemorrágicos, sem a formação de complexo proteínase-inibidor.

Estudando-se o cininogênio de alta massa molecular humano, uma proteína teoricamente com algumas características homólogas observadas no BjHK, porém com estrutura e sequência conhecida, verificou-se que este também possui atividade inibitória sobre a atividade hemorrágica do veneno total de *Bothrops jararaca* e sobre uma metaloproteinase isolada desse veneno (GONÇALVES; CHUDZINSKI-TAVASSI, 2004), a jararagina (PAINE et al., 1992), mas não sobre outras metaloproteinases de matriz tais como MMP2 e MMP9. Estes efeitos até então não haviam sido descritos para essa proteína.

Utilizando peptídeos sintéticos verificou-se que esse efeito inibitório está relacionado a regiões ricas em histidina e glicina do domínio 5 do CAMM (GONÇALVES et al., 2003).

2. OBJETIVO

Tendo em vista as seguintes considerações:

- A estrutura da molécula de BjHK não é conhecida, bem como a estrutura de nenhum outro cininogênio de répteis;
- Tanto a BjHK quanto o CAMM inibem metaloproteinases presentes no veneno de *Bothrops jararaca*;
- No CAMM esta atividade inibitória está relacionada a porções ricas em histidina e glicina do domínio 5 dessa proteína;
- O domínio 5 do CAMM promove inibição da agregação plaquetária, e possui propriedades antiagregantes;

Este projeto visa estabelecer similaridades entre a BjHK e o CAMM através da análise estrutural da BjHK por sequência de aminoácidos e espectrometria de massas, particularmente procurando semelhanças com a região do CAMM responsável pela inibição de metaloproteinases do veneno de *B. jararaca* e a sequência do peptídeo liberado da BjHK após ação de proteinases, procurando semelhanças com a bradicinina. Além disso, como atividade inibitória do CAMM sobre metaloproteinases esta relacionada ao seu domínio 5, atividades presentes nesse domínio do CAMM também serão estudadas na BjHK. Para isso optou-se pelo estudo da ação da BjHK sobre agregação plaquetária e adesão celular.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material

3.1.1. Animais

Exemplares de ambos os sexos adultos de serpentes *Bothrops jararaca*, provenientes de diversas localidades, foram fornecidos pelo Laboratório de Herpetologia do Instituto Butantan. As serpentes eram recebidas no Laboratório de Fisiopatologia do Instituto Butantan um dia antes do procedimento, já que as mesmas ficavam no Laboratório de Herpetologia no mínimo por 10 dias para que pudessem recuperar-se de um possível estresse causado pela captura e transporte até o Instituto. O peso médio das serpentes utilizadas foi de 350 g. O procedimento foi aprovado pela Comissão de Ética no uso de animais do Instituto Butantan, protocolo número 745/10.

3.1.2. Insumos/marcas

- Insumos marca Sigma (St. Louis, USA): Albumina bovina, Ácido iodoacético, EDTA, Tris-HCl, DTT, PMSF, Glicerol, Vermelho de fenol, AgNO₃, Papaína, Z-FR-MCA, β-mercaptoetanol, Glicina, PGE1, Trombina, CaCl₂, Oxalato de amônio, KH₂PO₄, HEPES, Colágeno, TEMED, Citrato de sódio, DMSO, L-cisteína, SDS, KCl-HCl, MgCl₂, Azul Comassie R250;

- Insumos marca Merck (Darmstadt, Germany): Butanol, Azul de bromofenol, Triton X-100, H₃PO₄, Formaldeído, Metanol;

- Insumos marca Vetec (RJ, Brasil): Ácido acético, Etanol, Persulfato de amônio;

- Insumos marca Fischer (New Jersey, USA): NaCl;

- Insumos marca Synth (SP, Brasil): NaHCO₃, NaOH;

- Insumos marca Anidrol (SP, Brasil): HCl;

- Insumos marca BioRad (California, USA): Acrilamida;

- Insumos marca Naturalis (SP, Brasil): Lecitina de soja;

- Insumos marca Holliday Scott (Buenos Aires, Argentina): Xilazina;
- Insumos marca Agner União (Embu-guaçu, SP): Cloridrato de quetamina;

3.1.3. Soluções e reagentes

Todas as soluções foram preparadas em água deionizada Milli-Q Millipore (Darmstadt, Germany).

Coleta de sangue serpente

- Tiopental Sódico (30mg/kg);
- Anticoagulante citrato de sódio 3,8%;
- Solução com inibidores: PMSF 1 mM, EDTA 1 mM, Tris-HCl 50 mM, NaCl 30 mM.

Cromatografias

- Tampão de ativação: NaH_2PO_4 100 mM, L-cisteína.HCl 2 mM, EDTA 1 mM, DMSO 4%, pH 6,0;
- Papaína;
- Ácido iodoacético 10 mM;
- Tampão diálise: NaHCO_3 100 mM, NaCl 500 mM, pH 8,3;
- Solução ácida: HCl 150 mM, NaCl 500 mM, pH 2,0;
- Solução de bloqueio: Tris-HCl 100 mM, pH 8,0;
- Solução NaOH 100 mM, NaCl 500 mM;
- Solução ácida HCl 100 mM, NaCl 500 mM;
- Solução NaCl 1M;
- Tampão equilíbrio: Tris-HCl 50 mM, EDTA 1 mM, PMSF 1mM, NaCl 30 mM, pH 8,0;
- Tampão Tris-HCl 50 mM, EDTA 1 mM, PMSF 1mM, NaCl 100 mM, pH 8,0;
- Tampão Tris-HCl 50 mM, EDTA 1 mM, PMSF 1mM, NaCl 200 mM, pH 8,0;
- Tampão Tris-HCl 50 mM, EDTA 1 mM, PMSF 1mM, NaCl 300 mM, pH 8,0;
- Tampão de equilíbrio: Tris-HCl 100 mM, pH 7,0;
- Solução ácida: KCl-HCl 500 mM, pH 2,0;
- Tampão de neutralização: Tris-HCl 1 M; pH 8,0;
- Solução diálise: Tris-HCl 20 mM, NaCl 30 mM, pH 8,0;

- Solução diálise: NaCl 150 mM;

Ensaio de inibição de cisteino-peptidase

- Tampão de ativação com DTT: NaH₂PO₄ 400 mM, EDTA 4 mM, DTT 8 mM, pH 6,8.

Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

- Acrilamida 30%: acrilamida 29% e N,N'-metilenobisacrilamida 1%;
- Tampão Tris-HCl pH 8,8: tampão Tris-HCl 1,5 M e SDS 0,1%, pH 8,8;
- Tampão Tris-HCl pH 6,8: tampão Tris-HCl 0,5 M e SDS 0,1%, pH 6,8;
- TEMED;
- Solução de persulfato de amônio: persulfato de amônio 10%;
- Butanol: n-butanol 91%;
- Tampão de amostra redutor 5 X: tampão Tris-HCl 50 mM pH 6,8, azul de bromofenol 0,1%, glicerol 10%, β-mercaptoetanol 100 mM e SDS 2%;
- Tampão de amostra não redutor 5 X: tampão de amostra redutor 5X sem β-mercaptoetanol;
- Tampão de corrida: tampão Tris-HCl 25 mM, glicina 192 mM e SDS 0,1%, pH 8,3;
- Solução corante: ácido acético glacial 10%, etanol 45% e azul Coomassie R250 0,25%;
- Solução descorante: ácido acético glacial 10% e etanol 30%;
- Solução secante: ácido acético glacial 10% e etanol 50%;
- Solução stop + formaldeído 37%: Metanol 50%, ácido acético 12%;
- Etanol 30%;
- Tiosulfato de sódio 50%;
- Solução de prata: AgNO₃ 20%, formaldeído 37%;
- Solução reveladora: Na₂CO₃ 30%, formaldeído 37%, tiosulfato de sódio 50%;
- Solução stop: Metanol 50%, ácido acético 12%, formaldeído 37%.

Exclusão molecular

- 0,1% TFA;

- 5% TFA;
- 3% Acetonitrila;
- 60% Acetonitrila;
- 40% Acetonitrila, 0,1% ácido fórmico;
- Bicarbonato de amônio 50 mM;
- Detergente RapiGest SF 0,2%;
- DTT 100 mM;
- Iodoacetamida 300 mM;
- Tripsina 50 ng/μl.

Agregação Plaquetária

- Anticoagulante ACD: ácido cítrico 10 mM, citrato de sódio 85 mM, dextrose 111 mM;
- PGE₁;
- Solução Tyrode: NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, NaH₂PO₄.H₂O 3 mM, HEPES 10 mM, Glicose 5.6 mM, MgCl₂ 1 mM;
- Solução Tyrode + apirase, pH 6,2;
- Solução Tyrode + CaCl₂;
- Trombina 4,3 U/ml;
- Colágeno 107,5 μ/ml;
- Solução UNOPETTE: oxalato de Amônio, Timerosol.

Efeito de BjHK na interação leucócito-endotélio

- Anestésico: cloridrato de quetamina e xilazina.

Quantificação de proteína por Bradford

- Reagente de Bradford: comassie brilhante blue G-250, Etanol 95%, H₃PO₄ 85% (p/v).

3.1.4. Resinas

- DEAE-Celulose (Sigma, St. Louis, USA);
- Sepharose-4B-CNBr (GE Healthcare, United Kingdom).

3.1.5. Equipamentos

- Econo UV monitor (BioRad, California, USA); Registrador/Chart Recorder (BioRad, California, USA); Bomba peristáltica (GE Healthcare, United Kingdom); AggroLink (Chrobo-log corporation, USA); Espectrofluorímetro (Vitor3, Perkin Elmer, MA, USA); Espectrofluorímetro (Spectramax 190, Cambridge, England); Centrífuga 5810 R (Eppendorf, Hamburg, Germany).

3.2. Métodos

3.2.1. Coleta do sangue e obtenção do plasma

O animal foi mantido em cativeiro até o momento do procedimento, foi anestesiado com solução Tiopental sódico (30 mg/Kg), por via subcutânea. Injetou-se uma dose capaz de promover um estágio de anestesia profunda e duradoura (cerca de 3 horas), após 45 minutos da administração do anestésico (CHUDZINSKI et al., 1989).

O sangue foi colhido através de uma incisão longitudinal, de aproximadamente 5 cm, na região ventral próxima ao coração que permitiu a exposição da artéria aorta abdominal, a qual foi puncionada. O sangue colhido em seringas plásticas foi transferido para tubos plásticos contendo anticoagulante citrato de sódio 3,8% respeitando-se a proporção de uma parte desta solução para 9 partes de sangue e mantido em banho de gelo, durante o tempo necessário para processar a separação do plasma por centrifugação durante 15 minutos a 2000xg. O plasma separado foi alíquotado em tubos falcon contendo solução com inibidores (PMSF 1 mM, EDTA 1 mM, Tris-HCl 50 mM, NaCl 30 mM), congelados em álcool-gelo seco e mantidos a -80C°, até o momento do uso.

3.2.2. Cromatografia troca iônica

Utilizou-se 52 ml da resina DEAE-Celulose (Sigma) previamente hidratada em água destilada. Esta foi filtrada em filtro de placa porosa e ressuspensa em 2 volumes de coluna de NaOH 100 mM, NaCl 500 mM e deixada descansar por 10 minutos em temperatura ambiente. A seguir a resina foi filtrada e lavada em 2

volumes de coluna do mesmo tampão, esta etapa foi repetida sem o uso de NaOH. Procedeu-se mais uma lavagem com HCl 100 mM, NaCl 500 mM, quando terminado o procedimento a resina foi lavada com água destilada, até obter um pH 5,0 ou maior. Em seguida a resina foi lavada com 2 volumes de coluna de NaCl 1M e o pH ajustado para 7-8 com NaOH. Finalizando, colocou-se 2 volumes de coluna do tampão a ser utilizado na cromatografia (10 vezes concentrado) e em seguida um fluxo constante de no mínimo 5 volumes de coluna do tampão uma vez concentrado; verteu-se a resina em uma coluna plástica (22 x 1,5cm). A coluna foi equilibrada com tampão Tris-HCl 50 mM, pH 8,0 contendo EDTA 1 mM, PMSF 1 mM, NaCl 30 mM, com um fluxo constante de 18 ml/h, a 4 °C. Uma amostra de 12 ml de plasma diluído 1:2, contendo cerca de 200 mg de proteínas totais, foi aplicada á coluna. A cromatografia foi realizada a 4 °C e as frações foram recolhidas em um fluxo de 18 ml/h. O perfil protéico do efluente foi monitorado em espectrofotômetro (280 nm). Após a coleta do volume do efluente correspondente ao volume aplicado de plasma e ao volume da lavagem da coluna, pelo tampão de equilíbrio, até a redução dos valores da absorbância ($A_{280} < 0,05$), a eluição do material ocorreu pelo aumento crescente das concentrações de NaCl 30 mM, 100 mM, 200 mM e 300 mM.

3.2.3. Preparação da Resina de afinidade Carboximetil-papaína-Sepharose (CM-papaína Sepharose)

Foi dissolvido 50 mg de papaína em tampão fosfato de sódio 100 mM, L-cisteína.HCl 2 mM, EDTA dissódico 1 mM e DMSO 4%, pH 6,0. Essa solução permaneceu durante 20 minutos a temperatura ambiente (20-25 °C). Então, adicionou-se 10 mM ácido iodoacético, permanecendo em temperatura ambiente por mais 30 minutos para que ocorresse a carboximetilação da papaína de acordo com Anastasi e cols. (1983). Realizou-se uma diálise overnight 4 °C em tampão de bicarbonato de sódio 100 mM e Cloreto de sódio 500 mM, pH 8,3. No dia seguinte a solução foi centrifugada a 5000xg por 20 minutos (ANASTASI et al., 1983), o sobrenadante recolhido e o pellet desprezado. A papaína carboximetilada presente no sobrenadante foi quantificada espectrofotometricamente em comprimento de onda 280 nm para que fosse possível detectar a quantidade de papaína carboximetilada acoplada na resina Sepharose-4B-CNBr. A eficiência da

carboximetilação foi avaliada pela atividade residual da papaína sobre o substrato Z-FR-MCA.

A papaína carboximetilada foi acoplada à resina Sepharose 4B, ativada por brometo de cianogênio (CNBr). Adicionou-se 3 gramas de resina em pó em 200 ml de solução ácida HCl 150 mM, NaCl 500 mM, pH 2,0. Esta mistura permaneceu por 15 minutos a temperatura ambiente para que a resina fosse hidratada, no final desse tempo obteve-se um volume de 10 ml de resina. Lavou-se a resina com 100 ml de solução bicarbonato de sódio 100 mM, NaCl 500 mM, pH 8,3 em funil de placa porosa. A resina foi ressuspensa no menor volume possível e então adicionou-se a papaína carboximetilada (2 ml da solução contendo papaína carboximetilada 2,7 mg/ml) em 9 ml de resina. Essa mistura permaneceu à temperatura ambiente por 4 horas sob agitação lenta e por mais 16 horas a 4 °C. Filtrou-se a mistura em funil de placa porosa acompanhando-se espectrofotometricamente, em comprimento de onda 280 nm, o conteúdo protéico do filtrado. A quantidade do material não acoplado foi estimada, tendo a média de ligação de aproximadamente 95%.

A resina foi lavada em 100 ml de tampão bicarbonato de sódio 100 mM, NaCl 500 mM, pH 8,3, para a retirada do excesso de ligantes. Em seguida a resina foi lavada com 100 ml de tampão Tris-HCl 100 mM, pH 8,0, permanecendo nesse mesmo tampão em repouso por no mínimo 2 horas para que ocorresse o bloqueio de qualquer atividade de grupos remanescente.

3.2.4. Cromatografia de afinidade

Para a cromatografia de afinidade utilizou-se 6 ml da resina CM-papaína Sepharose, equilibrada com tampão Tris-HCl 100 mM, pH 7,0. O plasma (diluído 1:2, com o mesmo tampão) ou o efluente obtido da cromatografia de troca iônica, com atividade inibitória sobre a papaína, foi misturado à resina e deixado à temperatura ambiente sobre agitação lenta, por aproximadamente 1 hora. A suspensão a seguir foi lavada exaustivamente com o tampão de equilíbrio, até que as leituras de absorvância fossem desprezíveis ($A_{280} < 0,05$). O material acoplado à resina foi eluído por acidificação com KCl-HCl 500 mM, pH 2,0. Frações foram colhidas de 1 ml, as quais foram imediatamente neutralizadas com 50µl de tampão Tris-HCl 1 M, pH 8,0.

3.2.5. Quantificação de proteínas

As concentrações de proteínas foram determinadas pelos seguintes métodos:

O perfil protéico das frações foi determinado por espectrofotometria (Ultospec 2100 pro) com comprimento de onda 280 nm. Posteriormente, as amostras contendo proteína foram agrupadas e quantificadas pelo método de Bradford em microplaca de 96 poços – foi realizada para cada experimento uma curva padrão variando de 0,0625 mg/ml a 1,5 mg/ml de albumina bovina. Colocou-se 5 µl dos padrões, branco e das amostras, adicionou-se 195 µl do reagente de Bradford e homogeneizou-se a mistura por 30 segundos. Incubou-se à temperatura ambiente e no abrigo de luz por 45 minutos. O registro da reação foi realizado no aparelho Spectramax 190 utilizando-se comprimento de onda de 450 nm e 590 nm. Após leitura foi utilizada a razão 590 nm/450 nm para aumentar a sensibilidade do método. A análise dos resultados foi realizada no programa SoftMax Pro 4.8 (ZOR; SELINGER, 1996).

3.2.6. Inibição da hidrólise do substrato Z-FR-MCA por inibidor de cisteíno-peptidase

Os substratos utilizados foram acoplados a peptídeos que contêm a sonda fluorescente 7-amino-4metilcumarina (MCA). Estes quando hidrolisados apresentam um espectro de absorção e emissão diferentes daqueles da 7-amino-4 metilcumarina (MCA) ligados aos peptídeos. O fator limitante no uso destes substratos é de permitir o estudo da especificidade dos subsítios S (nomenclatura de Schechter e Berger, 1967). Esta restrição deve-se ao fato da fluorescência aparecer somente quando ocorre a hidrólise da ligação X-MCA (X = diferentes aminoácidos) e liberação do produto MCA fluorescente. O uso do substrato fluorescente Z-Phe-Arg-MCA (Z-FR-MCA) (Figura 5), tem sido amplamente difundido devido à alta sensibilidade do método de dosagem do produto fluorescente 7-amino-4-metilcumarina (BARRETT; KIRSCHKE, 1981).

O aumento da fluorescência é, portanto, proporcional ao número de moléculas do substrato clivado pela protease, permitindo assim o monitoramento direto da velocidade de sua hidrólise em espectrofluorofotômetro.

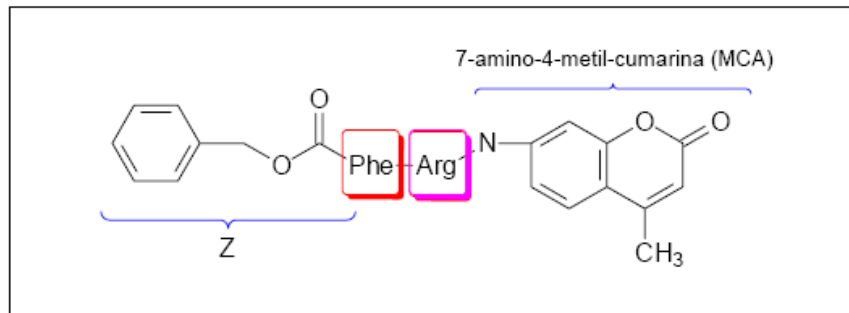


Figura 5 – Estrutura do substrato comercial Z-FR-MCA, onde Z = carbobenzoí, Phe = fenilalanina, Arg = arginina e MCA = 7-amino-4-metil-cumarina.

Deixou-se a papaína (0,1 µg) ser ativada em tampão Fosfato de Sódio 400 mM, EDTA 4 mM, DTT 8 mM, pH 6,8. Em seguida adicionou-se a B_jHK (1,0 µg) e incubou-se a mistura durante 10 minutos a 37°C. Adicionou-se o substrato Z-FR-MCA (4,0 µg) e seguiu-se a leitura em espectrofluorímetro (Vitor3, Perkin Elmer) utilizando-se microplacas e mantendo-se a temperatura da reação em 37 °C, sob comprimento de onda $\lambda_{exc} = 380 \text{ nm}$ e $\lambda_{em} = 460 \text{ nm}$, respectivamente, com um número de 10 repetições e intervalos de 30 segundos entre as repetições, energia da lâmpada 800W.

3.2.7. Cinética de inibição da papaína

Para a realização da cinética de inibição da papaína (0,1 µg) foram utilizadas duas concentrações do substrato Z-Phe-Arg-MCA (Z; benzoil, MCA; metilcumarina) correspondentes a 5 e 10 µM. A proteína B_jHK, obtida após cromatografia de afinidade, foi utilizada em quatro concentrações: 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 µg para cada uma das concentrações de substrato utilizadas. Inicialmente, foi realizada a pré-incubação da papaína com a B_jHK por 15 minutos a 37 °C em tampão fosfato de sódio 400 mM, EDTA 4 mM, DTT 8 mM, pH 7,5. Após a incubação, o substrato foi adicionado e seguiu-se leitura em espectrofluorímetro (Victor3, Perkin Elmer) utilizando placas de 96 poços e a temperatura da reação foi mantida a 37 °C em compartimento termoestabilizado, sob agitação. O espectrofluorímetro foi ajustado para leitura de excitação e emissão em 380 e 460 nm, respectivamente. Os dados cinéticos para as medidas de atividade proteolítica foram determinadas a partir das

velocidades iniciais de hidrólise (consumo de substrato inferior a 10%, cinética de ordem zero) e os cálculos envolvendo os parâmetros cinéticos (K_i) foram realizados utilizando a equação descrita por Dixon no programa Grafit para Windows 5.0 (LEATHERBARROW, 1992). O mecanismo de inibição também foi determinado através de gráficos $1/V \times [I]$ (plotagem de Dixon).

3.2.8. Eletroforese em gel de poliacrilamida

A análise estrutural das proteínas foi realizada por eletroforese em gel de poliacrilamida – SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulphate – Polyacrilamide Gel Electrophoresis), segundo protocolos descritos por Laemmli (1970) e Sambrook, Fritsch e Maniatis (1989). Utilizou-se concentração de 5% no gel de concentração e 12% no de separação. As amostras foram aplicadas diretamente no gel sob condições desnaturantes e redutoras. As amostras foram preparadas em uma mistura de tampão de amostra contendo SDS e β -mercaptoetanol, aquecidas durante 5 minutos a 95°C . Posteriormente, foi realizada a eletroforese em uma cuba contendo tampão de corrida tris/glicina/SDS, sob corrente de 15 mA/gel, em temperatura ambiente, por aproximadamente 2 horas. Utilizou-se a coloração por prata onde o gel foi fixado em solução stop mais formaldeído durante 30 segundos no microondas, lavou-se o gel em etanol 30% durante 30 segundos no microondas mais 5 minutos em temperatura ambiente, lavou-se com tiosulfato de sódio 50% e deixou mais 30 segundos no microondas e agitou-se durante 2 minutos em temperatura ambiente, lavou-se com água destilada e mais 30 segundos no microondas mais agitação durante 2 minutos em temperatura ambiente, incubou-se por 10 minutos em solução de AgNO_3 , lavou-se com água destilada e em seguida revelou-se com solução de Na_2CO_3 20% parando a reação com solução stop (BLUM; BEIER; GROSS, 1987).

3.2.9. Exclusão molecular

A fração que saiu da cromatografia de troca iônica com capacidade de inibir cisteíno-peptidase, contendo 4 bandas, foi submetida a filtração utilizando membrana de exclusão de 100 kDa (Millipore). A amostra foi colocada no filtro e

centrifugada lentamente obtendo-se duas frações, uma ficou retida na membrana, a qual denominamos de fração maior (contendo duas bandas), e a que passou pela membrana, fração menor (contendo outras duas bandas). Em seguida enviamos o material para análise por espectrometria de massas.

3.2.10. Espectrometria de massas

As amostras foram dessalinizadas em um sistema de HPLC Shimadzu composto por duas bombas LC-10ADvp, um amostrador SIL-10AF com resfriador de amostra, um detector espectrofotométrico SPD-10^a, um forno de colunas CTO-10AVvp controlados por um módulo SCL-10Avp. Antes da injeção, foi adicionado TFA de forma a obter-se a concentração de 0,1% desse ácido. A coluna de dessalinização foi uma coluna C4 de 5 µm, porosidade de 300 Å e dimensões de 3x4 mm. A condição cromatográfica foi inicialmente de 3% de acetonitrila com 0,1% de TFA a 1 ml/min por 2 minutos. A seguir a proporção de acetonitrila foi elevada a 60% em 0,5 minutos e mantida nessa composição por 1,5 min. As frações eluídas entre 2,7 e 3,1 minutos foram coletadas em tubos de polipropileno de 1,5 ml e concentradas por speed-vac.

Os resíduos foram dissolvidos em 50 µl de água e 50 µl de solução bicarbonato de amônio 50 mM. A seguir foram adicionados 25 µL do detergente RapiGest SF a 0,2% e a solução obtida foi aquecida a 80 °C por 15 minutos. A amostra foi centrifugada e 2,5 µL de ditiotreitol a 100mM foram adicionados. A amostra foi incubada a 60°C por 30 minutos e ao final novamente centrifugada. A seguir foram adicionados 2,5 µL de iodoacetamida a 300 mM e a amostra foi mantida no escuro durante 30 minutos. Junto à mistura resultante adicionou-se 10 µL de tripsina a 50 ng/µL (Promega Sequencing Grade) em tampão bicarbonato de amônia a 50 mM. A amostra foi digerida a 37 °C por 16 horas. Após a digestão, foram adicionados 10 µL de ácido trifluoroacético a 5% e a mistura foi agitada por vórtex. As amostras foram incubadas a 37 °C por 90 minutos e ao final desse período centrifugadas a 9.408xg a 6 °C por 30 minutos. Os sobrenadantes foram transferidos para frascos Total Recovery da Waters.

As análises quantitativas foram efetuadas em sistema composto por um nanoUPLC NanoAcquity e um espectrômetro de massas em tandem híbrido Q-TOF

Synapt MS (Waters). A separação cromatográfica foi efetuada por meio de um gradiente binário de 3 a 40% de acetonitrila com 0,1% de ácido fórmico em água com 0,1% de ácido fórmico a um fluxo de 0,6 $\mu\text{L}/\text{min}$. A coluna de trapping foi um Symetry C18 5 μm de 20mm x 180 μm e a cromatográfica um nanoAcquity UPLC BEH130 1,7 μm de 10 cm x 100 μm . O tempo total da aquisição foi de 90 minutos. O espectrômetro de massas foi operado em nanoelectrospray no modo positivo com uma fonte do tipo NanoLockSpray. O espectrômetro foi calibrado com clusters formiato de sódio e a geometria do nebulizador foi ajustada com infusão de uma solução de GFP a 200 fmol/ μL em acetonitrila/água com 0,1% de ácido fórmico. O íon duplamente carregado de GFP foi também utilizado para lockmass. As aquisições foram feitas no modo de aquisição independente de dados (MSE) que alterna aquisições em baixa energia de colisão (3eV) com energias elevadas (15-50eV) aplicadas ao compartimento trap do dispositivo T-Wave. O MS profile do analisador quadrupolar foi ajustado de modo a impedir a transmissão abaixo de m/z 300. O analisador TOF foi operado no modo V com um poder de resolução da ordem de 10000 adquirindo a faixa de m/z 50-1990 por 1,5 segundos para cada ciclo de baixa e alta energia de colisão. A aquisição de lockmass foi feita a cada 30 segundos.

Os dados foram processados e deconvoluídos pelo ProteinLynxGlobal Server v.2.5.1. A identificação das proteínas foi obtida pelo mesmo software comparando com a biblioteca UniProtKB/Swiss-Prot completa (release 2012_02). A biblioteca foi randomizada “on-the-fly” durante a busca, usando um false positive rate de 4%. O número máximo de “missed cleavages” foi igual a 1 e as seguintes modificações foram incluídas na busca: carbamidometilação da cisteína (fixa), oxidação da metionina e acetilação da porção N-terminal (variáveis).

3.2.11. Agregação plaquetária

Para a obtenção de plaquetas lavadas, o sangue humano foi colhido em anticoagulante ACD (ácido cítrico 10 mM, citrato de sódio 85 mM, dextrose 111 mM), respeitando-se a proporção de 1 parte de ACD para 6 partes de sangue. Esse sangue foi centrifugado a 190xg por 20 minutos em temperatura ambiente e o plasma separado. No PRP (plasma rico em plaquetas) adicionou-se 12,5 μL de PGE1

para cada 10 ml de plasma. O PRP foi transferido para tubos e centrifugado durante 1 minuto a 6.702 x g. O sobrenadante foi desprezado, pois se tratava de PPP (plasma pobre em plaquetas), e o pellet ressuspenso em 1 ml de tampão Tyrode (NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, NaH₂PO₄.H₂O 3 mM, HEPES 10 mM, Glicose 5.6 mM, MgCl₂ 1 mM) sem CaCl₂, contendo apirase em pH 6,2. Foram acrescentados 2,5 µl de PGE1, centrifugando-se durante 1 minuto a 6.702xg. O sobrenadante foi desprezado e as plaquetas lavadas ressuspenso em tampão Tyrode com CaCl₂ realizando-se a contagem das plaquetas em câmara de Neubauer, utilizando a solução UNOPETTE (Oxalato de amônio, timerosol) para lisar as hemácias. Utilizamos CaCl₂ + Tyrode para a calibração do aparelho e como controle positivo utilizou-se plaquetas lavadas + Tyrode na presença de um dos seguintes agonistas: trombina (4,3 U/ml) ou colágeno (107,5 µg/ml), e como inibidor utilizamos a proteína BjHK (0,01 µg/µl). Os ensaios foram realizados no aparelho Agregômetro (AgroLink Chrobo-log corporation).

3.2.12. Efeito de BjHK na interação leucócito-endotélio

As interações leucócito-endotélio foram avaliadas por ensaio de microscopia intravital. O VBj (1 µg) foi incubado com ou sem BjHK (2 µg), durante 30 minutos a 37°C e, posteriormente, injetados no tecido subcutâneo da bolsa escrotal de camundongos. Após 2 ou 24 horas da injeção os animais foram anestesiados com uma associação de Cloridrato de Quetamina e Xilazina (8,3 mg e 3,3 mg / 100 g de peso corpóreo, respectivamente) e o cremaster foi exteriorizado e montado sobre uma placa com temperatura controlada (37°C), dotada de uma área transparente, através da qual o leito microvascular foi visualizado (BAEZ, 1973). Esta preparação foi montada em um microscópio (Zeiss Axioskop) equipado com uma câmera para captação de imagens (JVC TK-C600). As imagens foram transmitidas para um computador provido de um programa de análise de imagens (Kontron, KS 300). Os tempos 2 e 24 horas foram escolhidos após um estudo da cinética de alteração da interação leucócito-endotélio induzidas pelo VBj e mostraram ser apropriados para a análise diferencial de células aderidas (2 horas) e migradas (24 horas) (ZYCHAR et al., 2010).

Uma a três vênulas pós-capilares foram selecionadas aleatoriamente (diâmetro entre 20-40 μm , e comprimento de pelo menos 100 μm) e observadas em cada animal.

Após 10 minutos, tempo necessário para estabilização dos vasos após a exposição da microcirculação, os leucócitos aderidos e migrados foram contados durante 5 minutos. Os leucócitos aderidos – células que permaneceram estáticas nos vasos por mais de 30 segundos, foram contados ao longo dos 100 μm do segmento vascular. Os leucócitos emigrados foram avaliados pela contagem das células presentes em uma distância de até 50 μm da região perivascular em um segmento de 100 μm . Nos dois casos os resultados foram expressos pela média de células presentes em 3 segmentos vasculares de cada animal.

3.2.13. Análises estatísticas

Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média e analisados estatisticamente por análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de Duncan. Foram considerados significativos os resultados com $p < 0,05$ (5%).

4. RESULTADOS

4.1. Purificação da proteína BjHK

O processo de purificação da BjHK, a partir do plasma de *Bothrops jararaca*, foi realizado essencialmente em duas etapas, uma cromatografia de troca-iônica em DEAE-Celulose e uma cromatografia de afinidade em CM-Papaína Sepharose, isoladas ou combinadas.

A figura 6 representa o volume recolhido da eluição das proteínas e do material com atividade sobre a papaína que foram obtidos do plasma da serpente *Bothrops jararaca*, cromatografado em coluna de DEAE-Celulose. Os picos 1, 2, 3 e 4 correspondem a frações eluídas em tampão de equilíbrio 30 mM NaCl, 100 mM NaCl, 200 mM NaCl e 300 mM NaCl, respectivamente. Realizou-se a troca de um tampão pelo outro quando a absorbância foi igual a zero. A fração contendo BjHK foi eluída em tampão 300 mM NaCl.

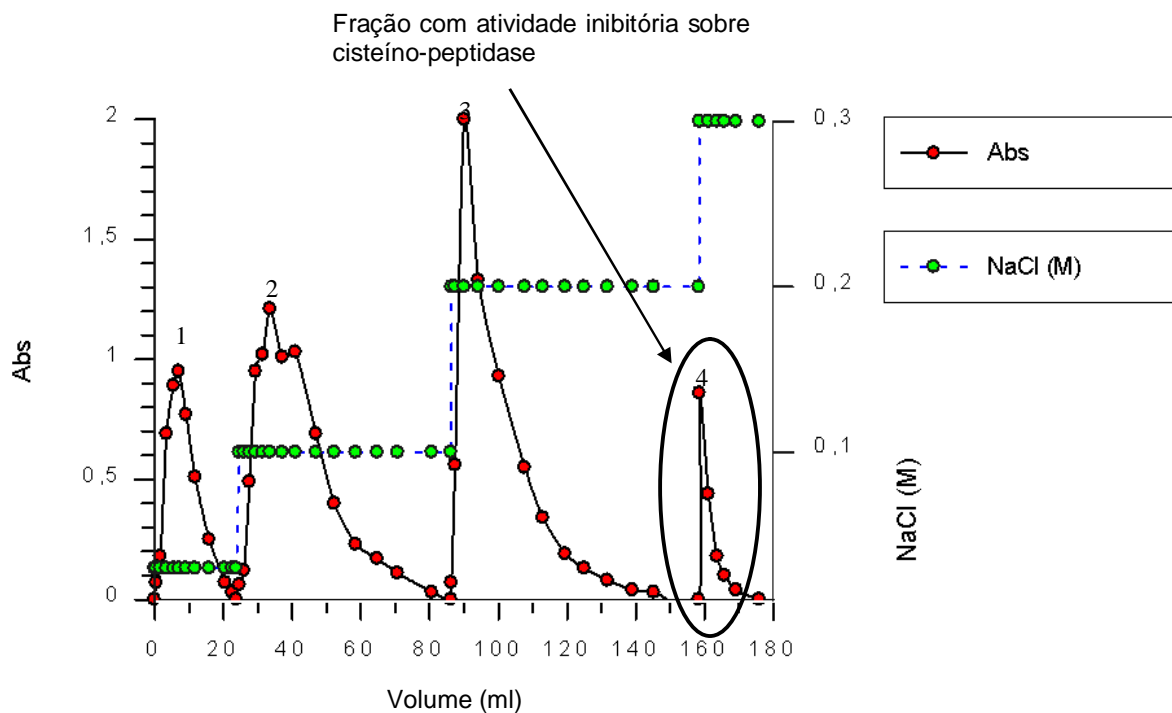


Figura 6 – Perfil cromatográfico de troca iônica do plasma de *Bothrops jararaca*, em coluna DEAE Celulose. No eixo y tem-se absorbância (280nm) (lado esquerdo) e concentração de NaCl (lado direito); no eixo x, volume em mililitros.

A proteína BJHK é um potente inibidor de cisteíno-peptidase (CHUDZINSKI et al., 1989). Desse modo, foi avaliada a atividade inibitória do plasma e de suas frações sobre a papaína. As frações foram obtidas na etapa descrita anteriormente. Ao testarmos o plasma, não foi observada atividade inibitória sobre a papaína. As frações eluídas em 100 mM e 200 mM de NaCl também não apresentaram inibição sobre a cisteíno-peptidase. No entanto, a fração eluída em 300 mM de NaCl apresentou inibição detectável como pode ser visualizado na tabela 1.

Tabela 1 - Atividade inibitória das frações sobre a papaína

Atividade específica (UF/min)		Inibição (%)
Papaína	3883	-
Papaína + plasma	3880	-
Papaína + 100 mM	3882	-
Papaína + 200 mM	3879	-
Papaína + 300 mM	2524	35

Condições de ensaio: Utilizou-se 0,1 µg de papaína, 5 µM de Z-FR-MCA e 3 µl do Plasma; 3 µl da fração 100 mM; 3 µl da fração 200 mM; 3 µl da fração 300 mM, em tampão fosfato de sódio 400 mM, contendo NaCl 20 mM e DTT 8 mM, 4 mM EDTA pH 6,8. Após 10 minutos de pré-incubação a 37 °C da papaína contendo as frações adicionou-se o substrato. A fluorescência foi determinada a cada 30 segundos por 10 minutos.

Combinando-se os dois procedimentos cromatográficos, troca iônica e afinidade, o inibidor de cisteíno-peptidase do plasma da *B. jararaca* eluído da coluna de DEAE-Celulose foi recromatografado em CM-papaína Sepharose conforme descrito por Chudzinski e cols. (1989). A solução eluída em 300 mM NaCl foi aplicada em resina CM-papaína Sepharose. Seguindo-se de lavagem da resina, com eluição do material não retido pela coluna de afinidade. Obteve-se um único pico da proteína com atividade inibitória sobre a papaína, o qual foi eluído por acidificação, conforme ilustrado na figura 7.

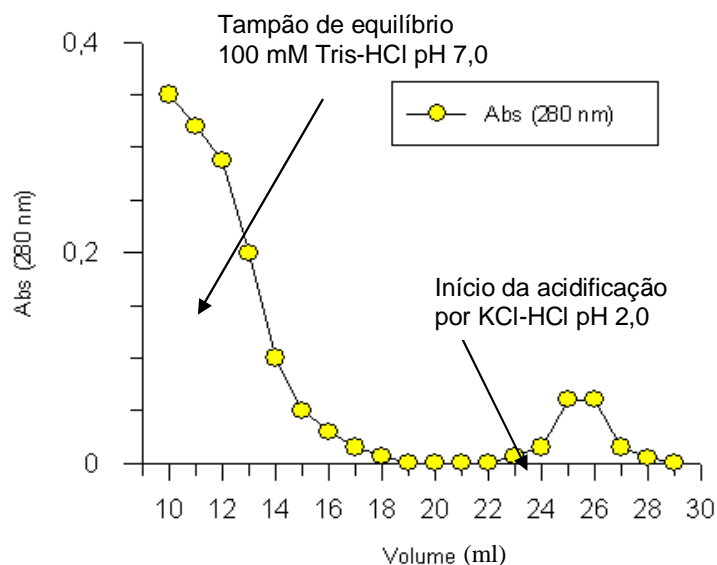


Figura 7 – Perfil da cromatografia de afinidade em resina Carboximetil-papaína Sepharose.

4.2. Tabela de rendimento da cromatografia

A tabela 2 resume os resultados obtidos da purificação cromatográfica do inibidor de cisteíno-peptidase presente no plasma de *Bothrops jararaca* utilizando duas etapas de cromatografia independentes, a troca iônica e a afinidade.

Tabela 2 – Rendimento da purificação da BjHK, a partir do plasma da *Bothrops jararaca*.

Material	Volume ml	Proteína Total mg (1)	Proteína mg/ml (2)	Atividade Específica (U/mg) (3)	Rendimento %	Purificação
Plasma	15.0	352	23.45			
DEAE Celulose	18.0	23.4	1.3	65	100	1
CM papaína Sepharose	6.0	2.4	0.4	18	28	2.3

(1) Proteína total mg/ml x Volume ml

(2) Proteína total mg/Volume ml

(3) Uma unidade de atividade específica é a quantidade de inibidor capaz de bloquear 50% da atividade da papaína.

4.3. Análise da proteína BjHK por eletroforese em gel de SDS-PAGE

Na análise eletroforética em gel SDS-PAGE 12%, aplicamos a amostra do plasma da serpente *Bothrops jararaca*, fração 300 mM NaCl da cromatografia de troca iônica, proteína eluída da cromatografia de afinidade após passar pela cromatografia de troca iônica e proteína eluída direto da cromatografia de afinidade todas utilizando agente redutor (poços 1 – 4). Repetiu-se o mesma sequência no entanto sem a utilização do agente redutor (poços 5 – 8). Todas as amostras foram aplicadas numa quantidade de 2 µg (figura 8).

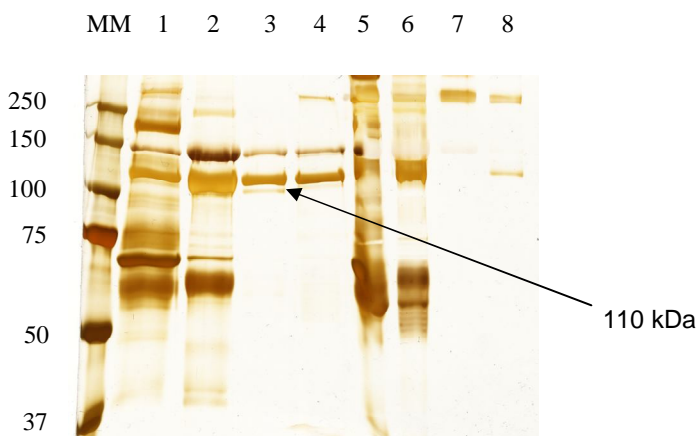


Figura 8 – Eletroforese em SDS-PAGE 12%, corado por prata, onde tem-se:

- Linha 1:** Plasma de *Bothrops jararaca* com redutor (2µg)
- Linha 2:** Fração 300 mM da cromatografia de troca iônica com redutor (2 µg)
- Linha 3:** BjHK purificada com redutor - cromatografia de afinidade (2 µg)
- Linha 4:** BjHK purificada com redutor – direto/cromatografia de afinidade (2 µg)
- Linha 5:** Plasma de *Bothrops jararaca* sem redutor (2µg)
- Linha 6:** Fração 300 mM da cromatografia de troca iônica sem redutor (2 µg)
- Linha 7:** BjHK purificada sem redutor - cromatografia de afinidade (2 µg)
- Linha 8:** BjHK purificada sem redutor – direto/cromatografia de afinidade (2 µg)

4.4. Teste de atividade inibitória sobre cisteíno-peptidase

Realizou-se o ensaio em tampão 400 mM fosfato de sódio, 4 mM EDTA, 8 mM DTT, pH 6,8, a 37 °C, utilizando o substrato Z-FR-MCA e a cisteíno-peptidase papaína como controle positivo. Quando utilizado a papaína na ausência da proteína, a unidade de fluorescência foi crescente. Na presença da BjHK verificou-se a diminuição dessa fluorescência, o que comprova a inibição da cisteíno-peptidase pela BjHK, que correspondeu a 82%. O aumento da fluorescência foi monitorado no espectrofluorofotômetro de leitura em placas e os valores de fluorescência gerados foram quantificados a cada 30 segundos durante 15 minutos. A placa de leitura foi agitada no espectrofluorofotômetro durante 2 segundos a cada leitura. A BjHK, com uma concentração de 1 µg, foi capaz de inibir a atividade enzimática da papaína (0,1 µg) em relação ao substrato sintético em 82%. A tabela 3 exemplifica o exposto.

Tabela 3 – Atividade inibitória da BjHK sobre a papaína

Atividade específica (UF/min)		Inibição (%)
Papaína	Papaína + BjHK	82
3054,1	531,8	

Condições de ensaio: Foram utilizados 0,1 µg de papaína, 5 µg de Z-FR-MCA e 1 µg de BjHK em tampão fosfato de sódio 400 mM, contendo NaCl 20 mM e DTT 8 mM, 4 mM EDTA pH 6,8. Após 10 minutos de pré-incubação a 37 °C da papaína e da BjHK foi adicionado o substrato. A fluorescência foi determinada a cada minuto por 15 minutos.

4.5. Cinética da inibição da papaína

Os resultados indicam que o mecanismo de inibição da papaína pela proteína BjHK seja competitivo, uma vez que as retas obtidas apresentaram intercepto simples no segundo quadrante (figura 9). O valor da constante de inibição

determinada é de 0,38 μg ($K_i = 0,38 \mu\text{g}$) e pôde ser calculado após a visualização ampliada da área do intercepto (figura 10).

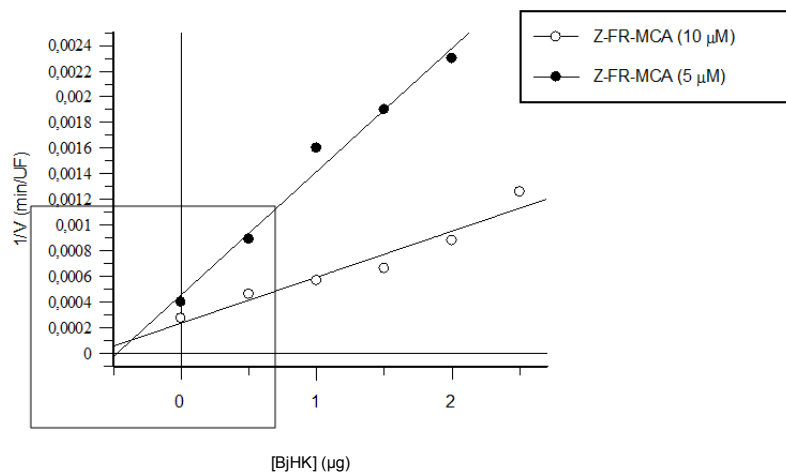


Figura 9 – Dixon plot ($1/V \times [BjHK]$) utilizando papaína e Z-FR-MCA como substrato

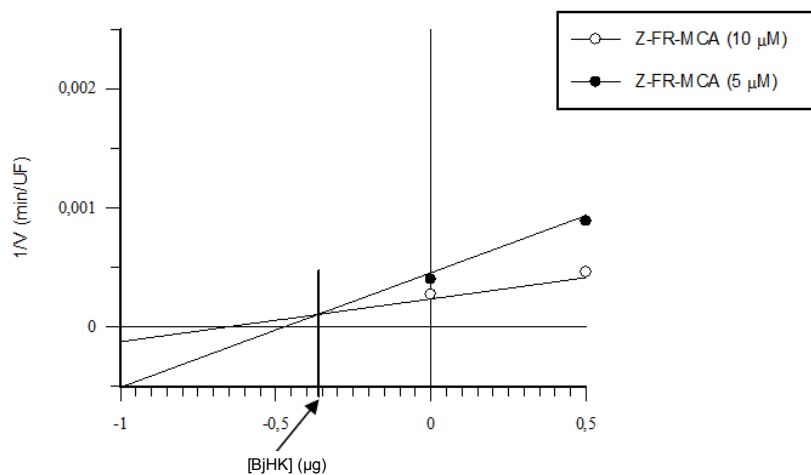


Figura 10 – Valor da constante de inibição (K_i) é o valor obtido com o rebatimento do intercepto das curvas no eixo X ($K_i = 0,38 \mu\text{g}$)

4.6. Resultados da espectrometria de massa

Iniciou-se os estudos de espectrometria excisando do gel SDS-PAGE as bandas de massas de 110 kDa e 130 kDa e submetendo-as a tripsinização (“peptide mass fingerprinting”), no entanto não foi possível a realização da análise devido à supressão do sinal por algum interferente. Em vista disso, resolveu-se utilizar a metodologia de exclusão molecular, para isso foi filtrada a amostra contendo o inibidor de cisteíno-peptidase eluída da cromatografia de troca iônica utilizando uma membrana de exclusão molecular de 100 kDa. Na amostra, as bandas com massa molecular superior a 100 kDa ficaram retidas e as moléculas com massas inferiores passaram pela membrana. Este procedimento resultou em duas frações: uma que foi concentrada pela membrana de exclusão molecular, a qual foi denominada de fração maior, contendo as bandas de 130 kDa e 110 kDa e outra contendo os componentes de menor massa, que foi denominada de fração menor, contendo uma banda de aproximadamente 70 kDa e outra de aproximadamente 60 kDa. Essas bandas em solução foram digeridas com tripsina e analisadas por espectrometria de massas em um instrumento do tipo Q-TOF, com a colaboração do Doutor Valdemir Melechco Carvalho do Laboratório de Pesquisa e Desenvolvimento do Grupo Fleury. Na tabela 4 pode-se observar o resultado da fração maior, mostrando homologia com a proteína BJ46a (UniProtKB/Swiss-Prot: Q9DGI0.1). A Figura 11 indica a cobertura de sequenciamento da proteína em estudo. O resultado obtido após análise da fração menor, mostrou apenas a presença da BJ46a além da presença de sequências para diversos contaminantes como a queratina. Uma vez que a fração maior apresentou um maior teor da proteína BJ46a, a mesma foi utilizada para a discussão dos resultados obtidos nas análises por espectrometria de massas.

Tabela 4 – Proteínas identificadas na fração maior

Accession	Entry	Description	mW (Da)	pI (pH)	PLGS Score	Peptides	Theoretical Peptides	Coverage %	Precursor RMS Mass Error (ppm)	Products	Digest Peptides	Modified Peptides	Products RMS Mass Error (ppm)	Products RMS RT Error (min)
FTE46_BOTJA	Q9DGI0	Antihemorrhagic factor BJ46a <i>Bothrops jaraca</i> 11	38754	5,72	15289,08	21	29	41.94	5.15	220	14	0	10,588	0,04151
FETCB_GLOBR	Q5KQS2	Antihemorrhagic factor cHLP B <i>Gloydium brevicaudus</i> 2 1 30S ribosomal protein S7	38479	6,00	2906,371	9	20	33.63	6.47	66	6	1	12,129	0,08065
RS7_MESSB	Q11HP8	Mesorhizobium so strain BNC1 rpsG 3 1 Antihemorrhagic factor HSF	17857	10,63	1920,218	6	11	26.28	12.22	35	4	1	14,828	0,05021
FETAF_PROFL	P29695	Protobothrops flavoviridis 1 2	38891	5,85	1322,014	11	24	18.42	4.51	40	6	1	11,407	0,03455

Q9DGI0 Coverage Map

1	MNSLVALVLL	GQIIGSTLSS	QVRGDLECDE	KDAKEWIDTG	VRYINEHKLH
51	GYKYALNVIK	NIVVVPWDGD	WVAVFLKLNL	LETECHVLDP	TPVKNCTVRP
101	QHNHAVEMDC	DVKIMFNVDI	FKEDVFAKCH	STPDSVENVR	RNCPKCPILL
151	PSNNPQVVDS	VEYVLNKHNE	KLSDHVYEVL	EISRGQHKYE	PEAYYVEFAI
201	VEVNCTAQEL	HDDHHHCHPN	TAGEDHIGFC	RATVFRSHAS	LEKPKDEQFE
251	SDCVILHVKE	GHAHSHLIQQ	HVEKDSISPE	HNNTALNFVH	PHNDTSTISHE
301	SHEHLAEVPV	AFVKKELPKD	ISDRHTIPVK	GCPGKVHHFE	I



Figura 11 – Cobertura parcial do sequenciamento da proteína BJ46a (FTE46_BOTJA) de *Bothrops jararaca*. A sequência foi obtida a partir dos dados depositados no UniprotKB/SwissProt e o diagrama de cobertura proteômica, pelo sistema Identity^E, da Waters. Marcado em azul temos regiões de peptídeos idênticos; em rosa, regiões de peptídeos com identidade parcial; em verde, regiões de peptídeos modificados e em amarelo, peptídeos modificados parcialmente. As cores utilizadas são transparentes, permitindo a visualização de regiões onde há sobreposição de peptídeos.

Nossos dados sugerem que a proteína B_jHK seja homóloga a proteína BJ46a com algumas diferenças em sua conformação. A proteína BJ46a possui uma massa molecular de 39 kDa, com 341 resíduos de aminoácidos. Desses, 53 são de carga negativa e seu pI é de 5,74. Análise feita no site <http://web.expasy.org/cgi-bin/protparam/protparam>.

Com o sequenciamento da B_jHK foi observado que essa proteína possui uma similaridade muito baixa com o cininogênio de mamíferos, assim como de aves, peixes e anfíbios. Esses também não possuem similaridade com o cininogênio de mamíferos (Tabela 5).

Tabela 5 – Porcentagem de homologia entre o cininogênio humano de alta massa molecular, de ave, anfíbio, peixe e BJ46a-BjHK

Proteína	Proteína	Homologia %
Humana	BJ46a-BjHK	12,1
Humana	Ave	20,4
Humana	Anfíbio	31,2
Humana	Peixe	24,1
BJ46a-BjHK	Ave	11,6
BJ46a-BjHK	Anfíbio	18,8
BJ46a-BjHK	Peixe	12,3
Ave	Peixe	16,6
Ave	Anfíbio	15,6

Humano (AAB59550.1) - Ave (galinha, Q7LZS0_CHICK) – Anfíbio (xenopus, Q5XKA7) – Peixe (lampreia B6D6L6_LAMJA) e a proteína BJ46a-BjHK (Q9DGI0.1).

Apesar da falta de homologia entre as sequências primárias da BJ46a-BjHK com os cininogênios apresentados na Tabela 5, outras regiões da proteína em estudo puderam ser sequenciadas por espectrometria de massas, indicando similaridades funcionais entre a BJ46a-BjHK e o cininogênio humano de alta massa molecular. Assim, pudemos identificar uma região da BJ46a-BjHK com 88 % de similaridade com a proteína, fetuína Habu Serum Factor (HSF) e 68% com a proteína fetuína de *Cavia porcellus* que fazem parte da família das cistatinas. Três peptídeos trípticos que compõem parte desta região da BJ46a-BjHK foram sequenciados por espectrometria de massas, como indicam as Figuras 12, 13 e 14. Essa similaridade corresponde a uma região composta por 33 resíduos de aminoácidos, sendo que a estrutura total compreende 362 resíduos de aminoácidos. A figura 17 mostra essa similaridade.

Além da fetuína, também foram encontradas na BJ46a-BjHK regiões que foram sequenciadas (Figuras 15 e 16) e que apresentam similaridades a dois peptídeos capazes de causar hipotensão que foram purificados a partir do plasma da *B. jararaca* (BARRETO et al, 2009). A Figura 18a mostra o alinhamento da região

da BJ46a-BjHK correspondente aos resíduos 154-157 e o hexapeptídeo NPFVDA, denominado fração 13. Podemos observar que o resíduo de glutamina (Gln, Q) não é encontrado na porção em discussão da BJ46a-BjHK, porém a homologia entre estas sequências é de 57%. Barreto e cols também purificaram e sequenciaram outro peptídeo do plasma de *B. jararaca* com ação hipotensora, denominado de fração 14. O alinhamento da região 242-258 da BJ46a-BjHK com esse peptídeo, composto por resíduos de aminoácidos, é mostrado na figura 18b e indica, novamente, a presença de um *gap* referente ao resíduo de lisina (Lys, K). Este alinhamento resultou em 21,4% de homologia.

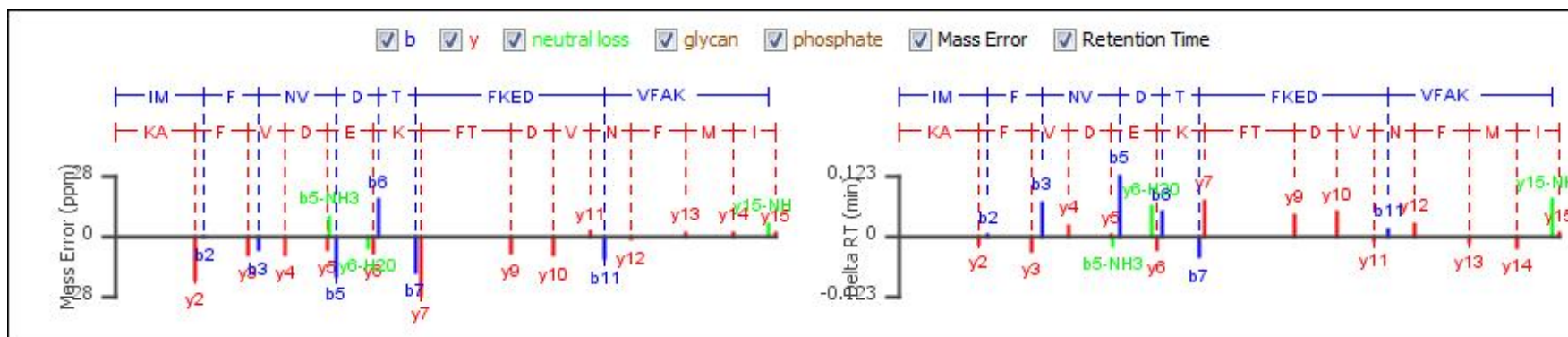


Figura 12 - Espectro de dissociação (reconstruído a partir de dados obtidos por aquisição por MS^E) do peptídeo tríptico IMFNVDTFKEDVFAK (114-128). Score: 8,30. Esquerda: erros de massas. Direita: variação de retenção cromatográfica. Peptídeo gerado por *missed cleavage* da tripsina.

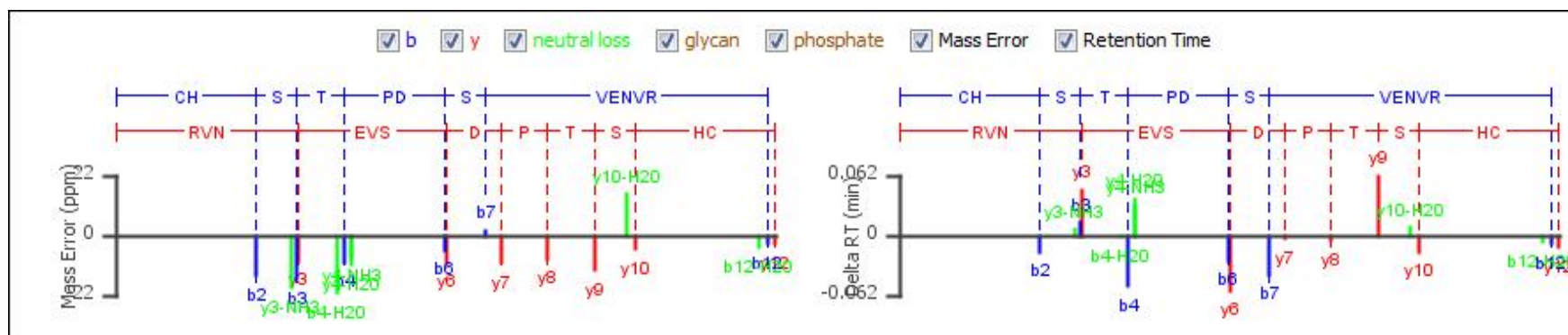


Figura 13 - Espectro de dissociação (reconstruído a partir de dados obtidos por aquisição por MS^E) do peptídeo tríptico CHSTPDSVENVR (129-140). Score: 8,24. Esquerda: erros de massas. Direita: variação de retenção cromatográfica.

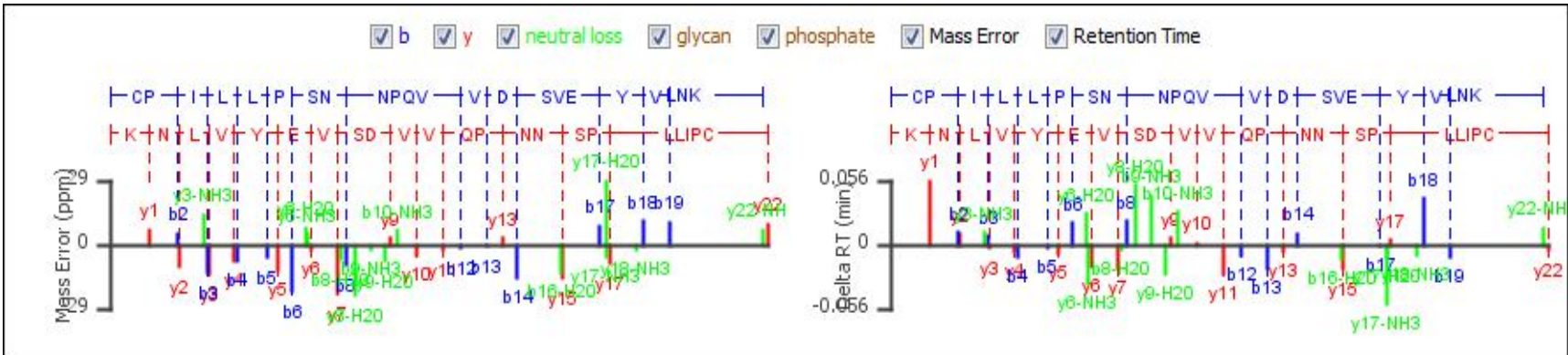


Figura 14 - Espectro de dissociação (reconstruído a partir de dados obtidos por aquisição por MS^E) do peptídeo tríptico CPILLPSNNPQVDSVEYVLNK (146-167). Score: 7,78. Esquerda: erros de massas. Direita: variação de retenção cromatográfica. Peptídeo gerado por *missed clivage* da tripsina

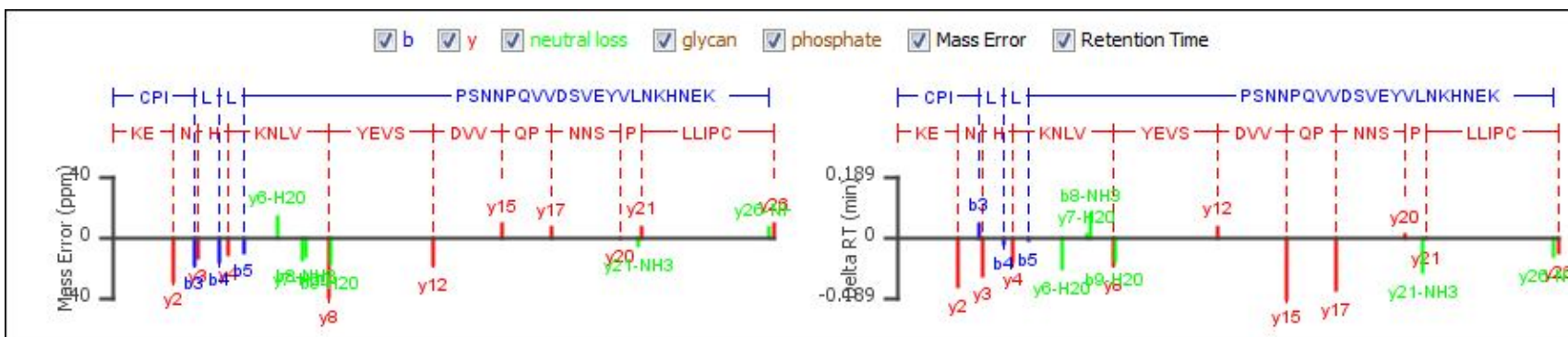


Figura 15 - Espectro de dissociação (reconstruído a partir de dados obtidos por aquisição por MS^E) do peptídeo tríptico CPILLPSNNPQVVDSVEYVLNKHNEK (146-167). Score: 8,54. Esquerda: erros de massas. Direita: variação de retenção cromatográfica. Peptídeo gerado por *missed cleavage* da tripsina

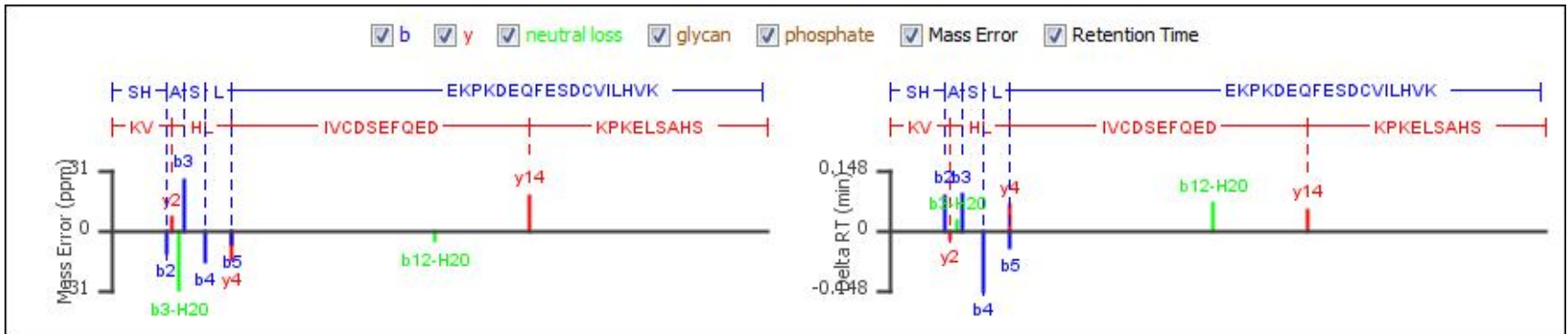


Figura 16 - Espectro de dissociação (reconstruído a partir de dados obtidos por aquisição por MS^E) do peptídeo tríptico SHASLEKPKDEQFESDCVILHVK (237-259). Score: 7,68. Esquerda: erros de massas. Direita: variação de retenção cromatográfica. Peptídeo gerado por *missed clivage* da tripsina

Bj46a	125	VFAKCHSTPDSVENVRRNCPKCPILLPSNNPQVV	158
HSF	125	VFVKCHSTPDSVENVRRNCSKCPILLPPNPHVV	158
<i>C. porcellus</i>	128	VFAKCESTPDSREDVRKVCPQCPLLLTPVNNTKVV	161
		.*.*******:***:*.:**:* **.*:**	

Figura 17 – Alinhamento das sequências primárias das proteínas BJ46a-BjHK, HSF (P29695.2) e *Cavia porcellus* (NP 001166384). Os aminoácidos idênticos estão indicados por um asterisco (*), enquanto os aminoácidos semelhantes estão indicados pelo sinal (:), e os aminoácidos que diferem em suas classes estão indicados pelo sinal (.).

A			
BjHK	154	NPQVVDS	157
Fração 13		-NP-FVDA-	
		.*:	
B			
BjHK	242	EKPKDEQFESDCVIL	258
Fração 14		SKP-NMSDESLAVAI	
		.**:.***.*:	

Figura 18 A e B – Alinhamento das sequências primárias de duas regiões da proteína BJ46a-BjHK sobre dois peptídeos com ação hipotensora denominados fração 13 e fração 14. Os aminoácidos idênticos estão indicados por um asterisco (*), enquanto os aminoácidos semelhantes estão indicados pelo sinal (:), e os aminoácidos que diferem em suas classes estão indicados pelo sinal (.).

A última região analisada da BJ46a-BjHK compreende os resíduos 201 – 225 e apresenta homologia com a região C-terminal da proteína murina S100A9. Esta proteína apresenta homologia com porções do domínio 5 do cininogênio de alta massa molecular humano e propriedade inibitória sobre metaloproteínase, assim como a BJ46a-BjHK (figura 19). Esta região não foi coberta no sequenciamento por espectrometria de massas.

```

BjHK          201 AQELHDDHHHCHPNTAGED 225
HK            488 GHVLDHGHHKHKHGHHGKH 506
S100A9       96  HEKLENNPRGHGHSHGKG 110
              . * . . . : : * : * :

```

Figura 19 – Alinhamento das sequências primárias de duas regiões da proteína BJ46a-BjHK sobre uma região da porção C-terminal da proteína S100A9 (NP_033140) e cininogênio humano de alta massa molecular, HK (GenBank: AAB59550.1). Os aminoácidos idênticos estão indicados por um asterisco (*), enquanto os aminoácidos semelhantes estão indicados pelo sinal (:), e os aminoácidos que diferem em suas classes estão indicados pelo sinal (.).

4.7. Ação da BjHK sobre a agregação plaquetária

A BjHK na concentração de 0,01 µg/µl promoveu uma inibição de aproximadamente 23% sobre a agregação plaquetária induzida por trombina, porém não foi capaz de inibir a agregação induzida por colágeno. Estudos mostram que o cininogênio humano inibe significativamente – 60 a 90% - a agregação induzida por trombina, mas não a agregação induzida por colágeno (Charvaskis et al., 2002; Puri et al., 1991). No entanto, os autores utilizaram concentrações maiores de cininogênio. Apesar de ser uma inibição aparentemente baixa, a BjHK foi capaz de inibir a agregação plaquetária (figura 20). A figura 21 mostra o ensaio com colágeno que não apresentou inibição.

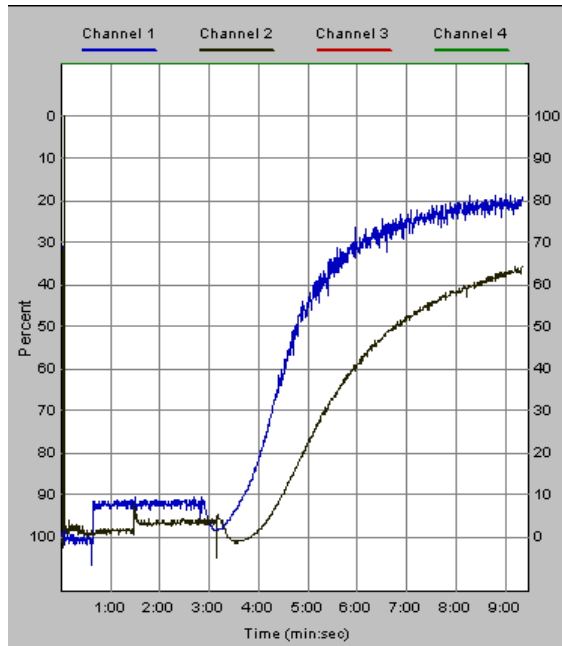


Figura 20 – Indução da agregação plaquetária (porcentagem x tempo). Uma alíquota no canal 1 contém plaquetas lavadas ($322 \times 10^9/L$), tampão e trombina (0,1 U/ml); no canal 2, plaquetas lavadas ($322 \times 10^9/L$), BjHK (0,01 $\mu g/\mu l$) e trombina (0,1 U/ml).

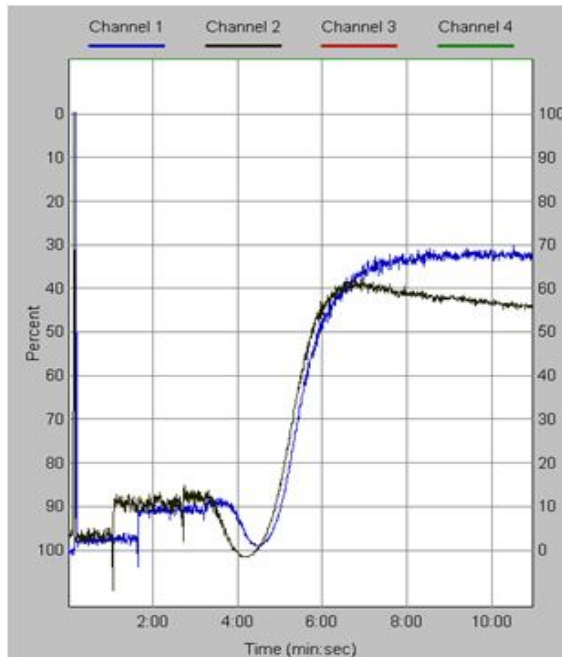


Figura 21 – Indução da agregação plaquetária (porcentagem x tempo). Uma alíquota no canal 1 contém plaquetas lavadas ($322 \times 10^9/L$), BjHK (0,01 $\mu g/\mu l$) e colágeno (2,5 $\mu g/ml$); no canal 2, plaquetas lavadas ($322 \times 10^9/L$), tampão e colágeno (2,5 $\mu g/ml$).

4.8. Efeito da BjHK na alteração de interação leucócito-endotélio induzidas por VBj na microcirculação do músculo cremaster de camundongos

O veneno de *Bothrops jararaca* (VBj) induziu um aumento significativo no número de leucócitos aderidos às células endoteliais e de leucócitos migrados para o espaço extravascular, 2 e 24 horas após a injeção (figuras 22 C, E), quando comparados com o grupo injetado com PBS (ZYCHAR et al., 2008, 2010).

Os grupos injetados apenas com BjHK não apresentaram alterações leucócito-endotélio, não diferindo do grupo controle, nos dois eventos avaliados (figuras 22 A, B). Os animais tratados com a mistura VBj + BjHK, pré-incubados por 30 minutos a 37°C, apresentaram uma diminuição nas alterações dos parâmetros da interação leucócito-endotélio, quando comparados ao grupo injetado apenas com o veneno sem incubação prévia de BjHK, nos dois tempos analisados (figuras 22 D, F; figuras 23 e 24).

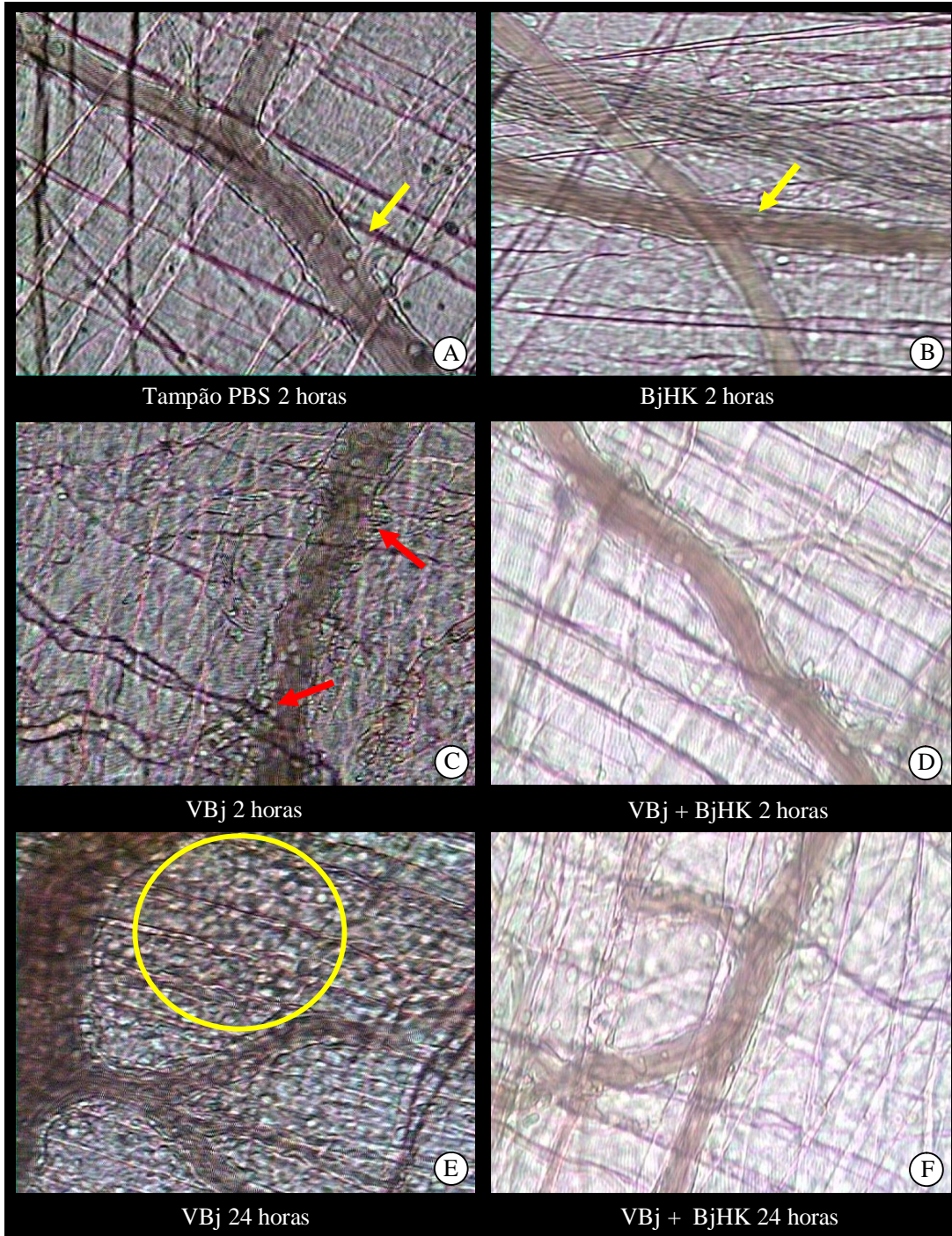


Figura 22 – Interação leucócito-endotélio em vênulas pós-capilares na microcirculação do músculo cremaster de camundongos após 2h e 24h da injeção de PBS ou VBj com e sem BjHK. Animais injetados com PBS 2h (A), BjHK 2h (B), VBj 2h (C), VBj + BjHK 2h (D), VBj 24h (E), VBj + BjHK 24h (F). Setas amarelas indicam leucócitos na microcirculação normal. Seta vermelha indica a presença de leucócitos aderidos a células endoteliais e dentro do círculo amarelo leucócitos migrados para o espaço extravascular.

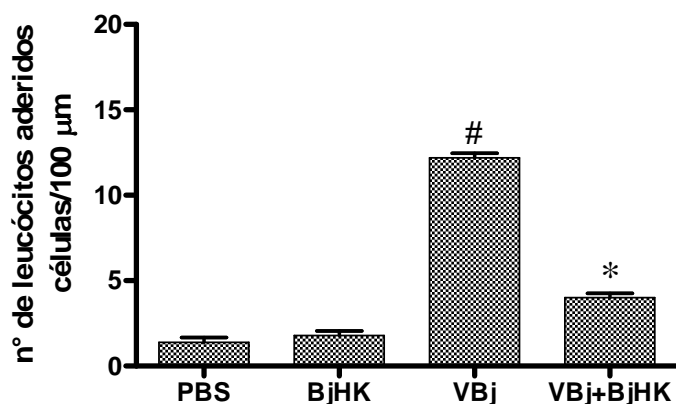


Figura 23 – Efeito da BjHK na alteração de interação leucócito-endotélio induzida por *VBj* na microcirculação do músculo cremaster de camundongos. Os animais foram injetados com *VBj* (1 μg/100 μL), BjHK (2 μg/100 μL), *VBj*+BjHK (1 μg+2 μg/100 μL) ou PBS (100 μL) no tecido subcutâneo da bolsa escrotal. Após 2h da injeção das toxinas o músculo cremaster foi exposto e os leucócitos aderidos foram analisados em vênulas pós-capilares na microcirculação de camundongos. Os resultados correspondem à média ± e.p.m. (n= 5 animais por grupo). * p<0,05 por comparação ao grupo PBS; # p<0,05 em comparação aos outros grupos.

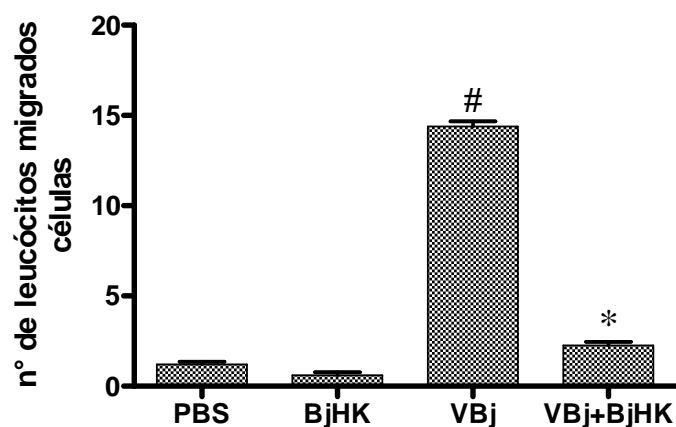


Figura 24 – Efeito da BjHK na alteração de interação leucócito-endotélio induzida por *VBj* na microcirculação do músculo cremaster de camundongos. Os animais foram injetados com *VBj* (1 μg/100 μL), BjHK (2 μg/100 μL), *VBj*+BjHK (1 μg+2 μg/100 μL) ou PBS (100 μL) no tecido subcutâneo da bolsa escrotal. Após 24h da injeção das toxinas o músculo cremaster foi exposto e os leucócitos migrados foram contados em vênulas pós-capilares na microcirculação de camundongos. Os resultados correspondem à média ± e.p.m. (n= 5 animais por grupo). * p<0,05 por comparação ao grupo PBS; # p<0,05 em comparação aos outros grupos.

6. DISCUSSÃO

A presença dos componentes do sistema calicreína-cinina varia em animais filogeneticamente distintos (ERDÖS et al., 1967; SEKI et al., 1973; CONLON, 1998). Esse sistema é composto pelo Fator XII e calicreína, além do cininogênio, que é o substrato da calicreína.

Em mamíferos, o Fator XII (fator de Hageman) presente no plasma, uma vez ativado pelo contato com superfícies carregadas negativamente, ativa a pré-calicreína em calicreína. Esta, por sua vez, cliva o cininogênio, liberando a bradicinina, que é degradada pela ação de cininases.

Vários estudos sobre o sistema calicreína-cinina em diferentes animais baseiam-se na formação de peptídeos (cininas) ativos sobre preparações farmacológicas utilizando útero de rata ou íleo de cobaia. Esses estudos tiveram como estratégia a geração destes peptídeos pelo contato do plasma desses animais com superfícies carregadas negativamente, como o vidro; ou pela ativação do plasma por proteases, como tripsina ou calicreína pancreática porcina, além da utilização de inibidores para avaliar a ação de proteases nas diferentes fases do processo de geração e degradação da cinina (SEKI et al., 1973).

Com essa estratégia, esses estudos descrevem que mamíferos apresentam os três componentes do sistema (Fator XII, pré-calicreína e cininogênio). Aves não apresentam Fator XII. Nos répteis, jacarés e tartarugas apresentam todos os componentes do sistema, porém as serpentes apresentariam apenas cininases. Em anfíbios e peixes, como nas serpentes, encontrou-se apenas cininases (SEKI et al., 1973). Apesar disso, algumas proteínas caracterizadas como cininogênios foram isoladas do plasma e da pele de alguns peixes (YLÖNEN et al., 1999). Do plasma de galinha isolou-se uma proteína de 74 kDa que induziu contração de musculatura lisa homóloga, a qual denominou-se ornitocinogênio (KIMURA et al., 1987).

Na serpente *Bothrops jararaca*, tanto o sistema calicreína-cinina quanto os sistemas de controle da hemostasia têm muitas particularidades (NAHAS et al., 1973; LAVRAS et al., 1979; NAHAS et al., 1981, CHUDZINSKI-TAVASSI et al., 1995). Inicialmente descrito como desprovido de Fator XII, pré-calicreína e cininogênio (LAVRAS et al., 1979), verificou-se que a ativação do plasma dessa

serpente por tripsina gerava um peptídeo ativo em oviduto de serpentes, mas não em preparações farmacológicas utilizadas para avaliação do sistema de mamíferos, indicando a presença de cininogênio no plasma dessa serpente (ABDALLA et al., 1989).

Chudzinski e cols. (1989) descreveram uma proteína isolada do plasma de *Bothrops jararaca*, cuja massa molecular foi estimada em 110 kDa, dotada de uma potente atividade inibitória sobre cisteíno-peptidase e capaz de liberar peptídeo(s) farmacologicamente ativos sobre musculatura lisa homóloga. Por essas características, os autores a relacionaram ao cininogênio de mamíferos que faz parte da família das cistatinas, porém não obtiveram informações sobre a estrutura molecular dessa proteína, sendo esse o principal objetivo do presente trabalho.

Posteriormente, verificou-se que essa proteína denominada BjHK, assim como o cininogênio de alta massa molecular (CAMM) isolado do plasma humano, possuíam propriedade inibitória sobre metaloproteinases encontradas no veneno de serpentes *Bothrops jararaca* (GONÇALVES; CHUDZINSKI-TAVASSI, 2004).

A família das cistatinas é dividida em 3 tipos, a saber: o tipo 1, composto principalmente por proteínas intracelulares; o tipo 2 composto principalmente por proteínas extracelulares e o tipo 3, composto de proteínas do plasma (LEE et al., 2009).

Os membros do tipo 3 são glicoproteínas produzidas principalmente no fígado, os quais são encontrados em altas concentrações no plasma. No entanto, suas funções fisiológicas não estão bem claras (LEE et al., 2009). Encontram-se na família tipo 3 as fetuínas A/alfa 2-Heremans Schmid (AHSG), fetuínas B (FETUB) e glicoproteínas ricas em histidina (GRH), todas com 2 domínios tipo-cistatina, porém sem atividade inibitória sobre cisteíno-peptidases. Além destas, existe ainda uma cistatina do tipo 3, o cininogênio, que possui atividade inibitória sobre cisteíno-peptidases (LEE et al., 2009).

A BjHK possui uma massa de aproximadamente 110 kDa em gel SDS-PAGE. Quando submetida à análise por espectrometria de massas, detectamos uma proteína com massa molecular de aproximadamente 39 kDa. Os dados obtidos foram processados e a proteína identificada pelo software ProteinLynxGlobal Server v.2.3, comparando-se com a biblioteca UniProtKB, onde identificamos a presença de

hits para a proteína BJ46a isolada do soro da mesma serpente, descrita como um fator anti-hemorrágico por Valente e cols. (2001).

A BjHK e a BJ46a são purificadas por procedimentos completamente distintos. O fator anti-hemorrágico BJ46a foi isolado do soro da serpente *Bothrops jararaca* por precipitação com sulfato de amônio seguido por processos cromatográficos de interação hidrofóbica em phenil-sepharose e em fase reversa com coluna C4 Hi-Pore, em sistema de HPLC.

A purificação da BjHK baseia-se na propriedade inibitória dessa proteína sobre cisteíno-peptidase. Utilizamos o plasma dessa serpente, o qual foi misturado a um tampão contendo inibidores de proteases desde a fase de coleta do sangue. Esse plasma foi submetido a uma cromatografia de troca iônica em resina DEAE Celulose e a fração com atividade inibitória sobre papaína foi posteriormente submetida a uma cromatografia de afinidade em uma coluna Carboxi-Metil papaína Sepharose.

A BJ46a é uma proteína glicosilada com $pI = 4.55$, que apresenta uma massa molecular em gel SDS-PAGE de 55.4 kDa e 46 101 unidade de massa atômica (u.m.a.) por espectrometria de massas MALDI-TOF. Em gel filtração, a massa molecular da BJ46a é descrita como sendo de 79 kDa, indicando que em seu estado nativo essa proteína forma dímeros (VALENTE et al., 2001). Já a BjHK, em gel filtração, continua com a massa molecular estimada em 110 kDa. Porém, quando incubada com calicreína urinária apresentou em gel SDS-PAGE a presença de uma banda de 78 kDa (CHUDZINSKI et al., 1989).

A BjHK e a BJ46a possuem homologia entre seus resíduos de aminoácidos, porém algumas diferenças funcionais precisam ser melhor analisadas e explicadas.

Cabe ressaltar que, em nossos experimentos, as deconvoluções obtidas na espectrometria de massas mostram que o processo de digestão da BjHK por tripsina foi efetivo, uma vez que apenas peptídeos contendo resíduos de arginina ou lisina no C-terminal foram sequenciados.

Em relação aos outros cininogênios descritos em animais de diferentes filogenias, verificamos que tanto a BJ46a (BjHK) quanto os cininogênios descritos em peixes, aves e anfíbios apresentaram baixa similaridade entre si e com os cininogênios de mamíferos, incluindo o cininogênio humano.

Apesar da baixa similaridade com os cininogênios descritos, a BJ46a possui características comuns a essas proteínas. Apesar de descrita como um inivável inibidor de cisteíno-peptidase devido a importantes alterações nos sítios com o consenso de cistatinas (QXVXG), a BJ46a é classificada como sendo da superfamília das cistatinas tipo 3 (VALENTE et al., 2001). Todas as sequências de fetuína contem 12 resíduos de cisteína em posições idênticas às fetuínas encontradas em humanos e bovinos; é provável que a estrutura dissulfeto seja comum para todas as fetuínas (DZIEGIELEWSKA; BROWN, 1995). A única exceção é o Habu Serum Factor (HSF) que contem 13 cisteínas. A ligação dissulfeto padrão observada nas fetuínas sugere que 12 cisteínas são encontradas em ligações dissulfeto (YAMAKAWA, 1992).

A BJ46a tem apenas 12 cisteínas. Todas correspondem a posições de cisteína HSF, padrão típico de cisteínas observadas no grupo de proteína fetuína. Dessa forma tanto a HSF quanto a BJ46a apresentam grande grau de homologia com as fetuínas e fazem parte da superfamília das cistatinas.

Considerando que a BjHK e a BJ46a sejam a mesma proteína, fica evidente que a BjHK possui uma potente atividade inibitória sobre cisteíno-peptidase, uma vez que o processo de purificação da BjHK baseia-se nessa propriedade. No cininogênio humano esta propriedade inibitória está ligada a sítios QVVAG localizados nos domínios 2 e 3 da cadeia pesada da proteína (COLMAN, 1996). Os resultados de cinética enzimática indicam que a BjHK seja um potente inibidor de cisteíno-peptidase, atuando como um inibidor competitivo.

Utilizando a ferramenta CLUSTER verificamos uma similaridade de 88% entre a BJ46a-BjHK e a fetuína HSF e de 68% com a fetuína de cobaia (*Cavia porcellus*) em uma região contendo 39 e 33 resíduos de aminoácidos que compreende as regiões F¹²¹ – S¹⁶⁰ e V¹²⁸ – V¹⁶¹. Além disso, como citado anteriormente, essa proteína também possui uma sequência similar com o domínio 2 e 3 do cininogênio humano responsável pela função de cisteíno-peptidase, sequência QVVXX (Q¹⁵⁶ – S¹⁶⁰), o que corrobora como inibidor cisteíno-peptidase.

Apesar de não apresentar em sua estrutura nenhuma sequência peptídica com homologia às cininas descritas, o plasma de *Bothrops jararaca*, quando incubado com tripsina, libera peptídeo(s) com efeito similar aos de bradicinina de

mamíferos, produzindo hipotensão em serpentes e camundongos (ABDALA et al., 1989; BARRETO et al., 2009).

Barreto e cols. (2009) descreveram a sequência de três peptídeos ativos gerados após a incubação do plasma dessa serpente com tripsina. Dentre esses peptídeos, destacamos dois que foram descritos pelos autores como frações 13 (NPFVDA) e 14 (SKPNMSDESLAVAI), pois identificamos na B_jHK uma similaridade com esses peptídeos, nas posições N¹⁵⁴ – S¹⁵⁷ e E²⁴² – I²⁵⁸ (figuras 15a e 15b), que poderiam ser formados após a incubação dessa proteína com tripsina. Esses dados corroboram com a ideia de que, assim como em aves que possuem uma substância do tipo cinina (SEKI et al., 1973), substâncias vasoativas liberadas do plasma *B. jararaca* por enzimas que hidrolisam o cininogênio de mamíferos (cininogenase e tripsina) são indicativos de que a serpente venha a ter seu próprio sistema calicreína-cinina plasmático.

Como demonstrado no cininogênio humano, a B_jHK também apresenta atividade antiagregante sobre plaquetas. Utilizando uma concentração menor que a utilizada em experimentos com cininogênio humano, obtivemos uma inibição de aproximadamente 23%, quando a trombina foi utilizada como agonista. No cininogênio de alta massa molecular humano, três porções da sua molécula são responsáveis por essa atividade inibitória sobre agregação plaquetária: uma região do domínio 3 compete com a trombina para a ligação à glicoproteína I_b; metabólitos da bradiginina podem prevenir a clivagem do receptor de trombina; e o domínio 5 inibe a adesão e a agregação plaquetária bloqueando a interação entre a integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ e vitronectina (CHAVAKIS et al., 2002). Na BJ46a (B_jHK) foi identificada a presença de uma região com a sequência RGD (R²³GD²⁵) presente em disintegrinas e com atividade inibitória sobre agregação plaquetária (GOULD et al., 1990).

O cininogênio de alta massa molecular isolados do plasma humano possui propriedades antiadesivas sobre neutrófilos (COLMAN, 1996), além de ser capaz de competir com a integrina Mac-1 (CD11_b/CD18) de neutrófilos, a qual interage com as moléculas de adesão ICAM-1 e ICAM-2, responsável pela adesão celular (WACHTFOGEL et al., 1994).

Nossos dados demonstram que a B_jHK, quando incubada com o veneno de *Bothrops jararaca*, inibe as alterações na interação leucócito-endotélio induzidas por esse veneno na microcirculação do músculo cremaster de camundongos.

Aparentemente esse efeito se deve à atividade inibitória de B_jHK sobre metaloproteinases do veneno de *B. jararaca*, principais toxinas responsáveis pela atividade inflamatória nesse veneno (ZYCHAR et al., 2010)

A resistência da serpente *Bothrops jararaca* ao efeito tóxico de seu próprio veneno é devido à presença de fatores em seu plasma, como a BJ46a (B_jHK), que é um fator antihemorrágico. Outros fatores antihemorrágicos isolados do sangue de outras serpentes e de mamíferos são glicoproteínas ácidas, termo-resistentes, sem atividade enzimática e com massas moleculares que podem variar em sua maioria entre 52-90 KDa (DOMONT et al., 1991).

Essas proteínas podem ser classificadas em pelo menos dois grupos, de acordo com homologias estruturais: 1) as isoladas de mamíferos marsupiais pertencentes ao super gene da família das imunoglobulinas (CATANESE; KRESS, 1992; QI et al., 1995; PERALES et al., 1994); 2) as isoladas de serpentes *Trimeresurus flavoviridis* pertencente a superfamília das cistatinas (YAMAKAWA; OMARISATOH, 1992). Além disso, essas proteínas inibem especificamente metaloproteinases dos venenos ofídicos através da formação de complexos não covalentes, não atuando sobre serinoproteinases dos mesmos (DOMONT et al., 1991, NEVES-FERREIRA et al., 1997, THWIN; GOPALAKRISHNAKONE, 1998).

A BJ46a forma complexo aparente com jararagina e atrolisina C, metaloproteinases de diferentes classes isoladas de venenos ofídicos (VALENTE et al., 2001), sendo esse o mecanismo inibitório proposto. Entretanto, não foram encontrados complexos quando o B_jHK foi incubado com jararagina, havendo aparentemente uma competição por íons zinco e cálcio entre as duas proteínas, com vantagem para a B_jHK (GONÇALVES; CHUDZINSKI-TAVASSI, 2004). Essa diferença pode estar relacionada a possíveis modificações estruturais na forma complexada da molécula na B_jHK.

No cininogênio de alta massa molecular humano, a atividade inibitória sobre metaloproteinases está localizada na região rica em histidina e glicina no domínio 5 dessa proteína (GONÇALVES et al., 2003). Na sequência descrita na BJ46a existe uma região rica em histidina (H²¹¹ – H²¹⁸), com homologia a uma região da porção C-terminal da proteína S100A9, com propriedade inibitória sobre metaloproteinases (DALE et al., 2004), e que também apresenta alta homologia à porções do domínio 5 do CAMM (HESSIAN et al., 1995). Essa região não foi coberta pelo sequenciamento

por espectrometria de massas, provavelmente, devido à formação de um peptídeo triptico longo (43 resíduos, K¹⁸⁸ – R²³¹), dificultando o processo de deconvolução.

Apesar de não possuir alta homologia estrutural com os cininogênios descritos até o momento, a BjHK(BJ46a) apresentou homologias funcionais com essa molécula.

A denominação BJ46a foi dada considerando-se a massa molecular encontrada com o processo de purificação utilizado (VALENTE et al., 2001), enquanto que a denominação BjHK foi dada pelas características funcionais da molécula, imaginando-se, pela massa molecular obtida (110 kDa) se tratar de um cininogênio de alta massa molecular. Pelo conjunto dos resultados obtidos, verificamos que se trata de uma glicoproteína pertencente à família das cistatinas do tipo 3, com homologia estrutural às fetuinas, com região rica em histidina e homologia funcional aos cininogênios. Uma denominação mais apropriada a essa proteína ser faz necessária.

6. CONCLUSÃO

O conjunto dos resultados nos permite concluir que a BjHK (BJ46a) é uma proteína que pertence a super família das cistatinas do tipo 3, pois apresenta homologia estrutural as fetuinas, domínio rico em histidina e homologia funcional a cininogênios de mamíferos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS¹

ABDALLA, F.M.F.; HIRAICHI, E.; PICARELLI, Z.P.; PREZOTO, B.C. Kallikrein-kinin system in the plasma of the snake *Bothrops jararaca*. **Br. J. Pharmacol.**, 98: 252-258, 1989.

ANASTASI, A.; BROWN, M.A.; KEMBHAVI, A.A.; NICKLIN, M.J.H.; SAYERS, C.A.; SUNTER, D.C.; BARRETT, A.J. Cystatin, a protein inhibitor of cysteine proteinases - improved purification from egg-white, characterization, and detection in chicken serum. **Biochemical J.**, 211: 129-138, 1983.

ASAKURA, S.; HURLEY, R.W.; SKORSTENGAARD, K.; OHKUBO, I.; MOSHER, D.F. Inhibition of cell adhesion by high molecular weight kininogen. **J. Cell. Biol.**, 116: 465-476, 1992.

BAEZ, S. An open cremaster muscle preparation for for the study of blood vessels by in vivo microscopy. **Microvasc. Res.**, v. 42, n. 5, p. 515-23, 1973.

BLUM H.; BEIER H.; GROSS H.J. Improved silver staining of plant-proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. **Electrophoresis**, 8: 93-99, 1987.

BARRET, A.J. The cystatins: a diverse superfamily of cysteine peptidase inhibitors. **Biomed. Biochim. Acta**, 45: 1363-1374, 1986.

_____. The cystatins: a new class of peptidase inhibitors. **TIBS**, 12: 193-196, 1987.

BARRET, A.J.; KIRSCHKE, H. Cathepsin B, cathepsin H, and cathepsin L. **Methods Enzymol.**, 80: 535-561, 1981.

BARRETO, S.A.; CHAGURI, L.C.A.G.; PREZOTO, B.C.; LEBRUN, I. Effects of three vasoactive peptides isolated from the plasma of the snake *Bothrops jararaca*. **Comparative Biochem. and Physiol., Part C**, 149: 552-558, 2009.

¹ De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 6023: Informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

BHoola, K.D.; FIGUEROA, C.D.; WORTHY, K. Bioregulation of kinins: kallikreins, kininogens, and kininases. **Pharmacol. Rev.**, 44: 1-80, 1992.

BJARNASON, J.B.; FOX, J.W. Hemorrhagic metalloproteinases from snake venoms. **Pharmacol. Ther.**, 62: 325-372, 1994.

BROWN, N.J.; GAINER, J.V.; STEIN, C.M.; VAUGHAN, D.E. Bradykinin stimulates tissue plasminogen activator release in human vasculature. **Hypertension**, 33: 1431-5, 1999.

BROWN, W.M.; DZIEGIELEWSKA, K.M. Friends and relations of the cystatin superfamily: new members and their evolution. **Protein Sci.**, 6: 5-12, 1997.

BUTTLE, D.J.; DANDO, P.M.; COE, P.F.; SHARP, S.L.; SHEPHERD, S.T.; BARRET, A.J. The preparation of fully active chymopapain free of contaminating proteinases. **Biol. Chem. Hoppe-Seyler**, 371: 1083-1091, 1990.

CARDOSO, J.L.; FAN, H.W.; FRANÇA, F.O.S.; *et al.* Randomized comparative trial of three antivenoms in the treatment of envenoming by lance-headed vipers (*Bothrops jararaca*) in São Paulo, Brazil. **Q. J. Med.**, v. 86, n. 5, p. 315-25, 1993.

CATANESE, J.J.; KRESS, L.F. Isolation from opossum serum of a metalloproteinase inhibitor homologous to human alpha 1B-glycoprotein. **Biochemistry**, 31: 410-418, 1992.

CHANG, L.S.; KUO, K.W.; LIN, S.R.; CHANG, C.C. **J. Protein Chem.**, 13: 641-648, 1994.

CHAVAKIS, T.; BOECKEL, N.; SANTOSO, S.; VOSS, R.; ISORDIA-SALAS, I.; PIXLEY, R.A.; MORGENSTERN, E.; COLMAN, R.W.; PREISSNER, K.T. Inhibition of platelet adhesion and aggregation by a defined region (Gly-486-Lys-502) of high molecular weight kininogen. **J. Biol. Chem.**, 277: 23157-23164, 2002a.

CHAVAKIS, T.; KANSE, S.M.; LUPU, F.; *et al.* Different mechanisms define the antiadhesive function of high molecular weight kininogen in integrin- and urokinase receptor-dependent interactions. **Blood**, 96: 514-522, 2000.

CHAVAKIS, T.; KANSE, S.M.; PIXLEY, R.A.; MAY, A.E.; ISORDIA-SALAS, I.; COLMAN, R.W.; PREISSNER, K.T. Regulation of leukocyte recruitment by

polypeptides derived from high molecular weight kininogen. **Faseb J.**, 15: 2365-2376, 2001.

CHAVAKIS, T.; PIXLEY, R.A.; ISORDIA-SALAS, I.; COLMAN, R.W.; PREISSNER, K.T. A novel antithrombotic role for high molecular weight kininogen as inhibitor of plasminogen activator inhibitor-1 function. **J. Biol. Chem.**, 277: 32677-32682, 2002b.

CHUDZINSKI, A.M.; SAMPAIO, M.U.; OLIVA, M.L.; SAMPAIO, C.A.M. A *Bothrops jararaca* plasma cysteine-proteinase inhibitor related to mammalian kininogen. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, 22: 945-948, 1989.

CHUDZINSKI-TAVASSI, A.M.; POLIZELLO, A.C.M.; GONÇALVES, L.R.C.; ROTHSCCHILD, Z.; KELEN, E.M.A. High inhibitory activity on proteases in a reptile plasma (*Bothrops jararaca* snake) impairs its intrinsic fibrinolytic-like mechanism. **Fibrinolysis**, 9: 79-85, 1995.

CINTRA, A.C.O.; MARANGONI, S.; OLIVEIRA, B.; GIGLIO, J.R. **J. Protein Chem.**, 12: 57-64, 1993.

COLMAN, R.W. Structure-function correlates of human high molecular weight kininogen. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, 27: 1839-1853, 1994.

_____. Inhibitory and antiadhesive properties of human kininogens. **Immunopharmacology**, 32: 9-18, 1996.

COLMAN, R.W.; JAMESON, B.A.; LIN, Y.; JOHNSON, D.; MOUSA, S.A. Domain 5 of high molecular weight kininogen (kininostatin) down-regulates endothelial cell proliferation and migration and inhibits angiogenesis. **Blood**, 95: 543-550, 2000.

COLMAN, R.W.; SCHMAIER, A.H. Contact system: a vascular biology modulator with anticoagulant, profibrinolytic, antiadhesive, and proinflammatory attributes. **Blood**, v. 90, n. 10, p. 3819-43, 1997.

CONLON, J.M. The kallikrein-kinin system: evolution of form and function. **Annals N. Y. Acad. Sci.**, 839:1-8, 1998.

COSTA-NETO, C.M.; DILLENBURG-PILLA, P.; HEINRICH, T.A.; PARREIRAS-E-SILVA, L.T.; PEREIRA, M.G.A.G.; REIS, R.I.; SOUZA, P.P.C. Participation of kallikrein-kinin system in different pathologies. **International Immunopharmacology**, 8: 135-142, 2008.

DALE, C.S.; GONÇALVES, L.R.C.; JULIANO, L.; JULIANO, M.A.; MOURA-DA-SILVA, A.M.; GIORGI, R. The C-terminus of murine S100 A9 inhibits hyperalgesia and edema induced by jararhagin. **Peptides**, 25: 81-89, 2004.

DANCIGER, J.S.; LUTZ, M.; HAMA, S.; CRUZ, D.; CASTRILLO, A.; LAZARO, J.; PHILLIPS, R.; PREMACK, B.; BERLINER, J. Method for large scale isolation, culture and cryopreservation of human monocytes suitable for chemotaxis, cellular adhesion assays, macrophage and dendritic cell differentiation. **J. Immunol. Methods**, 288: 123-134, 2004.

DELLACASA, M.S. **Caracterização estrutural e funcional da insularina**: uma nova disintegrina do veneno de *Bothrops insularis*. 2004. 126pp. (Doutorado). Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

DENNIS, E.A. **J. Biol. Chem.**, 269: 13057-13060, 1994.

_____. (2000). **Am. J. Respir. Crit. Care Med.**, 161: S32-S35.

DOMONT, G.B.; PERALES, J.; MOUSSATCHE, H. Natural anti-snake venom proteins. **Toxicon**, 29: 1183-1194, 1991.

DRAY, A.; PERKINS, M. Bradykinin and inflammatory pain. **Trends Neurosci**, v. 16, n. 3, p. 99-104, 1993.

DZIEGIELEWSKA, K.M.; BROWN, W.M. **Molecular Biology Intelligence Unit: Fetuin**, p. 59-60, 1995. R.G. Landes Co, Austin, TX.

ERDÖS, E.G. **Bradykinin, kallidin and kallikrein**. Vol. XXV. Germany: Springer-Verlag, 1970.

ERDÖS, E.G., MIWA, I., GRAHAM, W.J. Studies on the evolution of plasma kinins: Reptilian and avian blood. **Life Sci.**, 6: 2433-2439, 1967.

FONG, D.; SMITH, D.I.; HSIEH, W.T. The human kininogen gene (KNG) mapped to chromosome 3q26-qter by analysis of somatic cell hybrids using the polymerase chain reaction. **Hum. Genet.**, 87:189-192, 1991.

FOSTER, C.J.; PROSSER, D.M.; AGANS, J.M.; ZHAI, Y.; SMITH, M.D.; LACHOWICZ, J.E.; ZHANG, F.L.; GUSTAFSON, E.; MONSMA, F.J.; WIEKOWSKI,

M.T.; ABBONDANZO, S.J.; COOK, D.N.; BAYNE, M.L.; LIRA, S.A.; CHINTALA, M.S. Molecular identification and characterization of the platelet ADP receptor targeted by thienopyridine antithrombotic drugs. **J. Clin. Invest.**, 107: 1591-1598, 2001.

FRANÇA, F.O.S.; MÁLAQUE, C.M.S. Acidente botrópico. In: CARDOSO, J.L.; FRANÇA, F.O.S.; WEN, F.H.; MÁLAQUE, C.M.S.; HADDAD, JR. V., (Ed.). **Animais Peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes**. São Paulo: Savier, 2003, p. 72-86.

FRANCIS, B.; GUTIÉRREZ J.M.; LOMONTE, B.; KAISER, J.I. **Arch. Biochem. Biophys.**, 284: 352-359, 1991.

FREY, E.K.; KRAUT, H. Ein neues Kreislaufhormon und seine Wirkung. **Arch. Exp. Pathol. Pharmacol.**, 133: 1-56, 1928.

GONÇALVES, L.R.C.; CHUDZINSKI-TAVASSI, A.M. High molecular mass kininogen inhibits metalloproteinases of *Bothrops jararaca* snake venom. **Biochemical and Biophys. Research Communications**, 318: 53-59, 2004.

GONÇALVES, L.R.C.; CHUDZINSKI-TAVASSI, A.M.; PORTARO, F.C.V.; ARAÚJO, M.C.; JULIANO, M.A.; JULIANO, L. The light chain of human high molecular weight kininogen is endowed with metalloproteinase inhibitory activity. **Mem. Inst. Butantan**, 60: 44, 2003.

GOULD, R.J.; POLOKOFF, M.A.; FRIEDMAN, P.A.; HUANG, T.-F.; HOLT, J.C.; COOK, J.J.; NIEWIAROWSKI, S. Disintegrins: a family of integrin inhibitory proteins from viper venoms. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, 195: 168-171, 1990.

GUO, Y.L.; WANG, S.; COLMAN, R.W. Kininostatin, an angiogenic inhibitor, inhibits proliferation and induces apoptosis of human endothelial cells. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, 21: 1427-1433, 2001.

GUSTAFSON, E.J.; LUKASIEWICZ, H.; WACHTFOGEL, Y.T.; *et al.* High molecular weight kininogen inhibits fibrinogen binding to cytoadhesions of neutrophils and platelets. **J. Cell Biol.**, 109: 377-387, 1989.

GUTIÉRREZ, J.M.; LOMONT, B. Phospholipase A₂ myotoxins from *Bothrops* snake venoms. **Toxicon**, 33: 1405-1424, 1995.

HASAN, A.A.K.; AMENTA, S.; SCHMAIER, A.H. Bradykinin and its metabolite ARG-PRO-PRO-GLY-PHE are selective inhibitors of α -thrombin-induced platelet activation. **Circulation**, 94: 517-28, 1996.

HASAN, A.A.K.; REBELO, S.S.; SMITH, E.; SRIKANTH S.; WERNS S.; DRISCOLL E.; FAUL, J.; BRENNER, D.; NORMOLLE, D.; LUCCHESI, B.R.; SCHMAIER, A.H. Thrombostatin inhibits induced canine coronary thrombosis. **Thromb. Haemost.**, 84: 1182-7, 1999.

HASAN, A.A.K.; WARNOCK, M.; NIEMAN, M.; SRIKANTH, S.; MAHDI, F.; KRISHNAN, R.; TULINSKY, A.; SCHMAIER, A.H. The mechanisms of Arg-Pro-Pro-Gly-Phe inhibition of thrombin. **Amer. J. Physiol. Heart and Circ. Physiol.**, 285: H183-93, 2003.

HERWALD, H.; HASAN, A.A.; GODOVAC-ZIMMERMAN, J.; SCHMAIER, A.H.; MULLER-ESTERL, W. Identification of an endothelial cell binding site on kininogen domain D3. **J. Biol. Chem.**, 270: 14634-14642, 1995.

HESSIAN, P.A.; WILKINSON, L.; HOGG, N. The S100 family protein MRP-14 (S100A9) has homology with the contact domain of high molecular weight kininogen. **FEBS Letters**, 371: 271-275, 1995.

HOGUE, A.R.; ROMANO HOGUE, S.A.R.W.L. Sinopse das serpentes peçonhentas do Brasil. 2ed. **Mem. Inst. Butantan**, 42/43: 373-496, 1978-1979.

ISHIGURO, H.; HIGASHIYAMA, S.; NAMIKAWA, C.; *et al.* Interaction of human calpains I and II with high molecular weight and low molecular weight kininogens and their heavy chain: mechanism of interaction and the role of divalent cations. **Biochemistry**, v. 26, n. 10, p. 2863-70, 1987.

JACOBSEN, S.; KRIZ, M. Some data on two purified kininogens from human plasma. **Br. J. Pharmacol.**, 29: 25, 1967.

JIANG, Y., MULLER-ESTERL, W., SCHMAIER, A.H. Domain 3 of kininogens contains a cell binding site and a site that modifies thrombin activation of platelets. **J. Biol. Chem.**, 267: 3712-7, 1992.

JOSEPH, K.; BAHOU, W.; KAPLAN, A.P. Evidence that the zinc-dependent binding protein for Factor XII and high molecular weight kininogen is glycoprotein Ib [abstract]. **J. Invest. Med.**, 45: 267A, 1997.

KAPLAN, A. The intrinsic coagulation/kinin-forming cascade: assembly in plasma and cell surfaces in inflammation. **Adv. Immunol.**, 66: 225-72, 1997.

KATO, H.; NAGASAWA, S.; IWANAGA, S. HMW and LMW kininogens. **Methods Enzymol.**, 80: 172-198, 1981.

KIMURA, M.; SUEYOSHI, T.; TAKADA, K.; TANAKA, K.; MORITA, T.; IWANAGA, S. Isolation and characterization of ornitho-kininogen. **Eur. J. Biochem.**, 168: 493-501, 1987.

KINI, R.M. Excitement ahead: structure, function and mechanism of snake venom phospholipase A_2 enzymes. **Toxicon**, 42: 827-40, 2003. doi 10.1016/j.toxicon.2003.11.002.

KISHINO, J.; OHARA, O.; NOMURA, K.; KRAMER, R.M.; ARITA, H. **J. Biol. Chem.**, 269: 5092-5098, 1994.

KITAMURA, N.; KITAGAWA H.; *et al.* Structural organization of the human kininogen gene and a model for its evolution. **J. Biol. Chem.**, v. 260, n. 14, p. 8610-7, 1985.

KLEMMER, K. Methods of classification of venomous snakes. In: Bücherl, W. *et al.*, eds. **Venomous animals and their venoms**. Vol. I. New York: Academic Press, 1968, Ap. 10, 275.

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

LAI, R.; LIU, H.; LEE, W.H.; ZHANG, Y. A novel bradykinin-related peptide from skin secretions of toad *Bombina maxima* and its precursor containing six identical copies of the final product. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 286: 259-263, 2001.

LALMANACH, G.; HOEBEKE, J.; *et al.* Interaction between cystatin-derived peptides and papain. **J. Protein Chem.**, 12: 23-31, 1993.

LALMANACH, G.; SERVEAU, C.; *et al.* Conserved cystatin segments as models for designing specific substrates and inhibitors of cysteine proteinases. **J. Protein Chem.**, 14: 645-653, 1995.

LALMANACH, G.; NAUDIN, C.; LECAILLE, F.; FRITZ, H. Kininogens: more than cysteine protease inhibitors and kinin precursors. **Biochimie**, xxx: 1-12, 2010.

LAVRAS, A.A.C.; FICHMAN, M.; HIRAICHI, E.; BOUCAULT, M.A.; TOBO, T.; SCHMUZIGER, P.; NAHAS, L.; PICARELLI, Z.P. Deficiency of kallikrein-kinin system and presence of potent kinase activity in the plasma of *Bothrops jararaca* (Serpentes, Crotalinae). **Ciência e Cultura**, 31: 168-174, 1979.

LEATHERBARROW, R.J. GraFit, version 3.0, Erithacus Software Ltd., Staines, United Kingdom, 1992.

LEE, C.; BONGCAM-RUDLOFF, E.; SOLLNER, C.; JAHNEN-DECHENT, W.; CLAEISSON-WELSH, L. Type 3 cystatins; fetuins, kininogen and histidine-rich glycoprotein. **Frontiers in Bioscience**, 14: 2911-2922, 2009.

LEEB-LUNDBERG, L.M.; MARCEAU, F.; MULLER-ESTERL, W.; PETTIBONE, D.J.; ZURAW, B.L. International union of pharmacology. XLV. Classification of the kinin receptor family: from molecular mechanisms to pathophysiological consequences. **Pharmacol. Rev.**, 57:27-77, 2005.

MAHABEER, R.; BHOOLA, K.D. Kallikrein and kinin receptor genes. **Pharmacol. Ther.**, v. 88, n. 1, p. 77-89, 2000.

MANDELBAUM, F.R.; REICHEL, A.P.; ASSAKURA, M.T. Isolation and characterization of a proteolytic enzyme from the venom of the snake *Bothrops jararaca* (jararaca). **Toxicon**, 20: 955-972, 1982.

MANDLE, R.J.; COLMAN, R.W.; *et al.* Identification of prekallikrein and high-molecular-weight kininogen as a complex in human plasma. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 73, n. 11, p. 4179-83, 1976.

MCCRUDDEN, C.M. *et al.* The complex array of bradykinin-related peptides (BRPs) in the peptidome of pickerel frog (*Rana palustris*) skin secretion is the product of transcriptional economy. **Peptides**, 28: 1275-1281, 2007.

MELGAREJO, A.R. Serpentes Peçonhentas no Brasil. In: CARDOSO, J.L.; FRANÇA, F.O.S.; WEN, F.H.; MÁLAQUE, C.M.S.; HADDAD, JR. V., (Ed). **Animais Peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes**. São Paulo: Savier, 2003, p. 289-309.

MELONI, F.J.; SCHMAIER, A.H. Low molecular weight kininogen binds to platelets to modulate thrombin- induced platelet activation. **J. Biol. Chem.**, 266: 6786-6794, 1991.

MORAIS, F.V.; MOLINA, H.M.; BORGES, D.R.; KOUYOUMDIAN, M. Enzima inativadora de bradicinina liberada de fígado preservado ex-vivo. **Rev. Assoc. Med. Bras.**, v. 45, n. 1, p. 19-23, 1999. ISSN 0104-4230.

MOREAU, T.; GUTMAN, N.; ESNARD, F.; GAUTHIER, F. Relationship between the cysteine-proteinase inhibitory function of rat T kininogen and the release of immunoreactive kinin. **Eur. J. Biochem.**, 159: 341-346, 1986.

MULLER-ESTERL, W. Novel functions of the kininogens. **Semin. Thromb. Hemost.**, 13: 115-126, 1987.

NAHAS, L.; BETTI, F.; KAMIGUTI, A.S.; SATO, H. Blood coagulation inhibitor in a snake plasma (*Bothrops jararaca*). **Thromb. Diath. Haemorrh.**, 30: 106-113, 1973.

NAHAS, L.; KAMIGUTI, A.S.; BETTI, F.; MARTINS, I.S.S.; RODRIGUES, M.I. Blood-coagulation mechanism in the snakes *Waglerophis merremii* and *Bothrops jararaca*. **Comp. Biochem. Physiol.**, 69A: 739-743, 1981.

NEVES-FERREIRA, A.G.C.; PERALES, J.; OVADIA, M.; MOUSSATCHÉ H.; DOMONT, G.B. Inhibitory properties of the antithrombotic complex from the south american opossum (*Didelphis marsupialis*) serum. **Toxicon**, v. 35, n. 6, p. 849-863, 1997.

NORDAHL, E.A.; RYDENGARD, V.; MORGELIN, M.; SCHMIDTCHEN, A. Domain 5 of high molecular weight kininogen is antibacterial. **J. Biol. Chem.**, 280: 34832-9, 2005.

OGAWA, T.; NAKASHIMA, K.I.; NOBUSHIMA, I.; DESHIMARU, M.; SHIMOHIGASHI, Y.; FUKUMAKI, Y.; SAKAKI, Y.; HATTORI, S.; OHNO, M. **Toxicon**, 34: 1229-1236, 1996.

OHKUBO, I.; KOTOKU, K.; TAKASAWA, H.; SASAKI, M. Isolation of human cDNA for alpha-2-thiol proteinase inhibitor and its identity with low molecular weight kininogen. **Biochemistry**, 23: 5691-5697, 1984.

OKAMOTO, H.; GREENBAUM, L.M. Isolation and structure of T-kinin. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 112: 701-708, 1983.

OLIVEIRA, R.; WEN, F.H.; SIFUENTES, D.N. Epidemiologia dos acidentes por animais peçonhentos. In: CARDOSO, J.L.; FRANÇA, F.O.S.; WEN, F.H.; MÁLAQUE, C.M.S.; JR., V.H. (Ed). **Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica**. 2ed. São Paulo: Sarvier, 2009, p. 6-21.

OMORI-SATOH, T.; YAMAKAWA, Y.; MEBS, D. The antihemorrhagic factor, erinacin, from the European hedgehog (*Erinaceus europaeus*), a metalloprotease inhibitor of large molecular size possessing ficolin/opsonin P35 lectin domains. **Toxicon**, 38: 1561-1580, 2000.

PAINE, M.J.; DESMOND, H.P.; THEAKSTON, R.D.; CRAMPTON, J.M. Purification, cloning, and molecular characterization of a high molecular weight hemorrhagic metalloprotease, jararhagin, from *Bothrops jararaca* venom. Insights into the disintegrin gene family. **J. Biol. Chem.**, 267: 22869-22876, 1992.

PERALES, J.; MOUSSATCHÉ, H.; OLIVEIRA, B.; MARANGONI, S.; DOMONT, G.B. Isolation and partial characterization of an antithrombotic complex from serum of South American Dipelphidae. **Toxicon**, 32: 1237-1249, 1994.

PIERCE, J.V. Structural features of plasma kinins and kininogens. **Fed. Proc.**, 27: 52-57, 1968.

PURI, R.N.; ZHOU F.; HU, C.J.; COLMAN, R.F.; COLMAN R.W. High molecular weight Kininogen inhibits thrombin-induced platelet aggregation and cleavage of aggrenin by inhibiting binding of thrombin to platelets. **Blood**, 77: 500-507, 1991.

QI, Z.Q.; YONAHARA, K.; TOMIHARA, Y.; TOYAMA, S. Isolation of peptides homologous to domains of human α_1 B-glycoprotein from a mongoose antihemorrhagic factor. **Toxicon**, 33: 241-245, 1995.

RAWLINGS N.D.; BARRET, A.J. Evolution of properties of the cystatin superfamily. **J. Mol. Evol.**, 30: 60-71, 1990.

RIZZU, P.; BALDINI, A. Three members of the human cystatin gene superfamily, AHSG, HRG, and KNG, map within one megabase of genomic DNA at 3q27. **Cytogenet Cell Genet.**, v. 70, n. 1-2, p. 26-8, 1995.

ROCHA-E-SILVA, M.; BERALDO, W.T.; ROSENFELD, G. Bradykinin, a hypotensive smooth muscle stimulating factor released from plasma globulin by snake venom and by trypsin. **Am. J. Physiol.**, 156: 261-73, 1949.

ROSENFELD, G. Symptomatology, pathology and treatment of snake bites in South America. In: WB EB, editor. **Venomous animals and their venoms**. Vol. 2. New York: Academic Press; 1971, p. 345-84.

SAINZ, I.M.; PIXLEY, R.A.; COLMAN, R.W. Fifty years of research on the plasma kallikrein-kinin system: From protein structure and function to cell biology and in-vivo pathophysiology. **Tromb. Haemost.**, 98: 77-83, 2007.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular Cloning**: a laboratory manual. 2.ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 3 v.

SANTORO, M.L.; SOUSA-E-SILVA, M.C.C.; GONÇALVES, L.R.C.; ALMEIDA-SANTOS, S.M.; CARDOSO, D.F.; LAPORTA-FERREIRA, I.L.; SAIKI, M.; PERES, C.A.; SANO-MARTINS, I.S. Comparison of the biological activities in venoms from three subspecies of the South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*, *C. durissus cascavella* and *C. durissus collilineatus*). **Comparative Biochem. and Physiol., Part C**, 122: 61–73, 1999.

SAXENA, P.; THOMPSON, P.; D'UDEKEM, Y.; KONSTANTINOV, I.E. Kallikrein-kinin system: a surgical perspective in post-aprotinin era. **Journal of Surgical Research**, 167: 70-77, 2011.

SCHECHTER, I.; BERGER, A. On the size of the active site in proteases. I. Papain. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 27: 157-162, 1967.

SCHMAIER, A.H.; KUO, A.; LUNDBERG, D.; *et al.* The expression of high molecular weight kininogen on human umbilical vein endothelial cells. **J. Biol. Chem.**, v. 263, n. 31, p. 16327–33, 1988.

SCHMAIER, A.H.; MCCRAE, K.R. The plasma kallikrein-kinin system: its evolution from contact activation. **J. Thromb. Haemost.**, 5: 2323-2329, 2007.

SEKI, T.; MIWA, I.; NAKAJIMA, T.; ERDOS, E.G. Plasma kallikrein-kinin system in nonmammalian blood - Evolutionary aspects. **Am. J. Physiol.**, 224: 1425-1430, 1973.

SEMBA, U.; SHIBUYA, Y.; OKABE, H.; HAYASHI, I.; YAMAMOTO, T. Whale high-molecular-weight and low-molecular-weight kininogens. **Thromb. Res.**, 97: 481-490, 2000.

TAKAGAKI, Y.; KITAMURA, N.; NAKANISHI, S. Cloning and sequence analysis of cDNA for human high molecular weight prekininogens. Primary structures of two human prekininogens. **J. Biol. Chem.**, 260: 8601-8609, 1985.

TANIZAKI, M.M.; KAWASAKI, H.; SUZUKI, K.; MANDELBAUM, F.R. Purification of a proteinase inhibitor from the plasma of *Bothrops jararaca* (jararaca). **Toxicon**, 29: 673-681, 1991.

THWIN, M.M.; GOPALAKRISHNAKONE, P. Snake envenomation and protective natural endogenous proteins: a mini-review of the recent developments (1991-1997). **Toxicon**, 36: 1471-1482, 1998.

VALENTE, R.H.; DRAGULEV, B.; PERALES, J.; FOX, J.W.; DOMONT, G.B. BJ46a, a snake venom metalloproteinase inhibitor. Isolation, characterization, cloning and insights into its mechanism of action. **Eur. J. Biochem.**, 268: 3042-3052, 2001.

WACHTFOGEL, Y.T.; DELA CADENA, R.A.; KUNAPULI, P.; RICK, L. *et al.* High Molecular Weight Kininogen binds to Mac-1 on neutrophils by its heavy chains (domain 3) and its light chain (domain 5). **J. Bio. Chem.**, v. 269, n. 30, p. 19307-12, 1994.

WERLE, E. Über den aktivitätszustand des kallikreins der bauchspeicheldrüse und ihres äusseren sekretes beim hund. **Biochem. Z.**, 290: 129-34, 1937.

WHO. Neglected tropical diseases: diseases covered by NTD Department. Disponível em http://www.who.int/neglected_diseases/diseases/en/. Acesso em: 29 jun. 2010.

WOLLERT, K.C.; DREXLER, H. The kallikrein-kinin system in post-myocardial infarctio cardiac remodeling. **Am. J. Cardiol.**, 80:158A, 1997.

YAMAKAWA, Y.; OMORI-SATOH, T. Primary structure of the antihemorrhagic factor in serum of the Japanese Habu: a snake venom metalloproteinase inhibitor with a double-headed cystatin domain. **J. Biochem. (Tokyo)**, 112: 583-589, 1992.

YLÖNEN, A.; RINNE, A.; HERTTUAINEN, J.; BOGWALD, J.; JARVINEN, M.; KALKKINEN, N. Atlantic salmon (*Salmo solar* L.) skin contains a novel kininogen and another cysteine proteinase inhibitor. **Eur. J. Biochem.**, 266: 1066-1072, 1999.

YLÖNEN, A.; *et al.* Purification and characterization of novel kininogens from spotted wolffish and Atlantic cod. **Eur. J. Biochem.**, 269: 2639-2646, 2002.

ZAMBELLI, V.O.; SAMPAIO, S.C.; SUDO-HAYASHI, L.S.; GRECO, K.; BRITTO, L.R.; ALVES, A.S.; ZYCHAR, B.C.; GONÇALVES, L.R.; SPADACCI-MORENA, D.D.;

OTTON, R.; DELLA-CASA, M.S.; CURI, R.; CURY, Y. Crotoxin alters lymphocyte distribution in rats: involvement of adhesion molecules and lipoxygenase-derived mediators. **Toxicon**, v. 51, n. 8, p. 1357-67, 2008.

ZHANG, J-C.; QI, X.; JUAREZ, J.; PLUNKETT, M.; DONATE, F.; SAKTHIVEL R.; MAZAR, A.P.; MCCRAE, K.R. Inhibition of angiogenesis by two-chain high molecular weight kininogen (HKa) and kininogen-derived polypeptides. **Can. J. Physiol. Pharmacol.**, 80: 85-90, 2002.

ZHAO, Y. Assembly and activation of HK-PK complex on endothelial cells results in bradykinin liberation on NO formation. **Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.**, 280: H1821, 2001.

ZHOU, J.W.; *et al.* Bradykinin-related peptides, including a novel structural variant, (Val¹)-bradykinin, from the skin secretion of Guenther's frog, *Hylarana guentheri* and their molecular precursors. **Peptides**, 28: 781-789, 2007.

ZHOU, L.; LI-LING, J.; HUANG, H.; MA, F.; LI, Q. Phylogenetic analysis of vertebrate kininogen genes. **Genomics**, 91: 129-141, 2008.

ZHOU, L.; LIU, X.; JIN, P.; LI, Q. Cloning of the kininogen gene from *Lampetra japonica* provides insights into its phylogeny in vertebrates. **J. Genet. Genomics**, 36: 109-115, 2009.

ZHOU, Z.H.; YANG, H.L.; XU, X.Q.; WANG, X.; LAI, R. The first report of kininogen from invertebrates. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 247: 1099-1102, 2006.

ZOR, T.; SELINGER, Z. Linearization of the Bradford assay increases its sensitivity: Theoretical and experimental studies. **Anal. Biochem.**, 236: 302-308, 1996.

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