

Alisson Teixeira Buchi

**PURIFICAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO, CRISTALIZAÇÃO E MODELAGEM
MOLECULAR TEÓRICA DA FRAÇÃO GIROXINA DO VENENO DE
Crotalus durissus terrificus (Laurenti 1768)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Doenças Tropicais da Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista – UNESP, para obtenção do título de Mestre em Doenças Tropicais.

Orientador: Prof. Dr. Benedito Barraviera
Co-orientador: Prof. Dr. Marcos R. M. Fontes

Botucatu

2010

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. E TRAT. DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: **ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE**

Buchi, Alisson Teixeira.

Purificação, caracterização e modelagem molecular da fração giroxina do veneno de *Crotalus durissus terrificus* (Laurenti 1768) / Alisson Teixeira Buchi. – Botucatu, 2010.

Dissertação (mestrado) – Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, 2010

Orientador: Prof. Dr. Benedito Barravieira

Co-orientador: Prof. Dr. Marcos R. M. Fontes

Assunto CAPES: 40100006

1. Medicina tropical. 2. Serpente venenosa – Veneno.

Palavras chave: Caracterização; Cristalização; Giroxina; Modelagem teórica; Purificação.

"A fé é uma estrela luminosa que guia o investigador através dos segredos da natureza. É preciso que busques vosso ponto de apoio em Deus e que coloques a vossa confiança num credo divino, forte e puro; aproximai-vos d'Ele de todo o coração, cheio de amor e desinteressadamente. Se possuídes esta fé, Deus não vos esconderá a verdade, mas pelo contrário, vos revelará suas obras de maneira visível e consoladora".

Philippus Aureleous Theophrastus Bombastus Von Hohenheim -
Paracelso (1563)

AGRADECIMENTOS

Ao orientador Dr. Benedito Barraviera pelo voto de confiança, persistência e paciência em ensinar-me, sendo fundamental sua contribuição no desenvolvimento deste trabalho.

Ao grande companheiro e *grande colaborador*, Dr. Rui Seabra Ferreira-Júnior que forneceu *conhecimento verdadeiro* para minha formação como futuro pesquisador.

Ao co-orientador Dr. Marcos Roberto de Mattos Fontes e sua equipe, em especial Agnes Alessandra S. Takeda e Ângelo José Magro, pela orientação na área de cristalografia e modelagem molecular, essencial para o desenvolvimento do referido projeto.

Aos professores colaboradores Dr. Andreimar M. Soares e Dr. Patrick Jack Spencer que colaboraram essencialmente com material purificado e conhecimento teórico necessário para a composição deste trabalho.

À equipe do Grande Centro de Estudos de Venenos e Animais Peçonhentos (CEVAP) constituída de funcionários excepcionais (em especial Selma) e amigos(as): Michele, Luciana, Airton, Eduardo, Natália, Lorimeri, Roberta, Gustavo, Bruno, Vinicius, Camila, Bruna, Maria Ligia e Elaine. Foram pessoas que de certa forma enriqueceram-se e ampliaram minhas perspectivas profissionais. À grande mãe natureza e aos seus entes (serpentes) os quais nos agraciam com sua abundância e materiais de estudo riquíssimos.

Aos amigos e colaboradores do IPEN/USP, especialmente Marcos Antônio Ribeiro Júnior, que se disponibilizaram a fornecer o conhecimento prático em cromatografia e eletroforese.

À meus queridos avós Pedro Buchi, Josefina da Silva Teixeira, Pilar Buchi (*in memorian*) e João Carlos de Paula Teixeira (*in memorian*) pessoas especiais

que sempre souberam oferecer conselhos importantes de como caminhar na jornada da vida.

Aos meus querido pais Aires Buchi e Deise Lúcia Teixeira Buchi, irmãos Andrei e Aislan Teixeira Buchi. Pessoas que além de referenciais de carinho, atenção, apoio e segurança, são imprescindíveis na constituição de minha formação pessoal.

A minha estimada companheira de todas as horas, Thais Beltrame Runza, por todas as horas e momentos compartilhados e sua total disposição em ouvir-me, aconselhar-me e servir-me. Agradecimentos são poucos a pessoas tão generosas assim. Igualmente agradeço a sua mãe, Registila Libânia Beltrame, que por vezes compartilhou de mesma generosidade.

À todos meus familiares, tios(as) Devanir Bruno Lopes, Vera Lúcia Teixeira Martinez, Ari Buchi e Aldo Buchi (*in memoriam*), primos e amigos (especialmente Cláudio Martins de Oliveira, Jean Richard Marinho Júnior, Gisele Souza Parmezzani Marinho, Enilton Leão de Medeiros Júnior e Jeane Rego) presentes e distantes que de alguma forma contribuíram para a realização dessa jornada.

A grande família da Nardos Doceria e segunda família de coração constituída de Maria da Conceição Guelfi (ma mère), Arnaldo de Souza (Seu Arnaldo), Caroline Guelfi de Sousa Hilst e Guto Hilst pela atenção e auxílios irrestritos. Sempre compartilhando a mesa e o pão, generosa e humildemente. Tudo é realmente um processo.

A família da escola de línguas CNA (proprietária Tânia), funcionários (especialmente Silvana, Susana e Soninha), professores e amigos. Pelas oportunidades e lições profissionais, além dos momentos de prazer e alegria.

Ao programa de pós-graduação do Departamento de Doenças Tropicais da Faculdade de Medicina de Botucatu (FMB/UNESP), seus docentes e funcionários por auxiliarem em minha formação acadêmica.

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento do Ensino Superior) pelo auxílio financeiro prestado.

SUMÁRIO

1-INTRODUÇÃO	01
1.1-As serinoproteases	01
1.2-As serinoproteases do veneno de <i>Crotalus durissus terrificus</i>	03
1.3-Ferramentas de bioinformática	05
2-OBJETIVOS	07
3-MATERIAL E MÉTODOS	08
3.1-Material	08
3.2-Métodos	08
3.2.1-Preparação das amostras do veneno crotálico	08
3.2.2-Obtenção da fração giroxina	08
3.2.3-Determinação quantitativa de proteínas	09
3.2.4-Análise eletroforética	09
3.2.5-Focalização isoeletrica	10
3.2.6-Sequenciamento N-terminal	11
3.2.7-Clonagem e sequenciamento do cDNA	11
3.2.8-Espalhamento dinâmico de luz (DLS)	12
3.2.9-Cristalização da fração giroxina	13
3.2.10-Modelagem teórica da giroxina	14
3.2.11-Dinâmica molecular e validação do modelo teórico final	16
3.2.12-Aprovação do projeto de pesquisa pelo Comitê de Ética de Pesquisa em Experimentação Animal.	16
4-RESULTADOS	17
4.1- Purificação do veneno de <i>Crotalus durissus terrificus</i> por meio da cromatografia líquida de alta pressão.	17
4.2-Avaliação do grau de pureza	18
4.3-Sequenciamento N-terminal	20
4.4-Clonagem e seqüenciamento do cDNA	20
4.5-Espalhamento dinâmico de luz	21

4.6-Cristalização da giroxina	22
4.7-Modelagem teórica da fração giroxina do veneno de <i>Crotalus durissus terrificus</i>	25
4.7.1-Informação sobre a sequência alvo giroxina símile B2.1 de interesse gerada pelo software ProtParam	25
4.7.2-Alinhamento múltiplo de seqüências comparativas com sequência alvo giroxina símile B2.1 utilizando o software Clustal X2	26
4.7.3-Referências de alinhamento da seqüência homóloga pelos softwares Expasy e HHPred para a sequência alvo giroxina símile B2.1	28
4.7.4-Determinação dos potenciais sítios de glicosilação da sequência alvo giroxina símile B2.1	29
4.7.5-Construção do modelo teórico da fração giroxina do veneno de <i>Crotalus durissus terrificus</i>	29
4.7.6-Dinâmica molecular do modelo teórico da fração giroxina do veneno de <i>Crotalus durissus terrificus</i>	30
5-DISCUSSÃO	33
6-CONCLUSÕES	43
7-RESUMO	44
8-ABSTRACT	45
9-REFERÊNCIAS	46

1-INTRODUÇÃO

As serpentes *Crotalus durissus terrificus* encontradas no Brasil apresentam características comuns e observadas nas demais serpentes peçonhentas, tais como cabeça triangular, um par de fossetas loreais e olhos pequenos com pupilas em fenda. Além disso, apresentam na porção terminal da cauda, o guizo ou chocalho, uma característica peculiar desse gênero, que facilita sua identificação. De um modo geral são freqüentes nas regiões secas e pedregosas do Brasil. Por esse motivo, não são encontradas nas florestas, como também nas matas úmidas a leste da Serra do Mar (1, 2, 3).

Os venenos de serpentes peçonhentas representam uma mistura muito rica em compostos orgânicos e inorgânicos. De acordo com Bjarnason & Fox (4), entre os compostos inorgânicos estão o cálcio, cobre, ferro, potássio, magnésio, manganês, sódio, fósforo, cobalto e zinco; outros componentes incluem carboidratos (glicoproteínas), lipídeos (fosfolipídeos), aminas biogênicas, aminoácidos e nucleotídeos. A maior parte dos compostos presentes nos venenos das serpentes é formada por proteínas que são 90-95% de peso seco do veneno (5). Entre as proteínas estão às chamadas proteases (metaloproteases e serinoproteases), que apresentam atividade enzimática, tendo outras proteínas como substrato. Além disso, vários outros tipos de enzimas são encontradas nos venenos tais como: fosfolipases, fosfodiesterases, colinesterases, aminotransferases, L-amino ácido oxidases, catalases, ATPases, hialuronidases, NAD nucleosidases e L-glicosaminidases (6).

1.1-As serinoproteases

As serinoproteases são componentes enzimáticos encontrados em diversas peçonhas pertencentes à subfamília da enzima tripsina, devido a identidade sequencial (50-70%) e por apresentar elevada especificidade para diversos substratos. Estas enzimas interferem no controle da regulação do sistema hemostático em diferentes pontos chaves estendendo-se desde a cascata da coagulação até a regulação do sistema fibrinolítico (7). São

caracterizadas pelos ativadores do sistema fibrinolítico (ativadores de plasminogênio), pelos procoagulantes (enzimas trombina símile), anticoagulantes (ativadores de proteína C) e pelas enzimas de agregação plaquetária (8). Neste sentido, o veneno de *Trimeresurus stejnegeri* contém um ativador que converte plasminogênio em plasmina pela clivagem das ligações entre os aminoácidos Arg561-Val562, apresenta elevada especificidade ao substrato e resistência aos inibidores de plasmina como a α -2 antiplasmina (9,10). As enzimas trombina símile encontradas na natureza, pertencentes à classe das serinoproteases, possuem algumas propriedades físico-químicas em comum: são glicoproteínas com cadeia única e massa molecular calculada entre 28 e 60 kDa; são ativas em substratos sintéticos específicos de trombina e compartilham similaridades com esta última (11). Apresentam ainda diferenças na clivagem das ligações peptídicas e nas atividades sobre os fatores da coagulação e das plaquetas (12,13). Há uma variação considerável do conteúdo glicosilado entre as diferentes enzimas trombina símile, o que poderia explicar a diferença de massa entre elas (14).

A batroxobina, uma enzima trombina símile encontrada no veneno de *Bothrops atrox*, usada no tratamento de doenças trombóticas (15), converte fibrinogênio em fibrina pela clivagem do fibrinopeptídeo A ($A\alpha$ 1-16) na porção N-terminal. Dessa forma produz uma rede flexível de ligações não cruzadas que é rapidamente removida do sistema circulatório pelo sistema fibrinolítico resultando em um efeito final desfibrinante. O ativador de proteína C (PC) do veneno de *Agkistrodon contortrix contortrix*, uma serinoprotease comercialmente distribuída como Protac, hidrolisa as ligações Arg169-Leu170, agindo de forma independente dos fatores plasmáticos não necessitando da participação da trombomodulina (16). Assim, as serinoproteases desde que façam a ativação catalítica da PC, tem sua ação facilmente detectada pelos testes de coagulação, utilizando-se para tanto de substratos cromogênicos. Por fim, os diferentes tipos de serinoproteases estudados até o presente momento podem ser utilizados como ferramentas de diagnóstico ou para a produção de medicamentos de uso clínico.

1.2-As serinoproteases do veneno de *Crotalus durissus terrificus*

A composição do veneno das serpentes *Crotalus durissus terrificus* é complexa e constituída de enzimas, toxinas e peptídeos. O fracionamento em coluna de Sephadex revela as seguintes enzimas: 5-nucleotidasas, fosfodiesterases, enzima tipo trombina, l-aminoxidases, enzimas com atividade caliceína tecidual e hidrolase do NAD. As demais frações presentes são as seguintes: crotamina, crotapotina, fosfolipase A₂, giroxina e convulxina. (17)

A giroxina pertence ao grupo das enzimas trombina símile e também a um grupo maior das serinoproteases. Estas últimas representam 20% do total de proteínas presentes nos venenos das serpentes da família Viperidae. Caracterizam-se por apresentar um sítio catalítico comum por meio de um mecanismo que envolve um aminoácido ativo serina altamente reativo e presente na posição 195. No seu sítio ativo existe uma tríade catalítica semelhante a presente na tripsina, a qual é formada pelo agrupamento dos aminoácidos, Ser 195, His 57 e Asp 102 (18).

Este grupo de enzimas é classificado em famílias de acordo com as similaridades nas seqüências de aminoácidos. Estas estão reunidas em clãs, quando consideradas provindas de um ancestral comum, podendo agir em um ou mais fatores de coagulação (19). A Figura 1 a seguir mostra a estrutura tridimensional da tripsina onde observamos a primeira serinoprotease estudada com tríade catalítica comum das serinoproteases (Ser 195, His 57 e Asp 102).

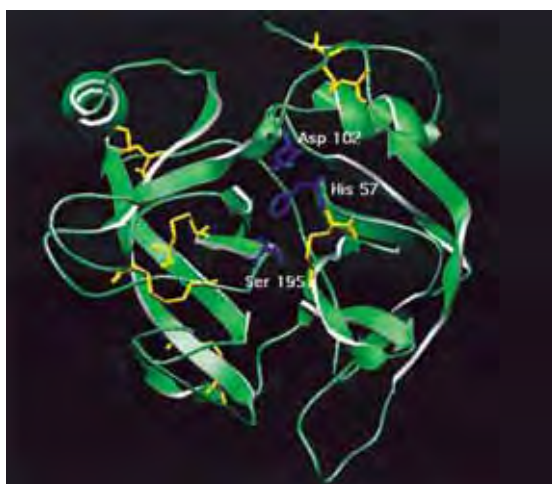


Figura 1: Estrutura tridimensional da tripsina onde observamos a tríade catalítica clássica das serinoproteases (Ser 195, His 57 e Asp 102).

Em 1986 Raw *et al* (20) determinaram por análise em eletroforese que a giroxina é uma proteína de cadeia única, com massa molecular estimada em 34 kDa. A estabilidade desta molécula depende do pH, sendo máxima no pH 8.0. Não é alterada por congelamento e descongelamento ou por tratamento a 40° C durante 15 minutos, porém com atividade máxima em pH 4.0 (21).

Essa neurotoxina não é letal, mas causa uma síndrome nos animais, caracterizada por movimentos rotacionais em volta do eixo central do seu corpo, daí a origem do seu nome (22). A giroxina também é conhecida por sua atividade enzimática trombina-símile, atuando sobre o fibrinogênio humano, clivando o fibrinopeptídeo A da cadeia α próximo ao N-terminal. Os monômeros de fibrina resultantes polimerizam-se em uma rede que difere da produzida tradicionalmente pela trombina. Esta rede é instável e mais susceptível à ação dos agentes fibrinolíticos (23). A incoagulabilidade sanguínea observada em casos graves de pacientes picados por serpentes *Crotalus durissus terrificus* é decorrente do consumo de fibrinogênio causado por este mecanismo (24).

Estudos com serinoproteases derivadas de veneno de serpentes (SVSPs) mostraram que estas moléculas apresentam características estruturais comuns a outras proteínas, como a tripsina e a trombina. A descoberta de isoformas de SVSPs tornou-se freqüente na composição dos venenos em decorrência da padronização e aplicação de novas técnicas de biologia molecular. Além disso, as mudanças de alguns aminoácidos provenientes do mesmo RNA mensageiro, pela transcrição de porções gênicas ativas (éxons) ou inativas (introns) combinadas aleatoriamente, geram múltiplas formas protéicas com função modificada. Entretanto, devido ao elevado grau de identidade existente entre as SVSPs e suas isoformas, não é possível determinar os tipos de interações entre estas moléculas e seus substratos específicos apenas com base em suas similaridades com outras enzimas (25). Estudos que buscam à investigação de estruturas protéicas tornaram-se essenciais para a caracterização e diferenciação de novas SVSPs.

1.3-Ferramentas de bioinformática

Devido ao aumento exponencial do número de seqüências de proteínas disponibilizadas em Bancos de dados nos últimos anos, algumas ferramentas computacionais passaram a ter um papel relevante na execução de estudos estruturais e funcionais de moléculas protéicas. Estes programas, que vêm sendo otimizados e melhorados a uma velocidade crescente, são capazes de prever, construir e aperfeiçoar modelos tridimensionais teóricos de proteínas. Por conseguinte, vários exemplos de proteínas de venenos de serpentes, cujas conformações tridimensionais foram determinadas através da técnica de cristalografia, estão disponíveis nos referidos Bancos de dados. Isto demonstra a importância deste método experimental para o estudo das toxinas de serpentes, principalmente em função da exatidão pelas informações estruturais obtidas a partir dos experimentos de difração de raios X.

Desta forma, estas ferramentas computacionais são adequadas para o estudo de grande parte das proteínas cujas seqüências de aminoácidos já são conhecidas, mas que ainda não foram objeto de qualquer tipo de análise estrutural. Desafio maior, entretanto, será a elucidação estrutural de novos sítios moleculares, principalmente de proteínas, enzimas e receptores. Essas estruturas serão a base da revolução da medicina (26) em que a compreensão dos fenômenos biológicos em nível molecular terá papel cada vez mais relevante. Neste contexto, esforços têm sido feitos em todo o mundo, no sentido de elucidar o maior número possível de estruturas tridimensionais (estruturas terciárias e quaternárias) de diferentes proteínas (27, 28).

Apesar das consideráveis inovações técnicas, sobretudo nas áreas de cristalografia de raios-X, difração de nêutrons e de ressonância magnética nuclear (RMN), muitos problemas básicos persistem. A obtenção de amostras em quantidade suficiente para os ensaios é, em muitos casos, difícil e os cristais obtidos nem sempre tem a qualidade necessária para o trabalho experimental. Isto porque aproximadamente somente uma em cada vinte proteínas produz cristais adequados para serem estudadas (29).

Por outro lado, a elucidação das seqüências de aminoácidos (estruturas primárias) é uma tarefa relativamente mais simples. Por isto, nota-se hoje um grande hiato entre o número de estruturas primárias e secundárias disponíveis.

Para se ter uma idéia do problema, em janeiro de 2010, o SWISS PROT (30, 31), o mais importante Banco de dados de estruturas primárias, incluía 514.212 seqüências de resíduos de aminoácidos. No mesmo período, somente 62.787 estruturas protéicas estavam disponíveis no PDB (32), o principal Banco de dados de estruturas terciárias de proteínas. É possível, em princípio, predizer a estrutura tridimensional de proteínas a partir de sua estrutura primária. Este método é conhecido como modelagem de proteínas *ab initio* (33, 34). A determinação da estrutura secundária de proteínas por este método é um sério desafio, sendo hoje o maior problema não resolvido da biologia molecular estrutural (35). Ainda não se dispõe de algoritmos capazes de simular, com precisão, a ação das leis que regem o processo de enovelamento ou empacotamento.

A principal razão é que estas leis ainda não são perfeitamente compreendidas, o que torna muito difícil obter conformações simultaneamente estáveis e funcionais a custo computacional razoável. A ferramenta mais bem sucedida de predição de estruturas tridimensionais de proteínas é a modelagem por homologia, também conhecida como modelagem comparativa (*comparative protein modeling*) (36, 37). Outro fato importante é que as proteínas agrupam-se em um número limitado de famílias tridimensionais. Estima-se que existam cerca de 5000 famílias protéicas (37), conseqüentemente, quando se conhece a estrutura de pelo menos um representante de uma família, é geralmente possível modelar, por homologia, os demais membros da família.

Baseado nas considerações acima é possível, pelo menos teoricamente e a partir de informações obtidas em Banco de dados disponíveis na Internet, propor uma estrutura tridimensional para proteínas em estudo.

2-OBJETIVOS

Os objetivos do presente estudo foram:

- Purificar, caracterizar e cristalizar a fração giroxina do veneno de *Crotalus durissus terrificus*;
- Construir o modelo molecular teórico da giroxina por meio de bases de dados disponíveis na internet e por meio de programas computacionais específicos.

3-MATERIAL E MÉTODOS

3.1-MATERIAL

O “pool” de veneno puro, filtrado e liofilizado, extraído de serpentes adultas *Crotalus durissus terrificus*, de ambos os sexos e identificadas por microchip, foi gentilmente cedido em quantidade suficiente pelo Centro de Estudos de Venenos e Animais Peçonhentos da UNESP – CEVAP.

3.2-MÉTODOS

3.2.1-Preparação das amostras de veneno crotálico

As amostras de veneno bruto liofilizadas foram suspensas em água Milli-Q e utilizadas nos procedimentos cristalográficos. Para os procedimentos cromatográficos foi utilizado apenas o sobrenadante límpido após diluição em tampão Formiato de amônio 0,05 M pH 3,5.

3.2.2-Obtenção da fração giroxina

Quinhentos miligramas (500 mg) do veneno de *Crotalus durissus terrificus* foram suspensos em tampão Formiato de amônio (0,05 M, pH 3.5) e a seguir fracionados em coluna de gel filtração Sephadex G-75 (110 x 4,0 cm) previamente equilibrada com o mesmo tampão. Foram coletados cerca de 10 mL/tubo em fluxo de ~25mL/h a temperatura ambiente em sistema de coletor de frações LKB-Pharmacia, para a obtenção de suas frações de diferentes pesos.

Posteriormente, para a obtenção da fração giroxina do veneno de *Crotalus durissus terrificus*, os tubos com atividade coagulante foram reunidos (100 mg da fração giroxina concentrada em 5 mL), centrifugados a 12.000 x g por 10 minutos e aplicados em coluna de afinidade Benzamidina-Sepharose 6B (8,5 x 2,5 cm) previamente equilibrada com tampão Tris-HCl 0,05M, pH 7.4 (tampão 1). A eluição foi realizada com 30 mL de Tris-HCl 0,05M, pH 7.4 + NaCl 0,5M (tampão 2) e 20 mL de Glicina 0,02M pH 3,2 (tampão 3) sendo as

frações eluídas em glicina, neutralizadas diretamente no tubo coletor com 400 mL de Tris-HCl 1,0M pH 9,0. O fluxo de coleta foi de 30 mL/hora, sendo 3,0 mL/tubo à temperatura de 25°C aplicado no sistema de cromatografia líquida de alta pressão (HPLC) da AKTA Purifier (Amersham, Pharmacia) segundo metodologia descrita por Raw *et al.* (21). A absorvância das frações coletadas foram determinadas em espectrofotômetro Pharmacia, Ultrospec III à 280 nm.

Para a análise do grau de pureza, aproximadamente 1mg da giroxina foi diluído em 250µL de ácido trifluoracético (TFA) 0,1% (v/v) e submetido em um sistema de RP-HPLC, coluna C-2/18 (2,0 x 25,0cm). A eluição da amostra foi inicialmente realizada em ácido trifluoracético 0,1% (v/v), seguindo com gradiente de concentração linear de acetonitrila 70% em um fluxo de 1mL/min a temperatura ambiente. O pico único de giroxina foi separado e liofilizado para a determinação das propriedades químicas e estruturais.

3.2.3-Determinação quantitativa das proteínas

Para quantificar as proteínas presentes nas amostras, soluções contendo de 5 a 50µg de proteínas, foram submetidas à dosagem pelo método de Bradford (38). A curva padrão foi construída com soroalbumina bovina (SAB), considerando-se o seu coeficiente de extinção molar em 280 nm (0,665). Após a dosagem, o material restante foi separado em alíquotas de 100µg que posteriormente foram liofilizadas e armazenadas a -20° C.

3.2.4-Análise eletroforética

As eletroforeses em gel de poliacrilamida a 14% com agentes desnaturantes (SDS) foram realizadas conforme a técnica descrita por Laemmli (39). Para o gel de separação foram utilizadas as seguintes soluções: Tris-HCl 2M pH 8,8, Acrilamida:Bis 30:0,8, TEMED 1% e persulfato de amônio 1%. Para o gel de empilhamento foram utilizados: Tris-HCl 2M pH 6,8, Acrilamida:Bis 30:08, Temed 1% e persulfato de amônio a 1%. A solução de trizma base 0,025M, glicina 0,192M e SDS 0,1% pH 8,3 foi utilizada como tampão para o cátodo e a mesma solução para o ânodo. As amostras contendo 10µg de

proteínas foram dissolvidas em 20 μ L do tampão STOP (Tris-HCl 0,06M pH 6,8, Azul de Bromofenol 0,001%, Glicerol 10% e 10 μ L de β -mercaptoetanol 10%). Em seguida, as amostras foram aquecidas por 3 minutos a 100°C. A eletroforese foi conduzida a 20 mA, por aproximadamente 50 minutos, até o indicador azul de bromofenol alcançar o final do gel. Terminada a migração o gel foi submetido em coloração por prata seguindo um protocolo da Pharmacia Biotech. O peso molecular foi estimado pelo padrão de peso molecular 7L (Sigma), contendo as seguintes proteínas: soroalbumina bovina (66 kDa), ovoalbumina (45 kDa), gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase (36 kDa), anidrase carbônica (29 kDa), tripsinogênio (24 kDa), inibidor de tripsina (20.1 kDa), α -lactoalbumina (14.4 kDa).

3.2.5-Focalização isoeétrica

A eletrofocalização da serinoprotease isolada e purificada do veneno de *Crotalus durissus terrificus* foi realizada segundo o método descrito por Vestberg (40), com algumas modificações como descrito a seguir. O experimento foi realizado no Departamento de Física e Química da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP, com a colaboração da Profa. Dra. Eliane C. A. Braga. O gel foi preparado a 7% (m/v) em acrilamida (solução estoque: bis-acrilamida 0,8:30), contendo 1,3g de sacarose, 650 μ L de anfólitos (Pharmacia 40% de pl variável de 3,0 a 10,0, 0,17% de TEMED (v/v) e 0,075% de persulfato de amônio (m/v). A solução do gel foi completada para um volume final de 10mL de água destilada e polimerizada em placa de vidro 12X14cm utilizando como suporte uma borracha em forma de U. O gel foi colocado sobre uma placa refrigerada ligada a um banho termostatizado a 4°C. A placa milimetrada foi previamente umedecida com glicerina, para melhor refrigeração do gel. Dois *strips* da Pharmacia Biotech foram utilizados para conectar o gel e os eletrodos de platina, sendo o cátodo embebido em uma solução de NaOH 1M e o ânodo em ácido fosfórico 1M. Os eletrodos de platina foram centralizados sobre as tiras de papel e o sistema então fechado. A fonte de alta voltagem foi ajustada para valores máximos de 500V, 10mA, 3 Watts e 30 minutos para a realização de uma pré-corrida. Em seguida, as amostras

foram aplicadas sempre no cruzamento de duas linhas azuis, exatamente sobre a linha mais central do gel. A fonte foi programada para 1500V, 15mA, 10 Watts e 5h. O final da corrida foi determinado quando a fonte marcasse uma alta voltagem e uma baixa amperagem (cerca de 1mA). Após a focalização isoelétrica, foram seccionados cerca de 1cm de largura (no sentido do comprimento) de cada extremidade do gel e colocados em tubos de ensaio contendo 200 μ L de água destilada para a leitura do pH após 2 horas em repouso. Em seguida, foi construído o gráfico de determinação do gradiente de pH. O restante do gel contendo as amostras foi fixado em solução de ácido tricloroacético por 30 minutos, prosseguindo com a utilização de um kit para coloração por prata seguindo o protocolo da Pharmacia Biotech.

3.2.6-Seqüenciamento N-terminal

A análise da seqüência N-terminal das enzimas purificadas foi realizada em um sequenciador automático de proteínas da Shimadzu (modelo PPSQ-23A). Uma solução com aproximadamente 1mg/mL da enzima foi aplicada no sequenciador e determinado pelo método de degradação de Edman (41).

Para a seqüência da Giroxina purificada, utilizou-se a sua seqüência N-terminal comparando-se a sua homologia de aminoácidos com outras quatro serinoproteases anteriormente seqüenciadas e obtidas no NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) a saber: Trombina símile semelhante à giroxina de *Lachesis muta muta*; Ancrod de *Agkistrodon rhodostoma*; Crotalase de *Crotalus adamanteus* e Giroxina da *Crotalus durissus terrificus*.

As seqüências foram analisadas por alinhamento usando *software* BLAST (42). Estes experimentos foram realizados em colaboração com o Prof. Dr. Andreimar Martins Soares da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo - USP.

3.2.7-Clonagem e seqüenciamento do cDNA

O RNA total foi extraído a partir da glândula venenífera da serpente *Crotalus durissus terrificus* usando o método do Trizol™ conforme especificações do fabricante. Posteriormente, 5,0 μ g do RNA total foram

submetidos à reação de transcrição reversa para a síntese da primeira fita do cDNA da toxina na presença de transcriptase reversa e oligo dT durante 1 hora a 42°C. A segunda fita foi sintetizada utilizando-se 2 µL da reação descrita acima, combinados com os *primers* específicos para enzima, com o objetivo de amplificar o gene de interesse.

Os *primers* usados foram desenhados de acordo com a seqüência N-terminal a partir do RNA de *Crotalus durissus terrificus* pelo método de Trizol™ conforme especificações do fabricante. O produto foi analisado quanto ao tamanho amplificado em gel de agarose a 1,5% e por fim corado com brometo de etídio. A seguir, foi realizada a purificação do produto de PCR utilizando-se o kit *Concert Rapid PCR Purification System* (Gibco BRL), conforme as especificações do fabricante.

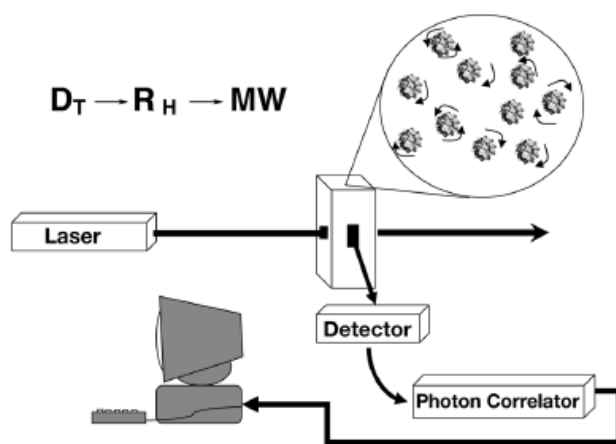
A reação de seqüenciamento foi conduzida a partir do produto purificado usando o kit *ABI Prism Big Dye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction kit* (Perkin Elmer) e a eletroforese no aparelho *ABI Prism 377 DNA Sequencer* (Perkin Elmer), usando gel de poliacrilamida a 4%, uréia 6M. A eletroforese foi conduzida a 1500 V, temperatura de 51° C, durante 7 horas. Os eletroferogramas obtidos foram analisados através do programa *ABI Analysis Data Collection* e as seqüências foram posteriormente analisadas através do programa *Sequencher* versão 3.1.

Estes experimentos foram realizados em colaboração com o Prof. Dr. Andreimar Martins Soares da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo - USP. A seqüência obtida foi analisada quanto à homologia com nucleotídeos e aminoácidos com as seqüências de outras toxinas previamente depositadas no GenBank e no SwissProt pertencentes ao *Protein Data Bank* (PDB). Além disso, foi realizado o alinhamento múltiplo das seqüências de aminoácidos deduzidas a partir do *software* Clustal (43).

3.2.8-Espalhamento dinâmico de luz (DLS)

Os experimentos de DLS (44) foram executados com variação de temperatura de 18, 19, 20, 22, 24, 26, 28, 30 e 32°C para a amostra de Giroxina purificada, em concentração superior a 10 mg/mL utilizando-se o

equipamento de DLS (DynaPro Titan® - Wyatt Technology Corporation, Santa Barbara, CA, USA). As amostras foram solubilizadas em água Mili-Q ou em tampão 50 mM Fosfato salina (PBS) pH 7,5, centrifugadas por 30 minutos a 12.000 x g a 4°C e em seguida filtradas. Volumes de no mínimo 50 µL da amostra foram cuidadosamente aplicados dentro de uma cubeta de quartzo evitando-se a formação de bolhas de ar. Cada amostra foi mensurada 100 vezes e os resultados foram analisados com o *software* Dynamics V6. A análise da amostra pelo feixe de raio laser detecta o coeficiente de translocação difusional, revelando o raio hidrodinâmico da proteína, assim, estimando seu estado de agregação e a percentagem da massa molecular da amostra.



D_T : coeficiente de translocação difusional. R_H : Raio hidrodinâmico. MW : *molecular weight* ou peso molecular. (45)

Figura 2: Sistema de espalhamento dinâmico de luz, demonstrando a análise de uma amostra protéica contida em cubeta, por onde passam feixes de raios laser capazes de detectar os movimentos circulares das proteínas (movimento Browniano), resultando no gráfico de espalhamento de luz.

3.2.9-Cristalização da giroxina

Nos ensaios iniciais de cristalização, utilizou-se da técnica de matriz esparsa (46) pelo método de gota suspensa (*hanging drop*). Esse é o método mais adequado para testes iniciais com um grande número de condições de cristalização, já que utiliza quantidades pequenas de proteína em solução e

facilita a análise dos experimentos (MacPherson, 2003). Dessa forma utilizou-se como amostra a fração giroxina purificada e diluída em diferentes soluções tais como água mili-Q ou tampão fosfato salina 50 mM em concentrações superiores a 10 mg/mL.

Esses conjuntos de poços constituíam-se de placas de acrílico as quais eram armazenadas à temperatura constante de 18° C. Foram realizadas variações nas condições das soluções de cristalização que apresentaram a formação de cristais a fim de se obter cristais mais adequados. Estes foram observados por microscopia óptica e para futura determinação da estrutura molecular por difração de raios-X.

Um volume de 0,5 µL de solução da fração giroxina foi acrescida a 0,5 µL da solução de cristalização presente no poço formando uma gota sobre a lamínula de vidro previamente limpa. A seguir verteu-se a lamínula de cabeça para baixo a fim de que a gota permanecesse suspensa e isolada em um sistema hermeticamente fechado pela graxa de vácuo. Foram utilizadas diferentes soluções provenientes dos Kits de cristalização da Hampton Research® (soluções comerciais “Screen I e II” Hampton Research – Laguna Miguel, CA, USA).

Assim que o cristal foi obtido, este foi recolhido por meio de uma fina alça metálica (loop) e criopreservado na mesma solução de cristalização com glicerol a 20% e mantido em nitrogênio líquido. Após, foi transportado ao Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS), onde os padrões de difração para a proteína cristalizada foram obtidos a partir da captação de raios X difratados pela passagem do feixe de luz de alta energia pela estrutura cristalina. As imagens coletadas foram processadas em *softwares* específicos que relacionam a intensidade dos pontos presentes no padrão molecular aos átomos constituintes da proteína analisada.

3.2.10-Modelagem teórica da giroxina

O modelo teórico foi construído a partir de técnicas de homologia (*threading*), uma vez que a sequência da proteína em questão não possui coordenadas tridimensionais experimentais depositadas no *Protein Data Bank* (PDB). As sequências utilizadas foram obtidas diretamente a partir do banco de

dados da NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) as quais encontravam-se previamente catalogadas com seus respectivos códigos de acesso. Para a obtenção de informações a respeito de sua característica constitutiva tais como, número de aminoácidos, peso molecular estimado e ponto isoelétrico (pI) teórico utilizou-se o *software* ProtParam (47). Os alinhamentos gerados foram obtidos pelos *softwares on-line* disponibilizados pelo *ExPASy Proteomics Server* (<http://www.expasy.org>), como o *Fugue* (48) e o *HHPred* (49).

Para a construção do modelo teórico da giroxina utilizou-se como seqüência alvo, a giroxina-símile B2.1 (*gyroxin-like B2.1 precursor*, gi: 61741494) e como seqüência molde uma serinoprotease proveniente de *Agkistrodon acutus* (AaV-SP I, gi: 49258366) conforme o grau de identidade e homologia determinado pelo servidor HHPred (49). Este procedimento de comparação com as amostras contidas no *Protein Data Bank* foi necessário pois, no momento da realização destes experimentos, o sequenciamento da giroxina purificada não estava ainda solucionado.

A fim de se obter informações estruturais sobre o modelo teórico realizou-se o alinhamento múltiplo comparativo pelo *software* Clustal X2 (43) com outras seis serinoproteases de função semelhante, como demonstrada na Tabela 1.

Com o intuito de se identificar os potenciais sítios de glicosilação da seqüência giroxina símile B2.1 utilizou-se o servidor on-line NetNGlyc 1 (www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc). Por fim, o *software* Modeller (50) foi empregado para a construção do modelo teórico da molécula em questão.

Tabela 1: Nomenclatura das sequências de proteínas utilizadas no alinhamento comparativo, suas espécies de origem e seus respectivos códigos de acesso no NCBI (*National Center for Biotechnology Information*).

Nomenclatura da proteína	Espécie de origem	Código de acesso no NCBI
Batroxobina	<i>Bothrops atrox</i>	gi: 211024
Botrombina	<i>Bothrops jararaca</i>	gi: 545584
Calobina	<i>Gloydus ussuriensis</i>	gi: 1389589
Bilineobina	<i>Agkistrodon bilineatus</i>	gi: 2134238
Venobina A (trombina símile)	<i>Lachesis muta muta</i>	gi: 479945
Ancrod	<i>Agkistodon rhodostoma</i>	gi: 113827

3.2.11-Dinâmica molecular e validação do modelo teórico final

A dinâmica molecular do modelo teórico foi executada pelo *software* GROMACS (*Groningen Machine for Chemical Simulation*) (51), utilizando-se de campos de força mais adequados para cada complexo. Moléculas de água explícitas foram usadas para o cálculo da simulação de dinâmica molecular (DM). Recorreu-se à protonação para a mudança de grupos do modelo em pH 7.0 no qual três íons sódio foram adicionados para neutralizar o sistema em conjunto com o campo de força. A DM foi executada em 10.000 pico segundos (ps) à temperatura de 293°K (20°C) e pressão constante de 1 bar, simulando uma caixa dodecaédrica truncada contendo água. A distância entre cada átomo protéico e a parede da caixa foi de 1.0 nm. O protocolo de algoritmos foi utilizado para gerar a configuração inicial do sistema após a minimização energética. A validação dos modelos foi realizada por intermédio do *software* PROCHECK (52).

3.2.12-Aprovação do projeto de pesquisa pelo Comitê de Ética de pesquisa em Experimentação Animal.

O referido projeto foi certificado pelo CEEA (Comissão de ética na experimentação animal) no dia 28 de agosto de 2008 pelo protocolo n° 691 e está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de experimentação Animal (COBEA).

4-RESULTADOS

4.1-Purificação do veneno de *Crotalus durissus terrificus* por meio da cromatografia líquida de alta pressão (HPLC).

A cromatografia por exclusão de peso molecular em coluna de Sephadex-G75 apresentou seis picos característicos, visualizados na figura 3.

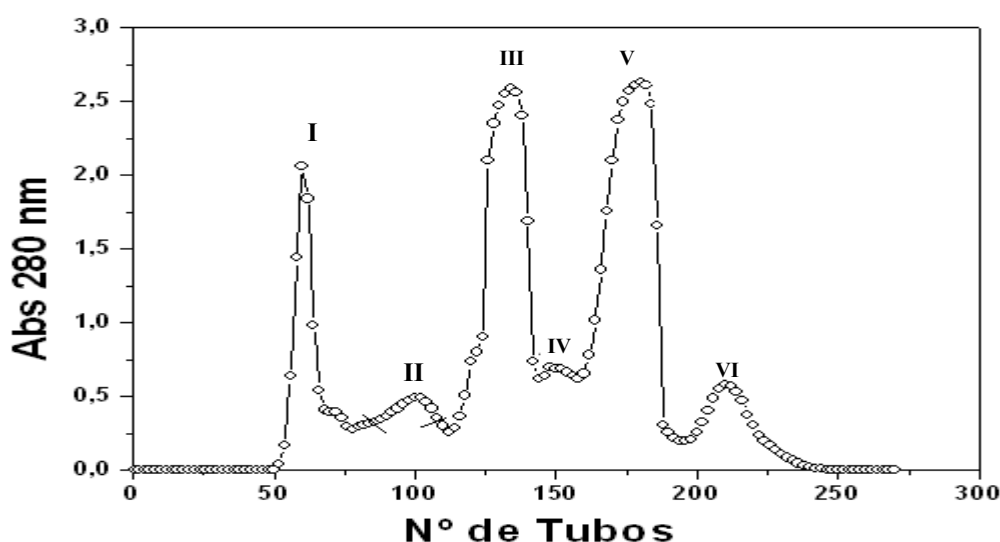


Figura 3: Fracionamento do veneno de *Crotalus durissus terrificus* em coluna de filtração por exclusão de peso molecular em Sephadex G-75 mostrando seis picos característicos, previamente equilibrada com tampão formiato de amônio 50 mM, pH 3,5 e coletados cerca de 10mL/tubo em fluxo de ~25mL/h a temperatura ambiente (25°C).

O monitoramento de todas as frações eluentes foi feito em absorvância de 280 nm e por meio de atividade coagulante sobre o plasma. Os tubos com atividade coagulante, pertencentes ao pico II, foram reunidos e seu conteúdo foi aplicado em coluna de afinidade Benzamidina-Sepharose, o que permitiu uma separação efetiva (purificação) das enzimas coagulantes dos demais componentes do veneno.

A cromatografia de afinidade em coluna de Benzamidine-Sepharose 6B, gerou três picos de serinoproteases designados A, B e C conforme figura 4.

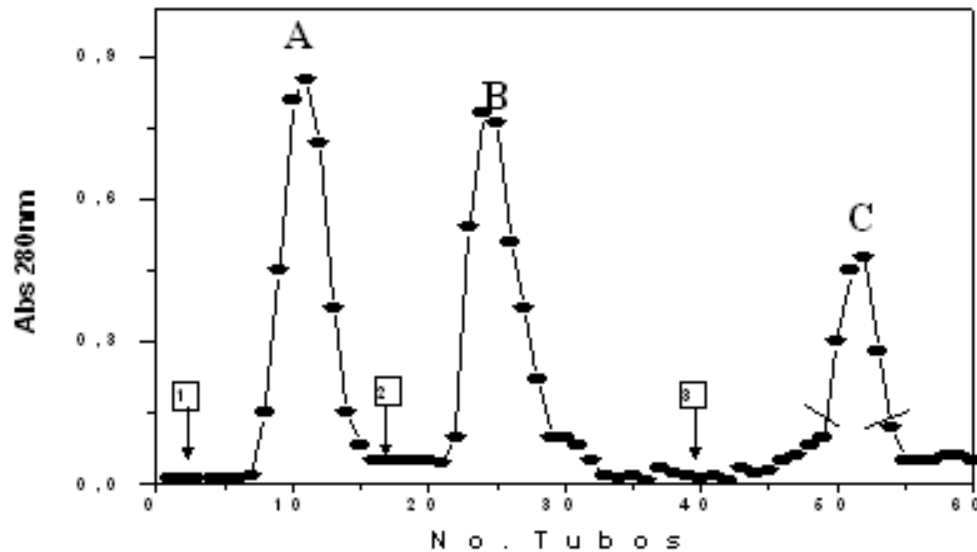


Figura 4: Cromatografia de afinidade em benzamidina-sepharose 6B (8,5 x 2,5 cm) da fração II. A coluna foi equilibrada com o tampão Tris-HCl 0,05M pH 7,4 (Tampão 1). Amostra: 100mg da fração II concentrada em 5mL e centrifugada a 12.000 xg por 10 minutos e aplicada à coluna. A eluição foi feita respectivamente, com 30 mL de Tris-HCl 0,05M pH 7,4 + NaCl 0,5M (Tampão 2) e 20mL de Glicina 0,02M pH 3,2 (Tampão 3), sendo as frações eluídas em Glicina, neutralizadas diretamente no tubo coletor com 400µL de Tris-HCl 1,0M pH 9,0. Fluxo de 30 mL/hora, sendo coletados 3,0mL/tubo a temperatura ambiente (25°C).

4.2-Avaliação do grau de pureza

Os tubos com atividade coagulante, referentes ao pico C da Figura 4, foram reunidos e avaliados em relação ao seu grau de pureza.

A figura 5 revela a avaliação do grau de pureza da serinoprotease isolada e purificada. A análise eletroforética realizada em SDS-PAGE a 13,5% revelou o aparecimento de uma única banda em intensidades diferentes. As bandas 2, 3, 4 e 5 representam as concentrações de 2, 4, 8 e 10 µg da fração purificada respectivamente, conforme o observado na figura 4. Os marcadores padrões de peso molecular são visualizados nos itens 1 e 6 da figura 5A. A focalização isoeétrica para determinação do ponto isoeétrico (pI) da fração purificada foi observada a 5,5, conforme figura 5B. A cromatografia líquida de alta eficiência em coluna de fase reversa revelou um único pico referente à

proteína de interesse que foi eluída em torno de 70 minutos, demonstrando assim, o alto grau de pureza da amostra.

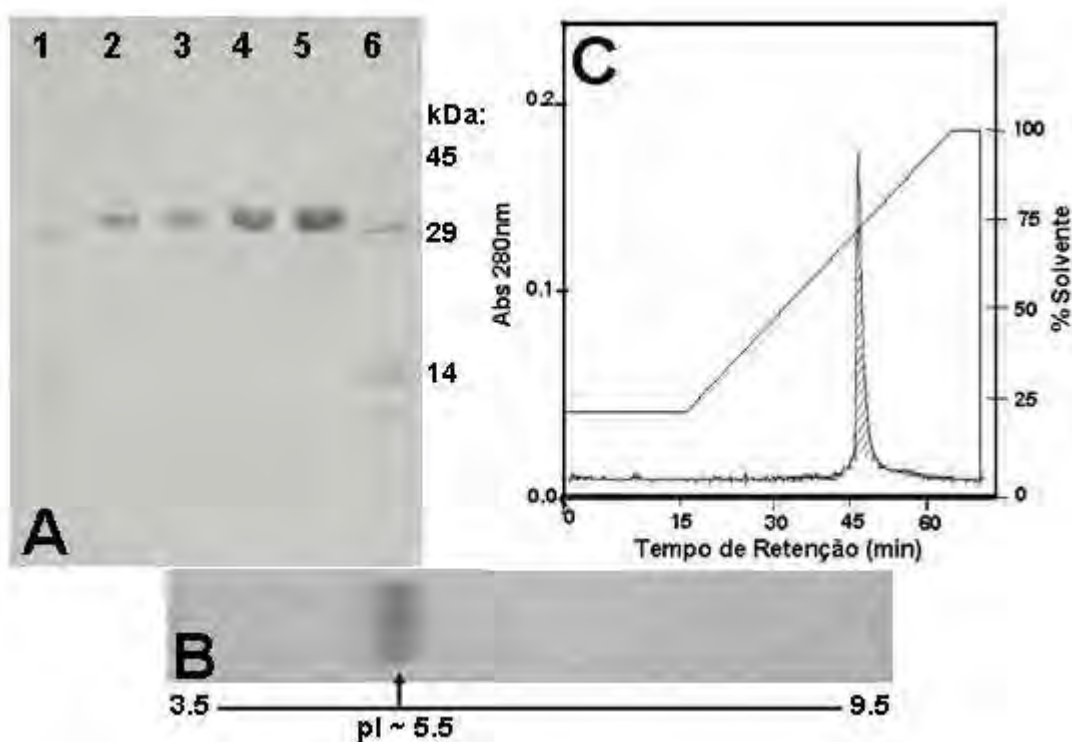


Figura 5. Análise do grau de pureza da serinoproteínase isolada e purificada. (A) Gel de poliacrilamida a 13,5% com agente desnaturante (SDS). Em 1 e 6 - Padrão de Peso Molecular (45, 29 e 14kDa) e em 2 a 5 – Serinoproteínase purificada, 2, 4, 8 e 10µg, respectivamente. **(B)** Focalização isoelétrica para determinação do ponto isoelétrico (pI) da proteína purificada. **(C)** Cromatografia líquida de alta eficiência em coluna de fase reversa C2/C18 (4,6 x 100 mm) de 1mg da proteína purificada. A coluna foi equilibrada nos solventes de corrida (solvente A: acetonitrila 5%, TFA 0,1%; solvente B: acetonitrila 60%, TFA 0,1%) e a eluição seguiu com um gradiente de 0 – 100% de concentração do solvente B, com um fluxo de 1,0mL/min. durante 110 minutos. A proteína de interesse foi eluída em torno de 70 minutos. Os picos foram monitorados na absorvância de 280nm, e registrados por software Dataq (Dataq, Inc.).

4.3-Seqüenciamento N-terminal

Os 20 primeiros aminoácidos foram obtidos da serinoprotease purificada e mostraram uma identidade de 100% com outras serinoproteases previamente depositadas no NCBI (*National Center for Biotechnology Information*). Foram elas: Proteína trombina símile de *Lachesis muta muta*, Ancrod (proveniente de *Agkistrodon rhodostoma*), Crotalase (proveniente de *Crotalus adamanteus*) e a Giroxina de *Crotalus durissus terrificus*. A figura 6 revela estes resultados.

	10	20	30	40	48
1 Lmm	VIGGDECNIN	EHRFLVALYD	GLSG-TFLCG	GTLINQEWVL	TAQHCNRS
2 Anc	VIGGDECNIN	EHRFLVALYD	GTNW-TFICG	GVLHPEWVL	TAEHCARR
3 Cro	VIGGDECNIN	EHRFLVALYD	YWXQ-XFL		
4 Gyr	VIGGDECNIN	EHRFLVALYE	YWS-ESFL	CGG	
5 Gir	VIGGDECNIN	EHRFLVALYE			

Figura 6. Comparação entre as seqüências N-terminais do sequenciamento da (1-Lmm) *thrombin-like* análoga a giroxina de *Lachesis muta muta*, (2-Anc) Ancrod de *Agkistrodon rhodostoma*, (3-Cro) Crotalase de *Crotalus adamanteus* e (4-Gyr) Giroxina da *Crotalus durissus terrificus* e (5-Gir) a seqüência obtida por meio do seqüenciamento realizado na giroxina por nós purificada.

Diante destes resultados, podemos então classificar a serinoprotease isolada e purificada do veneno de *Crotalus durissus terrificus* como giroxina.

4.4-Clonagem e seqüenciamento do cDNA

Foi obtida a seqüência completa de cDNA da giroxina por meio de RT-PCR, o qual apresentou 714pb codificados para uma proteína completa contendo 238 resíduos de aminoácidos. O sequenciamento direto a partir da região N-terminal da enzima (seqüência: VIGGDECNINEHRFLVALYE) confirmou que a seqüência cDNA obtida realmente codificou para esta enzima isolada do veneno de *Crotalus durissus terrificus* conforme figura 7. A massa

molecular e pl teóricos calculados foram de 26.690 e 6.1 respectivamente conforme análise do *software* ProtParam (47).

```
gtcattggaggagatgaatgtaacataaatgaacatagattcctttagccttgtatgaa
V I G G D E C N I N E H R F L V A L Y E
tattgggtctcagagttttctctgcggtgggactttgatcaacggggaatgggtgctcact
Y W S Q S F L C G G T L I N G E W V L T
gctgcacactgcgacaggaaacatatcttaataacggttggtgtgcatgaccgaagtgtg
A A H C D R K H I L I Y V G V H D R S V
caatttgacaaggagcagagaagattcccaaaagagaagtactttttaactgtagaaat
Q F D K E Q R R F P K E K Y F F N C R N
aactttaccaaatgggacaaagacatcatgttgatcaggctgaacaaacctgttagttac
N F T K W D K D I M L I R L N K P V S Y
agtgaacacatcgcacctctcagcttgccttcagccctccattgtgggatcagtttgc
S E H I A P L S L P S S P P I V G S V C
cgtgttatgggatggggtacaatcaaattcctcaagagactttgcctgatgtccctcat
R V M G W G T I K S P Q E T L P D V P H
tgtgctaacattaacctacttgattatgaagtgtgtcgaacagctcaccacaatttcgg
C A N I N L L D Y E V C R T A H P Q F R
ttgccagcgacaagcagaatattgtgtgcagggtgtcctggaaggagcatagatacatgt
L P A T S R I L C A G V L E G G I D T C
catcgtgactctgggggaccctcatctgtaatggagaattccagggcattgtatcttgg
H R D S G G P L I C N G E F Q G I V S W
ggagacgggtccttgtgccaaccggataagcctgccctctacagcaaggctcttcgatcat
G D G P C A Q P D K P A L Y S K V F D H
cttgactggatccagaacattattgcaggaagtgaaactgtgaattgccctcgtga
L D W I Q N I I A G S E T V N C P S -
```

Figura 7. cDNA completo de giroxina obtido a partir do RNA total extraído de glândula de veneno de *Crotalus durissus terrificus* por meio da técnica RT-PCR.

4.5-Espalhamento dinâmico de luz (DLS)

A amostra da giroxina na concentração de 1mg/mL foi diluída em 60 µl de tampão fosfato salina 50 mM (PBS) e analisada para uma variação de temperatura de 18, 19, 20, 22, 24, 26, 28, 30 e 32°C. Obteve-se um resultado mais adequado para a análise da giroxina em solução tampão fosfato salina 50 mM à temperatura de 28°C devido a baixa polidispersividade (11,6%) e a alta quantia de massa analisada (99.7%). Sua massa molecular foi estimada em 27 kDa conforme figura 8.

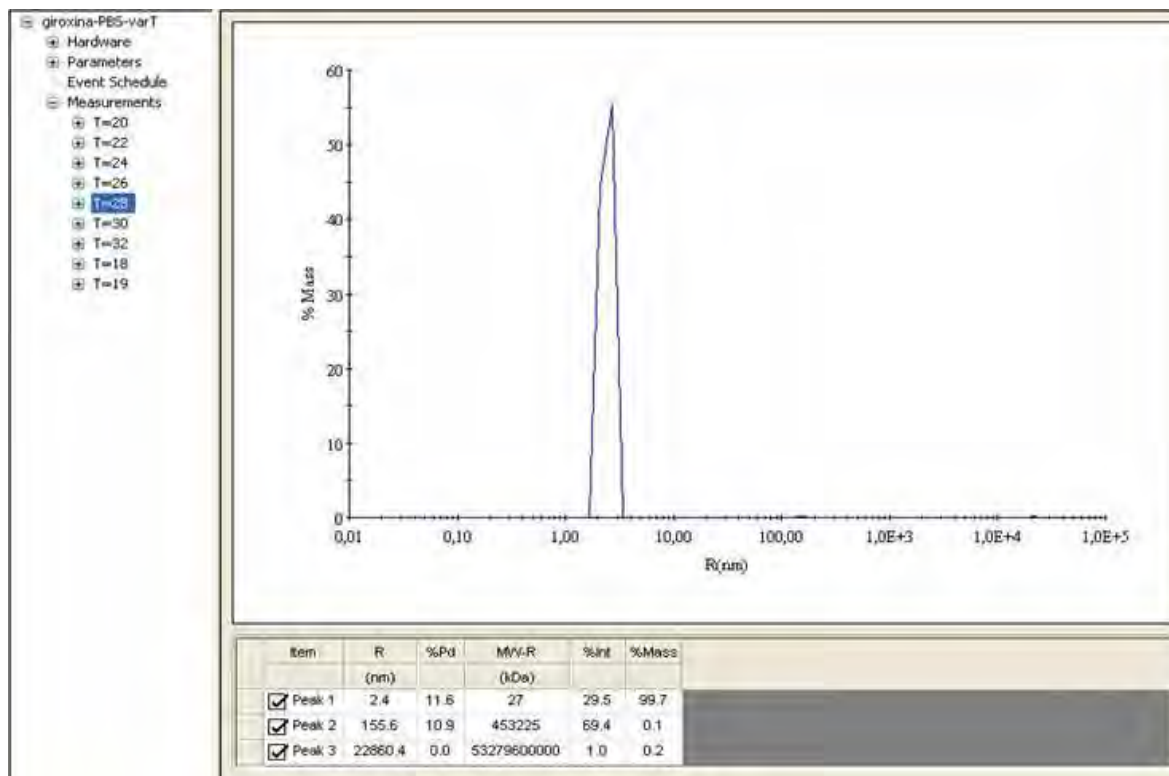


Figura 8: Análise pelo teste de Espalhamento dinâmico de luz pelo *software* Dynamics V6 (44) da giroxina isolada e purificada do veneno de *Crotalus durissus terrificus* tendo sua massa molecular estimada em 27 kDa.

4.6-Cristalização da giroxina

A figura 9 mostra um cristal da giroxina, proveniente da solução n°2 do Kit Crystal Screen 2 da Hampton Research® constituída de 0.5 M Cloreto de sódio, 0.01M Cloreto de magnésio hexaidratado e 0.01 M Brometo de hexadecitrimetilamônio. Posteriormente com o intuito de se avaliar a sua constituição utilizou-se o corante Isit® (Figura 10). A partir desta coloração, pode-se revelar que a amostra testada tratava-se de um cristal de constituição protéica.

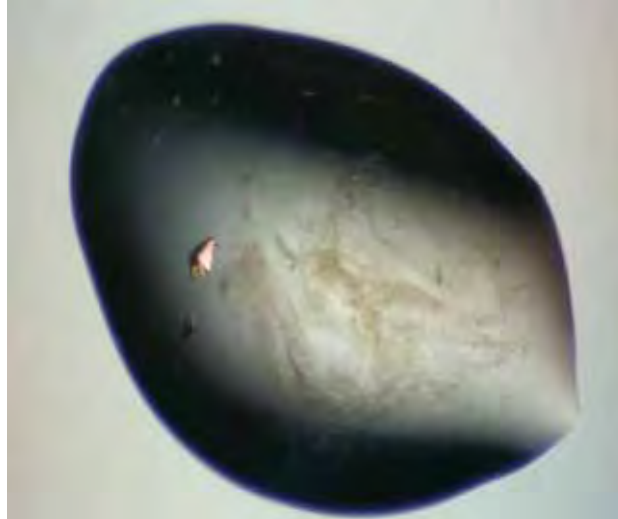


Figura 9. Cristal da gioxina isolado e purificado do veneno de *Crotalus durissus terrificus* obtido após 60 dias de observação a partir de técnica de cristalização por gota suspensa “*hanging drop*”.

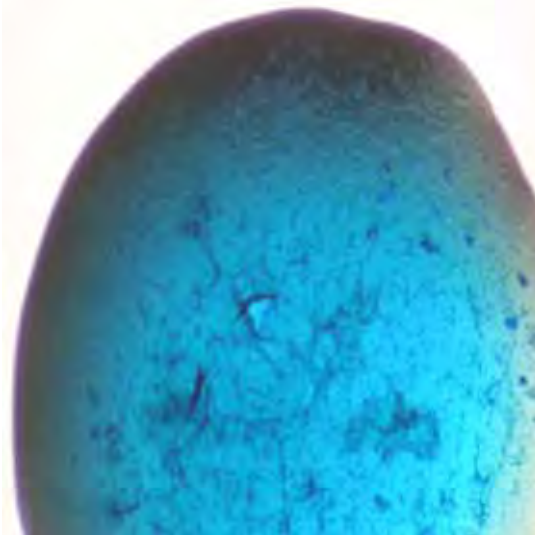


Figura 10. Cristal da gioxina isolado e purificado do veneno de *Crotalus durissus terrificus* corado com Isit[®]

A figura 11 mostra um cristal de gioxina, formado a partir de sua incubação com a solução n° 5 do Kit Crystal Screen 1 – Hampton Research[®] constituída de 0.2 M Citrato de sódio, 0.1 Tris HCl pH 7.5 e 30% de 2,2-metil 4-pentanodiol (MPD).



Figura 11. Cristal da gioxina isolado e purificado do veneno de *Crotalus durissus terrificus* incubado durante 120 dias de observação, obtido com a solução n° 5 do Kit Crystal Screen 1(Hampton Research®) constituída de 0.2 M Citrato de sódio, 0.1 Tris HCl pH 7.5 e 30% de 2,2-metil 4-pentanodiol (MPD).

Posteriormente o cristal foi recolhido e mantido criopreservado em nitrogênio líquido. Em seguida foi levado para difração de raios-X no Laboratório Nacional de Luz Síncroton (LNLS – Campinas/SP). A partir desta análise, foi possível obter o padrão de difração para o cristal conforme figura 12. A distribuição concêntrica uniforme do espalhamento dos feixes de raios-X e o valor de 3.5 Å para a imagem do padrão de difração revelaram que a constituição do cristal coletado é protéica.

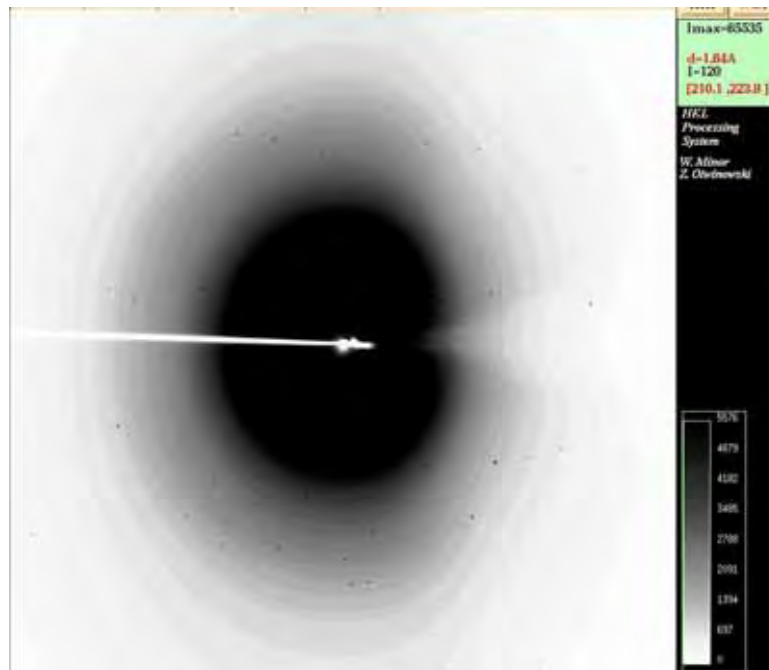


Figura12. Padrão de difração para a giroxina isolada e purificada do veneno de *Crotalus durissus terrificus* obtido a partir da solução n° 5 do Kit Crystal Screen1.

4.7-Modelagem teórica da fração giroxina do veneno de *Crotalus durissus terrificus*

4.7.1-Informações sobre a sequência alvo giroxina símile B2.1 de interesse, gerada pelo software computacional ProtParam

A sequência catalogada proveniente de cDNA de glândulas de veneno de *Crotalus durissus terrificus* designada como giroxina símile B2.1 (*Gyroxin-like B2.1*, gi: 61741494) foi obtida a partir do banco de dados de acesso público *Protein Data Bank* (PDB) e analisada pelo software ProtParam (47) conforme figura 13.

```

      10      20      30      40      50      60
VIGGDECNIN ERNFLVALYE YWSQSFLCGG TLINGEWWLT AAHCDRKHIL IYVGVHDRSV

      70      80      90     100     110     120
QFDKEQRRFP WKEKYFFNCRN NFTKWDKDIM LIRLNKPVSY SEHIAPLSLP SSPPIVGSVC

      130     140     150     160     170     180
RVMGWGTIKS PQETLPDVPH CANINLLDYG VCRTAHPQFR LPATSRILCA GVLEGGIDTC

      190     200     210     220     230     240
HRDSGGPLIC NGEFQGIVSW GDGSCAQPDK PALYSKVFDH LDWIGNIAG SETVNCPS

```

Figura 13. Composição e localização dos aminoácidos da seqüência alvo giroxina símile B2.1 obtida no PDB e posteriormente analisada pelo *software* ProtParam.

Portanto, a partir destas análises, foi possível conferir à giroxina um número de aminoácidos de 238, seu peso molecular estimado em 26585.3 e seu *pI* teórico de 6.24.

4.7.2-Alinhamento múltiplo de seqüências comparativas com seqüência alvo giroxina símile B2.1 utilizando o *software* Clustal X2

A estrutura previamente catalogada como giroxina símile B2.1 (n° 4) foi alinhada com outras seis seqüências de serinoproteinases sendo: Batroxobina (n° 1), Botrombina (n° 2), Calobina (n° 3), Bilineobina (n° 5), Trombina *símile* de *Lachesis muta muta* (n° 6) e Ancrod (n° 7) a fim de se obter informações estruturais sobre a presença de sítios de atividade específica ao fibrinogênio designados S1 e S2, detecção do loop 90, sítios hidrofóbicos e sítios carregados positivamente. Os alinhamentos são mostrados como idênticos (*), alta similaridade (:) e baixa similaridade (.) conforme figura 14.

```

                                16  20      30      40
1 Batroxobina |-----VIGGDECDINEHPFLAFMYYS--RYFCGMTLI
2 botrombina  |-----VIGGDECDINEHPFLAFMYYS--QYFCGMTLI
3 calobina    |-----VIGGDECNINEHRFLVALYNSRRTLFCGGTLI
4 giroxina B2.1 |-----VIGGDECNINERNFLVALYEYWSQSFLCGGTLI
5 bilineobina |-----IIGGDECNINEHRFLVALYDVWVSGSFLCGGTLI
6 trombina-simile |-----VIGGDECNINEHRFLVALYDGLSGTFLCGGTLI
7 ancrod      |-----VIGGDECNINEHRFLVAVYEGTNWTFICGGVLI
                                :*****:***: **: :*      :** .**

                                50      57      70      80      90      100      110      120
                                .          .          .          .          .          ▼          ▼
NQEWWLTAACHNRRFMRIHLGKHAGSVANYDEVVRYPKKFCIPNKKKNVITDKD IMLIRLDRPVKNSEHIAP
NQEWWLTAACHCDKTYMRIYLG IHTRSVANDDEVIRYPKEKFCIPNKKKNVITDKD IMLIRLNRPVKNSTHIAP
NQEWWLTAACHCERKNFRILKGIHSHKVPNEDEQTRVPKEKFFCLSSKNYTLWDRK IMLIRLDSPVSMSEHIAP
NGEWWLTAACHDRKHILYVGVHDSVQFDKEQRRFPKEKYFFMCRNNTFKWDRK IMLIRLNKPVSYSEHIAP
NQEWWLTAACHNMSNIYIYLG MHNQSVQFDDEERRYPKKYLFRCSKNFTKWDRK IMLIRLNKPVSRNSEHIAP
NQEWWLTAACHNRSMLNIYIYLG MHNKNVKFDDEQRRYPKKKYFFRCNKNFTKWDED---IRLNRPVRFSAHIEP
HPEWVITAACHCARRRMNLVFGMHRKSEKFDDEQERYPKKRYFIRCNKTRTSWDED IMLIRLNKPVNMSEHIAP
: **:* ** * : : . * * . . * * **::: : . . *:* ***: ** * ** *

                                130      140      150      160      170      180      190
                                LSLPSNPPSVGSGVCRIMGWGAITTS EDTYPDVPHCANINLFNNTVCREAY--NGLPA--KTL CAGVLQGGIDT X
                                SSLPSPPVGVSSCRIMGWGAITTS EDTYPDVPHCANI INLFNNTVCREAY--NGLPA--KTL CAGVLQGGIDT
                                LSLPSSPPVGVSGVCRIMGWGRISPTKETYPDVPHCANINLLEYEMCRAPYPEFGLPATSRILCA-ILEGGKDT
                                LSLPSSPPIVGSVCRVMGWGTIKSPQETLPDVPHCANINLLDYGVCRTAHPQFRLPATSRILCAGVLEGGIDT
                                LSLPSSPPIVGSVCRVMGWGTITSPNETLPDVPRCVNINLFNYTVCRGVFP--R LPERSRILCAGVLEGGIDT
                                LSLPSNPPSEDSVCRVMGWGQITSPPETLPDVPHCANINLFNYTVCRGAYP--RMPT--KVL CAGVLEGGIDT
                                LSLPSNPPIVGSDCRVMGWGSINRRIDVLSDEPRCANINLHNFMTMCHGLFR--KMPPKKG RVLCAGDLRGRRDS
                                :****.* * . * **:* ** * . . . * *:* .*** : : * . : * : ** . * * * :

                                200      210      220      230      240      250
                                CGGDSGGPLICNGQFQGGILSWGSDPCAEPKRFAYTKVFDYLPWIQSIIAGNKTATCP-
                                CGDSSGPLICNGQFQGGISWGDSPDCAEPKRFAYTKVFDYLPWIQSIIAGNKTATCPP
                                CRGDSGGPLICNGQFQGIASWGD DPCAQPHKPAAYTKVFDHLDWIQSIIAGNTDASCPP
                                CHRDSGGPLICNGEFQGI VSWG DGSCAQPDKPALYSKVFDHLDWIQNIIAGSETVNCPS
                                CKRDSGGPLICNGQFQGI VSWGPKRCAQPRKPAALYSKVFDHLDWIQSIIAGNKTVNCP-
                                CNRDSGGPLICNGQFQGI VFWPDP-CAQPKPGVYTKVFDYLDWIQSVIAGNTTCS---
                                CNSDSGGPLICNEELHGIVYRGNPCAQPNKPAALYTSIYDYRDWVNNVIAGNATCSP--
                                * ***** :::** **:* ** .*::: : *:::***. .

```

Figura 14. Alinhamento de seqüências múltiplas da giroxina *similar* B2.1 comparadas com seis outras serinoproteases usando o Clustal X2 (43). Os espaços indicados por traços representam regiões sem aminoácidos. Sítios ativos estão marcados em negrito, sítios específicos S1 e S2 (X), o loop 90 (C93-W99) sublinhado para a giroxina *similar* B.1 e marcado em vermelho para a enzima trombina *similar* de *Lachesis muta muta*, sítios hidrofóbicos (▼) e sítios carregados positivamente (•). Numeração de acordo com o quimiotripsinogênio (53).

4.7.3-Referências de alinhamento da sequência homóloga pelos softwares ExPASy e HHPred para a sequência alvo giroxina símile B2.1

Os alinhamentos foram gerados pelos softwares *on-line* disponibilizados pelo *ExPASy Proteomics Server* (<http://www.expasy.org>) e pelo servidor HHPred (48). Dessa forma escolheu-se, como sequência molde, a serinoprotease proveniente de *Agkistrodon acutus* (código de acesso: 1op0). Esta seqüência foi baseada nos valores de parâmetro pelo HHPred (48) mais adequados tais como: probabilidade de alinhamento (100%), a ausência de erros de alinhamento ao acaso (E-value = 0%), pontuação (Score = 353.45) o número de aminoácidos alinhados (234), identidade de 60% e similaridade (1.093) com a sequência giroxina símile B2.1

A partir destes resultados obteve-se a estrutura observada na figura 15 que serviu de molde para a criação do modelo teórico da fração giroxina do veneno de *Crotalus durissus terrificus*. Seus dados cristalográficos foram de 2.00 Å de resolução, R-Value = 18% (obs.), R-free = 20.8% e pertence ao grupo espacial P2₁2₁2₁. Tais informações foram obtidas no servidor RCSB do *Protein Data Bank*.

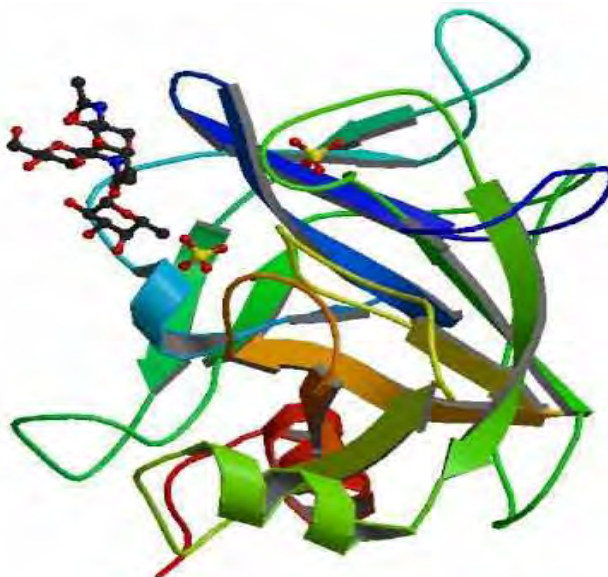


Figura 15: Modelo estrutural de referência da serinoprotease proveniente de *Agkistrodon acutus* (54) obtida pelo HHPred para a criação do modelo teórico da fração giroxina do veneno de *Crotalus durissus terrificus*.

4.7.4-Determinação dos potenciais sítios de glicosilação da seqüência alvo giroxina símile B2.1

A determinação dos potenciais sítios de glicosilação para a seqüência alvo giroxina símile B2.1 foi realizada pelo servidor NetNGlyc 1 (www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc). A análise apresentou um potencial sítio de glicosilação sendo determinado pela seqüência de aminoácidos: Asn-X-Thr/Ser localizando-a assim no aminoácido Asn81, conforme a figura 15.

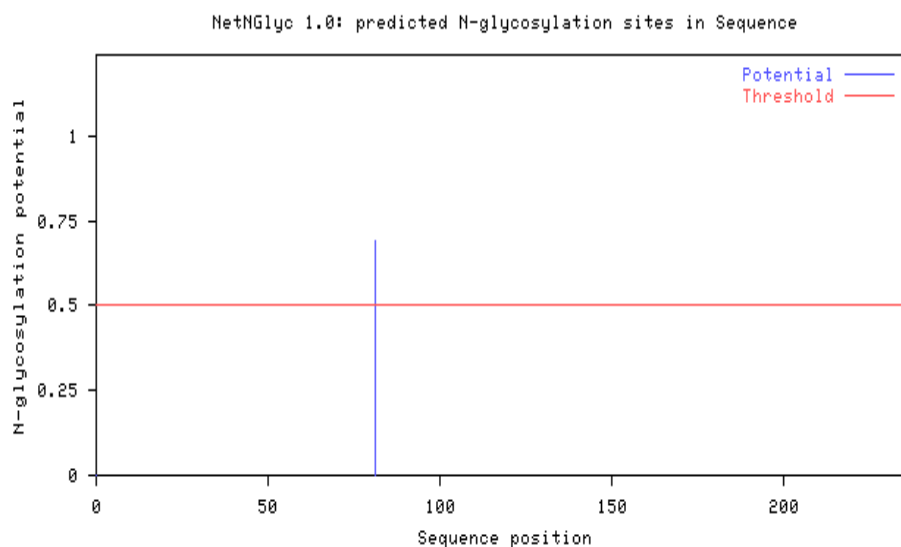


Figura 16. Representação da localização do potencial sítio de glicosilação da seqüência alvo giroxina símile B2.1.

4.7.5-Construção do modelo teórico da fração giroxina do veneno de *Crotalus durissus terrificus*

A modelagem teórica da giroxina do veneno de *Crotalus durissus terrificus* foi realizada pelo *software* Modeller (50) e a visualização do modelo teórico pelo *software* PyMOL (55). Dessa forma, a Figura 17 mostra o modelo estrutural concebido, o qual se revelou como um estrutura globular monomérica, apresentando duas estruturas alfa-hélice (vermelho), contendo os resíduos 146-152 e 215-227, duas estruturas β -barris formada por seis folhas anti-paralelas (amarelo) e loops (verde), cinco pontes dissulfeto (azul) e a tríade catalítica (laranja).

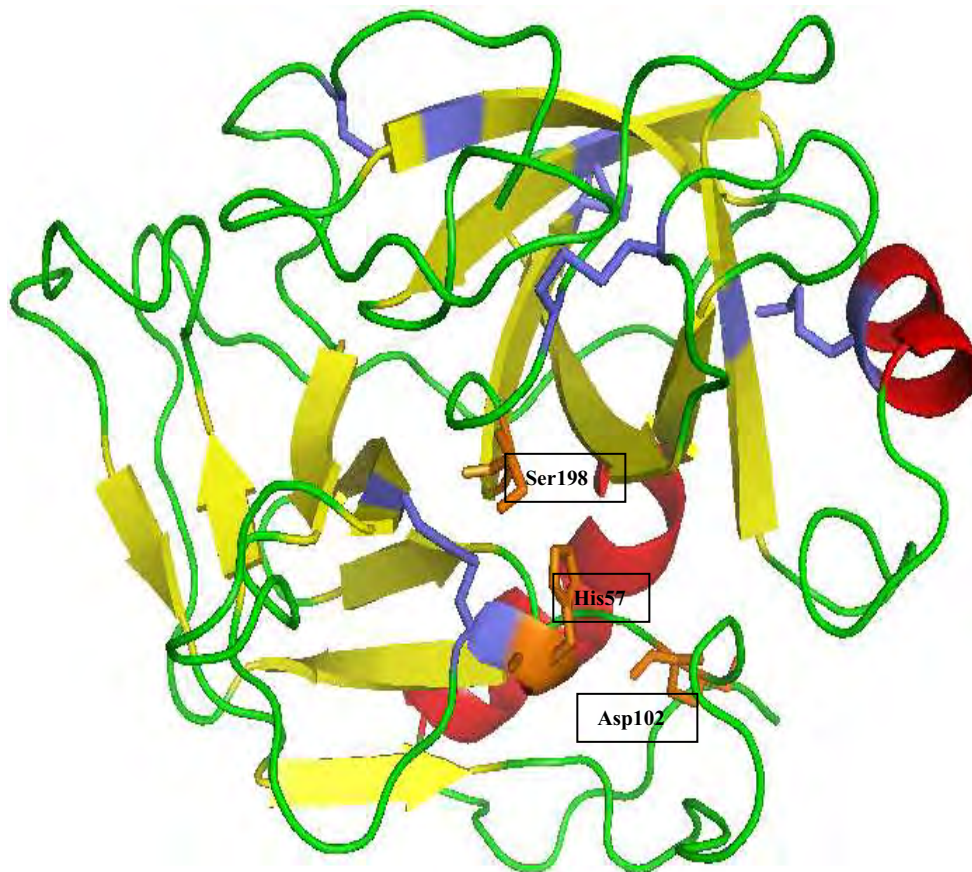


Figura 17: Estrutura teórica da proteína giroxina proveniente do veneno de *Crotalus durissus terrificus* visualizada pelo software PyMOL (55), revelando-se como estrutura globular monomérica, apresentando duas estruturas alfa-hélice (vermelho), contendo os resíduos 146-152 e 215-227, duas estruturas β -barris formada por seis folhas anti-paralelas (amarelo) e loops (verde), cinco pontes dissulfeto (azul) e a tríade catalítica (laranja).

4.7.6-Dinâmica molecular e validação do modelo teórico final da fração giroxina do veneno de *Crotalus durissus terrificus*

A simulação da dinâmica molecular foi realizada pelo software GROMACS (*Groningen Machine for Chemical Simulation*) e pelo programa ProSa2003 (56) gerando dois gráficos. Foram analisadas as variações da oscilação estrutural em um intervalo de tempo de 10000 pico-segundos (ps), o qual apresentou uma tendência de estabilização a partir de 3000 ps (figura 18) com oscilações de 0.1 nm. As oscilações dos resíduos de aminoácidos estão representadas na figura 19, sendo a maior oscilação presente nos resíduos 50-

70 e 170. As figuras 18 e 19 mostram o tempo de estabilização e os resíduos mais oscilantes da estrutura teórica da giroxina. A figura 20 mostra as regiões estruturais de maior oscilação para o modelo teórico da fração giroxina, predizendo assim o seu comportamento em condições específicas para a dinâmica molecular que visa simular condições “in vivo”.

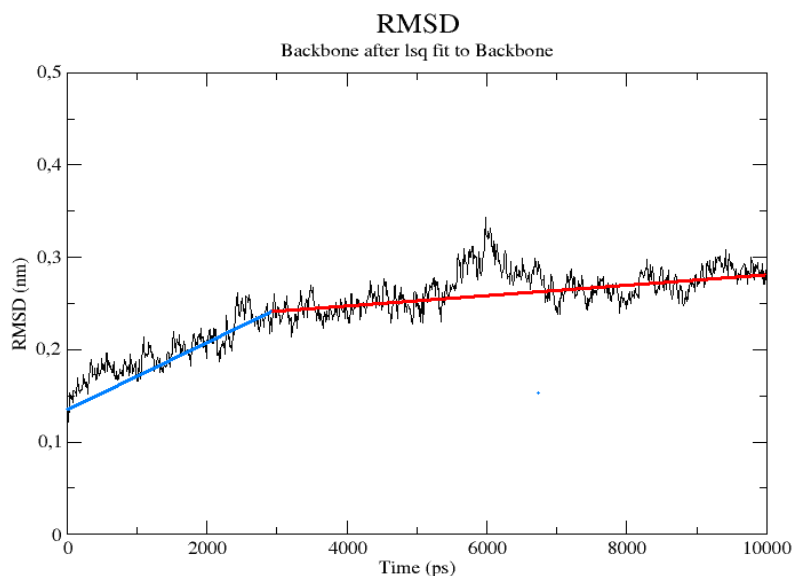


Figura 18. Padrão de desvio médio da oscilação da estrutura teórica do modelo teórico da giroxina em nanômetros (*backbone*) para 10.000 picossegundos. Linhas de variação média em ascensão (azul) e estabilização oscilatória (vermelha).

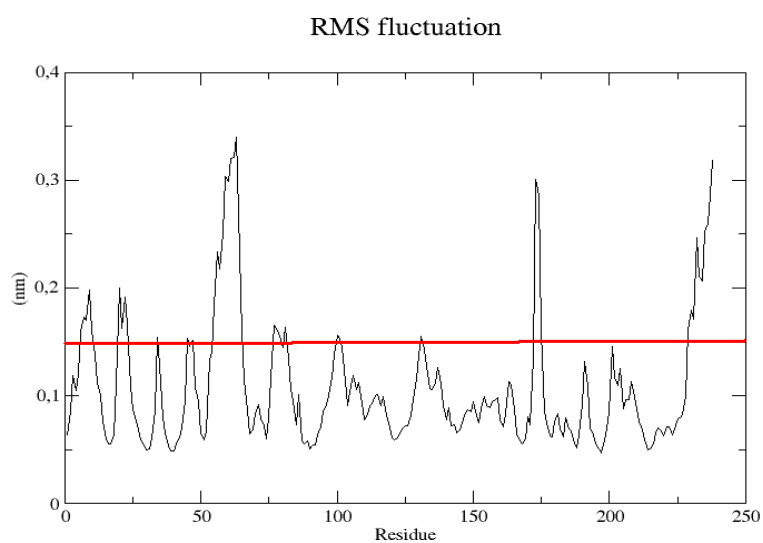


Figura 19. Padrão da oscilação da posição dos resíduos de aminoácidos que compõem estrutura teórica (*backbone*) do modelo teórico da giroxina para variação média de 0,15 nm (linha vermelha).



Figura 20. Regiões de maior oscilação observadas após dinâmica molecular (lilás) para a estrutura teórica da fração giroxina. Estrutura visualizada pelo software PyMOL (55).

5-DISCUSSÃO

A purificação de moléculas presentes nos venenos de serpentes exige critérios e técnicas padronizadas de manipulação. A amostra final deve ter qualidade, ou seja, grau de pureza além de manter sua atividade original. Portanto, os ensaios de purificação devem proporcionar à amostra de veneno o mínimo de alterações na sua composição e conseqüentemente em suas atividades biológicas. O conhecimento da estrutura primária das proteínas dos venenos animais, e principalmente da composição de aminoácidos, devem ser levadas em consideração na indicação dos métodos cromatográficos (cromatografia de troca iônica, filtração, afinidade, etc.) a serem utilizados.

O processo de purificação realizado neste estudo apresentou dois passos cromatográficos distintos, a saber: gel filtração em sephadex G-75 seguida de afinidade em benzamidina-sepharose 6B. A partir do processo de gel filtração foi possível obter seis picos característicos de separação do veneno de serpentes *Crotalus durissus terrificus* (C.d.t.). Seki *et al.* em 1979 (21) e Raw *et al.* em 1986 (20) descreveram este perfil que pode ser respectivamente compatível com as moléculas de (I) convulxina, (II) giroxina, (III) crotoxina, (IV) inter-cro, (V) crotamina e (VI) peptídeos.

Diante disso, os tubos contendo amostras com atividade coagulante, referentes ao pico II da cromatografia de gel filtração descrita acima, foram reunidos e aplicados em coluna de afinidade benzamidina-sepharose 6B, específica para serinoproteases, de acordo com o método descrito e proposto por Alexander *et al.* (57).

Este novo processo resultou em três picos distintos conforme a eluição pela glicina, sendo, portanto, revelado três serinoproteases. Estes resultados diferem dos encontrados por Alexander *et al.* (57), que obtiveram apenas dois picos protéicos após a eluição com benzamidina. Estes autores (57) verificaram também que somente o segundo e menor pico apresentou atividade coagulante trombina *símile* característica da giroxina. Os tubos que apresentaram atividade coagulante, referentes ao pico C da figura 4 do presente estudo, foram reunidos e avaliados em relação ao seu grau de pureza.

Este processo cromatográfico modificado permitiu o isolamento de outros dois picos (A e B da figura 4) que não apresentaram atividade

coagulante. No entanto, estes podem representar importantes serinoproteases isoladas do veneno de *C.d.t.* e ainda não descritas. Estudos cristalográficos posteriores, a fim de se conhecer a estrutura e função dessas proteínas, deverão ser realizados e poderão esclarecer esta dúvida.

A avaliação do grau de pureza da amostra isolada e purificada do veneno de *C.d.t.* com atividade coagulante foi realizada por meio do seu perfil eletroforético, focalização isoelétrica e cromatografia líquida de alta eficiência em coluna de fase reversa C2/C18 conforme observado na figura 5.

A eletroforese vem sendo um método de identificação de proteínas utilizado e padronizado desde 1970 (39), sendo uma das principais técnicas empregadas na investigação bioquímica. Trata-se de um método barato, rápido, de fácil execução e geralmente empregado como primeiro método de análise de proteínas. Seki *et al* em 1979 (21), Raw *et al.* em 1986 (20) utilizaram a técnica de eletroforese para a visualização da amostra pura de giroxina isolada e purificada do veneno de *C.d.t.* Esta se apresentou como uma proteína de cadeia única, com massa molecular estimada em 34 kDa. A figura 5A obtida neste experimento revelou um peso molecular em torno de 29 KDa para a giroxina, resultados estes diferentes dos autores acima referidos. Esta diferença poderia ser explicada pelo fato de que as diversas enzimas trombina símile encontradas nos venenos de serpentes apresentem variação no seu conteúdo glicosilado (10).

Estudos recentes conduzidos por de Oliveira *et al.* (58) obtiveram a giroxina por meio de gel filtração seguida de troca-iônica. Neste último processo obtiveram três picos distintos. Apenas o pico II, de maior concentração, foi o único a apresentar atividade coagulante, diferindo, portanto dos resultados encontrados no presente estudo. Isto pode ser explicado devido a utilização de diferentes protocolos de purificação. Deve-se salientar que, os autores acima referidos (20, 21, 57) encontraram o peso molecular da giroxina purificada de aproximadamente 30 Kda corroborando com nossos resultados.

O ponto isoelétrico (pI) de aproximadamente 5,5 da serinoprotease purificada indica que a mesma possui sua apresentação em pH ácido, concordando com outros estudos que indicam que as serinoproteases apresentam PI variável entre 4,6 a 6,6. (10).

A figura 5C, obtida por meio da cromatografia líquida de alta eficiência em coluna de fase reversa C2/C18, revelou um único pico eluído demonstrando assim o elevado grau de pureza da proteína purificada. Estes resultados habilitaram a amostra para continuidade dos estudos estruturais e cristalográficos.

Com o objetivo de se mostrar que a proteína isolada e purificada a partir de veneno de *Cdt* tratava-se realmente da giroxina, foi realizado o seqüenciamento dos 20 primeiros aminoácidos N-terminal da mesma. Os resultados obtidos mostraram uma identidade de 100% com a proteína (giroxina de *Cdt*) previamente depositada no banco de dados internacional. Também foi comparada a outras serinoproteases tais como o Ancrod (de *Agkistrodon rhodostoma*), a Crotalase (de *Crotalus adamanteus*) e a proteína análoga encontrada em *Lachesis muta muta* (Figura 6) obtendo uma identidade de 50 a 60% com estas (59).

Estes resultados em seu conjunto sugerem que os protocolos de purificação utilizados para o isolamento e purificação da giroxina foram eficientes e garantiram a integridade estrutural desta proteína.

Outra forma de obtenção da proteína desejada é a sua expressão, clonagem e seqüenciamento por meio de técnicas moleculares. As bibliotecas de cDNA consistem em coleções de clones recombinantes de cDNA derivados de toda a população de RNAs mensageiros das células ou do tecido de interesse no momento da coleta (60). Nos últimos anos diversos autores relataram em seus trabalhos o uso de bibliotecas de cDNA construídas a partir de moléculas de mRNA presentes em glândulas de peçonhas de serpentes de diferentes espécies. Uma vez obtida a coleção de cDNA desejada, moléculas específicas podem ser isoladas, assim como podem ser realizados levantamentos detalhados da variabilidade de toxinas presentes em diferentes peçonhas (61, 62, 63).

A possibilidade de se encontrar novas moléculas em bibliotecas de cDNA de glândulas de peçonha de serpentes, com potencial aplicação clínica, é muito elevada. A produção dessas proteínas em grandes quantidades na forma recombinante facilitaria significativamente seu estudo, bem como suas aplicações terapêuticas. Junqueira de Azevedo & Ho (62) relataram a construção de um biblioteca de cDNAs a partir de glândulas de peçonha de

Bothrops insularis. Os cDNAs originados de mRNAs presentes na glândula de veneno foram ligados a plasmídeos e seqüenciados, totalizando 610 clones reunidos em 297 clusters, permitindo-se identificar 210 produtos gênicos. Deste número de clusters, 85 correspondiam as seqüências de toxinas, a saber: 23% metalopeptidases; 11,1% peptídeos potencializadores de bradicinina; 8% de lectinas tipo C; 5,4% de serinopeptidases, 3,8% de fosfolipases A₂, entre outras. Os demais clusters correspondiam a proteínas celulares, a maior parte envolvida na expressão de genes e proteínas, refletindo uma especialização do tecido glandular do animal para a síntese de toxinas.

Segundo Oliveira *et al.*, (58) a giroxina extraída do veneno de *Crotalus durissus terrificus* compartilha uma alta seqüência e similaridade estrutural (acima de 90%) com outras SVSPs incluindo a extensão N-terminal observada em serinoproteases isoladas da glândula destas serpentes.

O sequenciamento direto da região N-terminal da enzima e obtido neste estudo (VIGGDECNINEHRFLVALYE) confirmou que a seqüência cDNA obtida realmente codifica a enzima isolada do veneno de *Crotalus durissus terrificus*. Dessa forma, obteve-se a seqüência completa de cDNA da giroxina através de RT-PCR, o qual apresentou 714 pb os quais codificam para uma proteína completa contendo 238 resíduos de aminoácidos. Comparando-se proteínas com funções similares de diferentes espécies, é possível construir árvores filogenéticas para estudos evolutivos. Estas informações estão de acordo com outras proteínas trombina *símiles*, como a enzima BjussuSP-I de *Bothrops jararacussu*, na qual sua análise N-terminal apresentou 696 bp e codificou uma estrutura primária com 232 resíduos de aminoácidos (63, 64). Tal proximidade no número de resíduos de aminoácidos para as proteínas completas pode revelar um elevado grau de identidade para proteínas com função homóloga contidas no veneno de diferentes espécies de serpentes.

A escolha da giroxina B2.1 como molde para o presente estudo foi muito apropriado. Isto porque recentemente Yonamine *et al* (65) em estudo de clonagem e expressão funcional da giroxina homóloga de Cdt em células COS-7 verificaram que a seqüência protéica da giroxina B2.1 (AY954040), previamente depositada no GenBank, e comparada com outras 21 serinoproteases foi a que apresentou a maior similaridade entre elas (99,55%).

Portanto, os resultados obtidos reforçam e concordam com os encontrados por Yonamine *et al.* (65).

Para se estimar o estado de agregação da proteína purificada em estudo realizou-se o espalhamento dinâmico de luz (DLS). Os resultados obtidos revelaram uma massa molecular de 27 kDa corroborando com os nossos achados que foram em torno de 29 kDa e discutidos anteriormente. O total de massa analisada (97%) demonstrou uma uniformidade em seu estado de agregação, possivelmente globular monomérica (53, 54), apresentando desta maneira, condições adequadas para o início dos estudos de cristalização.

A cristalografia de proteínas tem contribuído muito para o desenvolvimento de diversas áreas de pesquisa, esclarecendo mecanismos de reações, funções de macromoléculas e fornecendo informações, tanto utilizadas para entender doenças quanto para desenvolver novas drogas e vacinas (60). O estudo estrutural de moléculas biologicamente ativas por meio da técnica de difração de raios-X requer inicialmente a obtenção de cristais da proteína em questão. O método mais utilizado é o da difusão de vapor, que permite o uso de pequenos volumes de amostra ($\leq 2 \mu\text{L}$), possibilitando a verificação de um número maior de possíveis condições para a sua cristalização (64). Estudos prévios de cristalização desenvolvidos por Oliveira *et al.*, (58) com uma serinoprotease proveniente de *Crotalus durissus collilineatus*, obtiveram cristais em quatro condições a saber: (1) 0.1M Tris-HCl pH 8.0, 20% PEG 8000 e 0.2 M de sulfato de amônio, (2) 0.1 M cacodilato de sódio pH 6.5, 25% PEG 4000 e 0.2 M NaCl, (3) 0.1 M Hepes pH 7.5, 24% PEG 3350 e 0.2 M cloreto de lítio e (4) 0.1 M cacodilato de sódio pH 6.5, 18% PEG 8000 e 0.2 M de cloreto de magnésio.

Neste estudo, a presença do polietilenoglicol (PEG) de diferentes pesos moleculares favoreceu a formação de estruturas cristalinas para a serinoprotease purificada. Todavia soluções diferentes acrescidas com álcool MPD apresentaram melhores condições para os ensaios de cristalização. Foram utilizadas três soluções: (1) 0.5 M cloreto de sódio, 0.01M cloreto de magnésio hexaidratado e 0.01 M brometo de hexadecitrimetilamônio; (2) 0.2 M citrato de sódio, 0.1 Tris HCl pH 7.5 e 30% de 2,2-metil 4-pentanodiol (MPD); e (3) 0.2M sulfato de lítio, 0.1M Tris-HCl pH 8.5 e 30% PEG 4000. As variações nos componentes da segunda solução (citrato de sódio e MPD) e da terceira

solução (sulfato de lítio e PEG 4000) apresentaram resultados promissores. O cristal obtido pela segunda condição, corada pelo Isit, detectou sua composição protéica. O cristal assim obtido foi levado para a difração de raios X no Centro Nacional de Luz Síncrotron e apresentou um bom padrão de difração, suficiente para confirmar pelo menos a constituição protéica da enzima giroxina.

As soluções empregadas no presente estudo foram mais promissoras que as empregadas por de Oliveira *et al* (58). Neste último caso os autores obtiveram cristais apenas de serinoprotease de veneno de *Crotalus durissus collilineatus*. Portanto, trata-se de uma proteína de difícil cristalização a qual ainda não se encontra publicada na literatura, nem o seu cristal, nem a sua estrutura tridimensional. Esta última encontra-se publicada, embora baseada apenas no seu modelo teórico (58).

Portanto, pela grande dificuldade de cristalização das serinoproteases de maneira geral, bem como da giroxina, foi proposto a sua análise estrutural por meio da modelagem teórica.

Estudos de modelagem teórica foram conduzidos na elucidação de estruturas tridimensionais de proteínas de serpentes (66, 67). Infelizmente o acúmulo de informações estruturais não cresceu com a mesma rapidez que os dados referentes ao seqüenciamento destas proteínas. Isto se deve principalmente a falta de teorias preditivas para a formação de cristais, necessárias para a resolução de estruturas por difração de raios X. Atualmente, mais da metade das seqüências disponíveis possui ao menos uma similar com estrutura conhecida e espera-se que nos próximos anos todas as seqüências assim o possuam (60).

Dessa forma, a modelagem molecular torna-se uma alternativa atraente para a investigação da estrutura de biomoléculas e, em especial, de proteínas. A reconstrução da estrutura tridimensional de uma proteína por métodos teóricos pode seguir dois métodos: (1) métodos *ab initio* e (2) métodos com base em homologia. O método que vem exibindo melhores resultados nesta área é a modelagem molecular com base em homologia devido a possibilidade de se encontrar proteínas com estruturas e atividades biológicas semelhantes (60), sendo, portanto, o eleito para utilização neste estudo.

O processo fundamenta-se na transposição de informações de uma proteína de seqüência e estrutura conhecida, molde para uma seqüência

similar com estrutura desconhecida (alvo). Assim, foi utilizada como sequência alvo a gioxina símile B2.1, que apresentou a conservação dos mesmos aminoácidos. Estudos de Vitorino-Cardoso *et al.* (68), verificaram estes aminoácidos determinando seus marcadores evolutivos (His57, Asp102, Ser 195, Ser 214, Pro/Tyr225) e os motivos estruturais que circundariam o sítio ativo para a BthaTL (serinoprotease de *Bothrops alternatus*). Comparativamente tais dados poderiam classificar a proteína gioxina símile B2.1 dentro dessa mesma família com certa seguridade conforme a nomeação por Lesk and Fordhan (69), classificando esta como uma serinoprotease do clã quimiotripsina símile.

A serinoprotease gioxina símile B2.1 tem partes da estrutura em comum com outra enzima trombina símile do gênero *Bothrops*, tais como a botrombina de *Bothrops jararaca* (gi: 545584) e a batroxobina de *Bothrops atrox* (gi: 211024). Semelhantemente existe a presença de valina no resíduo N-terminal, possui peso molecular de 30 KDa que é inibida pela PMSF (fenilmetilsulfonil fluoreto) e induz a polimerização parcial da fibrina (70). Neste estudo foi realizado alinhamentos múltiplos com outras seis serinoproteases derivadas de veneno de serpentes (SVSPs) que indicaram a preservação de resíduos de cisteína e seus principais elementos de estrutura secundária (α -hélices, folhas betas e loops). Outras posições importantes para a eficiência da atividade catalítica estariam então na presença da tríade catalítica (His57, Asp102, Ser198) e dos sítios S1 (Thr193) e S2 (Gli215), que são altamente conservados em todas as SVSPs.

As superfícies das SVSPs podem apresentar alterações consideráveis em sua forma devido a variações de extensão em loops específicos conforme sua sequência e seu tamanho. Essa tríade catalítica se localizaria na junção das folhas β -barris e seria cercada pelos loops nas posições 37, 60, 70, 99, 148, 174 e 218 (71). O loop 90, é a uma estrutura distinta presente na sequência alvo gioxina símile B2.1 que não é estritamente conservada na família das SVSPs. Esse loop é conservado somente na crotalase, uma enzima coagulativa isolada do veneno de *C. adamanteus* e na bilineobina purificada do veneno de *Agkistrodon bilineatus* (72), observando-se que as prováveis regiões envolvidas no reconhecimento e clivagem do fibrinogênio pelas SVSPs, apresentam um sítio ligante de aril e uma região carregada

positivamente. Essa região positiva foi reconhecida na sequência alvo giroxina símile B2.1 pelos resíduos Arg60, Arg72, Gln75, Arg81, Arg82, Lis85, Glu86, Lis87 (72).

Segundo estudos prévios com a modelagem teórica estrutural da giroxina de *C. d. terrificus* realizados por de Oliveira *et al.*, (58) a superposição das coordenadas atômicas com a sequência PROTAC (ativador de proteína C) revelou significativas diferenças no loop 174 e principalmente na carga superficial ao redor de suas interfaces. O loop 174 compreende os resíduos 171-180 previamente descritos como parte do mecanismo de reconhecimento macromolecular nas SVSPs (72), o qual possui duas inserções na estrutura teórica da giroxina modelada neste estudo com provável importância na seletividade do substrato (sequência PROTAC no loop 174: AYKGLAATTL e sequência da giroxina no loop 174: AYPEFGLPATSRTL).

Outra diferença observada entre as estruturas foi a distribuição de cargas superficiais entre o PROTAC e a giroxina. A giroxina apresenta uma eletronegatividade ao redor do seu sítio ativo em comparação com a estrutura do PROTAC que contém um cinturão de aminoácidos de arginina, conferindo assim, uma forte distribuição eletropositiva essencial para o reconhecimento e ligação da Asp-Glu, os quais são ativadores do pró-peptídeo precursor de proteína C segundo Oliveira *et al.* (58). No presente estudo detectou-se uma diferença na composição de aminoácidos no loop 174 para a giroxina: PQFRLPATSRILCA. Dessa forma, sugere-se que tal mudança poderia alterar sua carga final, ocasionando assim alterações em sua atividade como protease, concordando com Oliveira *et al.* (58).

Uma visão detalhada da sequência do modelo teórico da giroxina modelada neste estudo revela que o marcador evolutivo 211GTVSW215 foi conservado. As posições 213, 214 e 215 não são estritamente conservadas em outras SVSPs. O mesmo pode ser observado nas posições 226 e 227 do marcador evolutivo 225PGVY228. No caso da giroxina houve mudanças na Gly226 para Ala e da Val227 para Leu. Ao redor do sítio catalítico His57, a sequência motivo 54TVAHC58 apresentou mudança para a giroxina B2.1, sendo Val55 substituída pela Ala55 como observado em outras serinoproteases (69).

Após a obtenção de um modelo primário, ou seja, o primeiro modelo obtido, este passou por diversas avaliações de qualidade e modificações até que fosse alcançado um modelo satisfatório. Quanto maior a similaridade entre as proteínas utilizadas, maior é a chance de sucesso nesse processo, em que um bom alinhamento é de fundamental importância.

A sequência da serinoprotease de *Agkistrodon acutus* (gi: 49258366) utilizada como molde para o modelo teórico da enzima giroxina de *C. d. terrificus* mostrou-se adequada, pois foi possível obter 100% de similaridade entre elas. As chances de alinhamentos ao acaso apresentarem-se nulas (E-value = 0) e com 60% de identidade com a sequência giroxina símile B2.1.

A estrutura final obtida da modelagem teórica da enzima giroxina apresentou duas α -hélices, duas estruturas β -barris (constituída por 6 folhas antiparalelas) e sete loops principais. Esta estrutura assemelha-se a outras SVSPs, estando de acordo com as estruturas encontradas em estudos conduzidos previamente por Zhu *et al.* (54), Oliveira *et al.*, (58) e Vitorino-Cardoso *et al.* (68).

As estruturas das SVSPs, quando obtidas por cristalografia apresentam formas globulares, enquadrando-se como membros da família da quimiotripsina (53), concordando com o fato da estrutura teórica final da enzima giroxina modelada apresentar forma globular e monomérica.

Certos loops ao redor dos sítios catalíticos são essenciais para atividades bioquímicas das SVSPs (63, 68), como os presentes nas posições 37, 60, 70, 99, 148, 174 e 218, os quais estariam envolvidos no reconhecimento de substratos específicos e na susceptibilidade a inibidores (68). A análise de alinhamentos múltiplos entre a sequência da giroxina símile B 2.1 e a seqüência da BjussuSP-I, realizados por Sant'ana *et al.* (63) por meio do *software* Clustal X2, identificou a composição de resíduos entre ambas e seu elevado grau de homologia. Dessa forma, comprovou-se a existência desses mesmos loops na estrutura teórica final da giroxina realizado no presente estudo.

Foi possível ainda identificar os dados da predição dos sítios de glicosilação da estrutura teórica final da giroxina, realizada pelo servidor NetNglyc 1.0, que revelou apenas um sítio de glicosilação localizado na

seqüência Asn83, Phe84 e Thr85. Tais sítios seriam reguladores de atividade específica a certos substratos sendo por isso designado S1, S2 e S3 (68).

Por outro lado, estudos de dinâmica molecular visam compreender o comportamento das estruturas presentes na proteína, a fim de predizer seus estados mais ativos conforme localização de seus resíduos (73).

As informações da oscilação estrutural para a enzima giroxina durante a dinâmica molecular se estabilizaram por volta de 3.000 ps (pico segundos) indicando uma boa consistência e estabilidade estrutural. Além disso, o gráfico obtido apresentou as maiores oscilações para os resíduos de aminoácidos na faixa 50-70 e notadamente para o resíduo 170 conforme observado na figura 19. Estas oscilações obtidas nos resíduos corroboram resultados prévios, nos quais os resíduos Ser69, Thr176, Asp187 e Cys214, apresentaram uma geometria imprópria (68).

Por fim, o modelo teórico da enzima giroxina de *Cdt* obtida neste estudo, apesar de ter utilizado um número maior de comparações com outras serinoproteases, apresentou semelhanças estruturais com o modelo sugerido por de Oliveira *et al.* (58). No entanto, foram observadas particularidades no modelo obtido referente à presença de um número maior de loops, sítios de atividade específicas e amplas regiões de oscilação molecular, que poderão ser esclarecidas e comprovadas a partir da estrutura tridimensional definitiva obtida a partir do cristal difratado por meio de raios-X. Assim, os estudos de análise estrutural possibilitarão a elucidação da constituição molecular da giroxina permitindo o conhecimento de seus aspectos funcionais e por conseguinte o seu emprego terapêutico em futuro próximo.

6-CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente estudo permitiram tecer as seguintes conclusões:

- Os processos utilizados para o isolamento e purificação da giroxina mostraram-se adequados resultando ao final em três picos distintos, denominados serinoproteases I, II e III;
- Os processos cromatográficos e eletroforéticos empregados foram adequados para a obtenção da giroxina (pico III), de forma que, não se detectou contaminantes e houve um aumento da intensidade de banda proporcional à crescente concentração da amostra aplicada na eletroforese;
- O seqüenciamento N-terminal da giroxina pode-se comprovar que a proteína isolada e purificada tratava-se de giroxina;
- A escolha da giroxina B2.1 como molde para a clonagem e seqüenciamento molecular do cDNA da glândula de veneno de *Cdt* foi adequada, produzindo a sequência da molécula;
- Os testes de cristalização empregados foram promissores, pois se obteve cristais protéicos da giroxina;
- O emprego do corante Isit[®], associado ao padrão de difração de raios X, permitiu concluir que os cristais obtidos são de constituição protéica;
- As ferramentas empregadas na construção do modelo teórico foram eficientes, pois predizeram informações sobre a estrutura molecular da proteína e de suas características funcionais.

7-RESUMO

As serpentes do gênero *Crotalus durissus terrificus* possuem em seu veneno diversas substâncias, entre elas uma serinoprotease com atividade trombina *símile* denominada giroxina, a qual é capaz de coagular o fibrinogênio plasmático, promovendo a formação de fibrina. O objetivo do estudo foi a purificação e caracterização estrutural da enzima giroxina de *Crotalus durissus terrificus*. Para tanto, foram utilizadas métodos cromatográficos de gel filtração em Sephadex G75 e afinidade em Benzamidina-Sepharose 6B para isolamento e purificação; eletroforéticos de SDS-PAGE 12% reduzido e de seqüenciamento do N-terminal da enzima purificada para identificação e avaliação do grau de pureza; clonagem e expressão do cDNA da glândula venenífera por RT-PCR e testes de cristalização. A modelagem teórica molecular foi realizada a partir de ferramentas de bioinformática baseadas em análises comparativas de outras serinoproteases depositadas no NCBI (National Center for Biotechnology Information). O seqüenciamento N-terminal da giroxina purificada, produziu uma proteína de cadeia única com massa molecular aproximada de 30 KDa e sua seqüência completa de cDNA apresentou 714 pb os quais codificaram uma proteína completa contendo 238 aminoácidos. Foram obtidos cristais a partir das soluções nºs 2 e 5 do Kit Crystal Screen® 2 e 1 respectivamente, verificando-se sua constituição protéica. Para os alinhamentos múltiplos da sequência molde giroxina *símile* B2.1 com outras seis serinoproteases derivadas de veneno de serpentes (SVSPs) indicou-se a preservação de resíduos de cisteína e de seus principais elementos de estruturais (α -hélices, β -barris e loops). Evidenciou-se a localização da tríade catalítica nos aminoácidos His57, Asp102, Ser198 e os sítios de atividade específica S1 e S2 nos aminoácidos Thr193 e Gli215 respectivamente. A região de reconhecimento e clivagem do fibrinogênio nas SVSPs para sequência molde giroxina B2.1 localizou-se nos resíduos Arg60, Arg72, Gln75, Arg81, Arg82, Lis85, Glu86, Lis87. A modelagem teórica da fração giroxina gerou uma estrutura clássica constituída de 2 α -hélices, 2 estruturas β -barris, 5 pontes dissulfetos e os loops nas posições 37, 60, 70, 99, 148, 174 e 218. Estes resultados forneceram informações sobre a estrutura funcional da giroxina possibilitando sua aplicação no design de uma nova droga.

Palavras-chave: purificação, caracterização, cristalização, modelagem teórica, giroxina

8-ABSTRACT

The venom of snakes *Crotalus durissus terrificus* genus have in their various substances, including a serinoproteases with thrombin-like activity called gyroxin, which clot the plasmatic fibrinogen and promote the fibrin formation. The objective of this study was purificate and characterize structurally the gyroxin enzyme from *Crotalus durissus terrificus*. For this, we used chromatographic gel filtration with Sephadex G75 and affinity benzamidine-Sepharose 6B for isolation and purification, SDS-PAGE 12% in reduce conditions for assessment purity, N-terminal sequencing of purified enzyme for identification and assessment purity; the cloning and expression of cDNA from venom gland by RT-PCR and crystallization tests. The theoretical molecular modeling was performed with bioinformatics tools based on comparative analysis of other serinoproteases deposited in the NCBI (National Center for Biotechnology Information). The N-terminal sequencing purified gyroxin protein produced a single chain with a molecular mass of approximately 30 kDa and its full-length cDNA had 714 bp which encoded a complete protein containing 238 amino acids. Crystals were obtained from the solutions 2 and 5 of the Crystal Screen Kit ® 2 and 1 respectively and was verificated a protein constitution. For multiple sequence alignments such gyroxin-like B2.1 with six other serinoproteases derived from snake venom (SVSPs) indicated the preservation of cysteine residues and its main structural elements (α helices, β -barrel and loops). Identificated the amino acids positions in the catalytic triad His57, Asp102, Ser198 and sites of specific activity in S1 and S2 amino acids Thr193 and Gli215 respectively. The recognition area of fibrinogen cleavage in SVSPs to template sequence gyroxin B2.1 was located in residues Arg60, Arg72, Gln75, Arg81, Arg82, Lis85, Glu86, Lis87. Theoretical modeling of gyroxin fraction generated a classical structure consisting of 2 α -helices, 2 β -barrel structures, 5 disulfide bridges and loops in positions 37, 60, 70, 99, 148, 174 and 218. These results provided information about the functional structure of gyroxina allowing its application in the design of a new drug.

Keywords: purification, characterization, crystallization, theoretical modeling, gyroxin.

9-REFERÊNCIAS¹

1. Hoge AR & Romano-Hoge SA. Sinopse das serpentes peçonhentas do Brasil. 2ª ed. Mem Inst Butantan, 1978/1979;42/43:373-496.
2. Ministério da Saúde do Brasil – Fundação Nacional da Saúde, Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos, DF, Brasília, 1999.
3. Barraviera B, editor. Venenos animais: uma visão integrada. Rio de Janeiro, EPUC; 1994. p. 261-80.
4. Bjarnason BJ, Fox JW. Hemorrhagic metalloproteinases from snake venoms. *Pharmac Ther.* 1994;62:255-372.
5. Markland FS. Snake venoms and hemostatic system. *Toxicon.* 1998;36:1749-1800.
6. Matsui T, Fujimura Y, Titani K. Snake venom proteases affecting hemostasis and thrombosis. *Biochim Biophys Acta.* 2000;1477:146-56.
7. Castro HC, Silva DM, Craik C, Zingali RB. Structural feature of a snake venom thrombin-like enzyme: thrombin and trypsin on a single catalytic platform? *Biochim Biophys Acta.* 2001;1574:183-95.
8. Kornalik F. Toxins affecting blood coagulation and fibrinolysis. In: Shier WT, Mebs D. *Handbook of Toxinology.* New York, USA. Marcel Dekker Inc. 1990;32:683-759.
9. Ouyang C, Teng CH, Huang TF. Characterization of snake venom components acting on blood coagulation and platelet function. *Toxicon.* 1992;30:945-66.
10. Markland FS. Snake venom fibrinogenolytic and fibrinolytic enzymes. An updated inventory. *Thromb Haemost.* 1988;79.
11. Marsh N, Williams V. Practical applications of snake venom toxins in haemostasis. *Toxicon.* 2005;45(8):1171-81.
12. Zhang Y, Wisner A, Maroun RC, Choumet V, Xiong Y, Bon C. *Trimeresurus stejnegeri* snake venom plasminogen activator. Site-directed mutagenesis and molecular modeling. *J Biol Chem.* 1997;272(33):20531-7.

¹Segundo normas de Vancouver: “*Uniform Requirements for Manuscripts to Biomedical Journal*” (*International Committee of Medical Journal Editors*, 2008. <http://www.icmje.org>) e por deliberação do Programa de Pós-Graduação em Doenças Tropicais da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP.

13. Parry MA, Jacob U, Huber R, Wisner A, Bon C, Bode W. The crystal structure of the novel snake venom plasminogen activator TSV-PA: a prototype structure for snake venom serine proteinases. *Structure*. 1998;6(9):1195-206.
14. Stocker K. *Handbook of Experimental Pharmacology*. 1st Ed. Markwardt, F., ed. Springer-Verlag, Berlin. 1978;451-84.
15. Kisiel W, Kondo S, Smith KJ, McMullen BA, Smith LF. Characterization of a protein C activator from *Agkistrodon contortrix contortrix* venom. *J Biol Chem*. 1987;15(26):12607-613.
16. Gempeler-Messina PM, Volz K, Bühler B, Müller C. Protein C activators from snake venoms and their diagnostic use. *Haemostasis*. 2001;31(21-26):266-72.
17. Bercovici D, Chudziniski AM, Dias WO, Esteves MI, Hiraichi E, Oishi NY, Picarelli ZP, Rocha MC, da Ueda CPM, Yamanouye N, Raw I. A systemic fractionation of *Crotalus durissus terrificus* venom. *Mem Inst Butantã*. 1987;49(3):69-78
18. Rawling ND, Tolle DP, Barret AJ. Evolutionary families of peptidase inhibitors. *Biochem*. 2004;378(3):705-16.
19. Andrews RK, Gardiner EE, Berndt MC. Snake venom toxins affecting platelet function. *Methods Mol Biol*. 2004;273:335-48.
20. Raw I, Rocha MC, Esteves MI, Kamiguti AS. Isolation and characterization of a thrombin-enzyme from the venom of *Crotalus durissus terrificus*. *Braz J Med Biol Res*. 1986;19(3):333-38.
21. Seki C, Vidal JC, Barrio A. Purification of gyroxin from a South American rattlesnake *Crotalus durissus terrificus* venom. *Toxicon*. 1980;18(3):235-47.
22. Prado-Franceschi J, Vital-Brasil OV. Convulxin, a new toxin from the venom of the South American rattlesnake *Crotalus durissus terrificus*. *Toxicon*. 1981;19(6):875-87.
23. Koh YS, Chung KH, Kim DS. Biochemical characterization of thrombin-like enzyme and fibrinolytic serine protease from snake (*Agkistrodon saxatilis*) venom. *Toxicon*. 2001;39(4):555-60.
24. Bucarechi F, Herrera SRF, Hyslop S, Bacarat ECE, Vieira RJ. Snakebites by *Crotalus durissus terrificus* ssp. in children in Campinas, São Paulo, Brasil. *Rev Inst Med Trop*. 2001;43(6):133-38.
25. Serrano SM, Maroun RC. Snake venom serine proteinases: sequence homology vs. substrate specificity, a paradox to be solved. *Toxicon*. 2005;45(8): 1115-32.

26. Maggio ET, Ramnarayan K Recent developments in computational proteomics. Trends Biotechnol. 2001;19(7):266-72.
27. Norvell JC, Machalek AZ Structural genomics programs at the US National Institute of General Medical Sciences. Nat Struct Biol. 2000;7:931.
28. Terwilliger TC. Structural genomics in North America. Nat Struct Biol. 2000;7:935-9.
29. Heinemann U Structural genomics in Europe: slow start, strong finish? Nat Struct Biol. 2000;7:940-2.
30. Gasteiger E, Jung E, Bairoch A SWISS-PROT: connecting biomolecular knowledge via a protein database. Curr Issues Mol Biol. 2001;3(3):47-55.
31. Berman HM, Westbrook J, Feng Z, Gilliland G, Bhat TN, Weissig H, Shindyalov IN, Bourne PE. The Protein Data Bank. Nucleic Acids Res. 2000;28(1):235-42.
32. Ortiz AR, Kolinski A, Skolnick J. J Fold assembly of small proteins using Monte Carlo simulations driven by restraints derived from multiple sequence alignments. Mol Biol. 1998;277(2):419-48.
33. Lee J, Scheraga HA, Rackovsky S. Computational study of packing a collagen-like molecule: quasi-hexagonal vs "Smith" collagen microfibril model. Biopolymers. 1996;40(6):595-607.
34. Sternberg MJ, Bates PA, Kelley LA, MacCallum RM. Progress in protein structure prediction: assessment of CASP3. Curr Opin Struct Biol. 1999;9(3):368-73.
35. Santos-Filho OA, de Alencastro RB, Figueroa-Villar JD Homology modeling of wild type and pyrimethamine/cycloguanil-cross resistant mutant type *Plasmodium falciparum* dihydrofolate reductase. A model for antimalarial chemotherapy resistance. Biophys Chem. 2001;91(3):305-17.
36. Wolf YI, Grishin NV, Koonin EV. Estimating the number of protein folds and families from complete genome data. J Mol Biol. 2000;299(4):897-905.
37. Silva Jr FP, De-Simone SG. S1 subsite in snake venom thrombin-like enzymes: can S1 subsite lipophilicity be used to sort binding affinities of trypsin-like enzymes to small-molecule inhibitors? Bioorg Med Chem. 2004;12(10):2571-87.
38. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem. 1976;72:248-54.
39. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 1970;227(5259):680-5.

40. Vesterberg O. Isoelectric focusing of proteins in polyacrylamide gels. *Biochim Biophys Acta*. 1972;257(1):11-9.
41. Han K, Tetaert D, Debuire B, Dautrevaux M, Biserte G. Sequential Edman degradation. *Biochimie*. 1970;59(4):557-76.
42. Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol*. 1990;215(3):403-10.
43. Chenna R, Sugawara H, Koike T, Lopez R, Gibson TJ, Higgins DG, Thompson JD. Multiple sequence alignment with the Clustal series of programs. *Nucleic Acids Res*. 2003;31(13):3497-500.
44. Domingues MM, Santiago PS, Castanho MA, Santos NC. What can light scattering spectroscopy do for membrane-active peptide studies? *J Pept Sci*. 2008;14(4):394-400.
45. Filho OAS, de Alencastro RB. Modelagem de proteínas por homologia. *Química Nova*, 2003;25(2):253-59.
46. Jancarik J, Kim SH. Sparse matrix sampling – a screening method for crystallization of proteins. *J. Appl Crystallogr*. 1991;24:409-11.
47. Lavigne R, Sun WD, Volckaert G. STORM towards protein function: systematic tailored ORF-data retrieval and management. *Appl Bioinformatics*. 2003;2(3):177-9.
48. Williams MG, Shirai H, Shi J, Nagendra HG, Mueller J, Mizuguchi K, Miguel RN, Lovell SC, Innis CA, Deane CM, Chen L, Campillo N, Burke DF, Blundell TL, de Bakker PI. Sequence-structure homology recognition by iterative alignment refinement and comparative modeling. *Proteins*. 2001;5:92-7.
49. Hildebrand A, Remmert M, Biegert A, Söding J. Fast and accurate automatic structure prediction with HHpred. *Proteins*. 2009;77(9):128-32.
50. Eswar N, Eramian D, Webb B, Shen MY, Sali A. Protein structure modeling with MODELLER. *Methods Mol Biol*. 2008;426:145-59.
51. Van Der Spoel D, Lindahl E, Hess B, Groenhof G, Mark AE, Berendsen HJ. GROMACS: fast, flexible, and free. *J Comput Chem*. 2005;26(16):1701-18.
52. Laskowski RA. Structural quality assurance. *Methods Biochem Anal*. 2003;44:273-303.
53. Bode W, Turk D, Karshikov A. The refined 1.9-Å X-ray crystal structure of D-Phe-Pro-Arg chloromethylketone-inhibited human alpha-thrombin: structure analysis, overall structure, electrostatic properties, detailed active-site geometry, and structure-function relationships. *Protein Sci*. 1992;1(4):426-71.

54. Zhu Z, Liang Z, Zhang T, Zhu Z, Xu W, Teng M, Niu, L. Crystal structures and amidolytic activities of two glycosylated snake venom serine proteinases. *J Biol Chem.* 2005;280(5):10524-29.
55. Delano WS. The PyMOL molecular graphics system. San Carlos: Delano Scientific, 2002. Disponível em <http://www.pymol.org>. Acesso em: 26/01/2005
56. Sippl MJ. Recognition of errors in three-dimensional structures of proteins. *Proteins.* 1993;17(4):355-62.
57. Alexander G, Grothusen J, Zepeda H, Schwartzman R. Gyroxin, a toxin from the venom of *Crotalus durissus terrificus* is a thrombin like enzyme. *Toxicon.* 1988;26(10):953-60.
58. de Oliveira DGL, Murakami MT, Cintra ACO, Franco JJ, Sampaio SV, Raghuvir AK. Functional and structural analysis of two fibrinogen-activating enzymes isolated from the venoms of *Crotalus durissus terrificus* and *Crotalus durissus collilineatus*. *Acta Biochim Biophys Sin.* 2009;41(1):21-9.
59. Magalhães A, Fonseca BCB, Diniz CR, Gilroy J, Richardson M. The complete amino acid sequence of thrombin-like enzyme/gyroxin analogue from venom of the bushmaster snake (*Lachesis muta muta*). *FEBS Letters.* 1993;329(1-2):116-20
60. Selistre-de-Araújo HC, Souza DHF. Métodos em toxicologia – toxinas de serpentes. São Carlos, Edufscar; 2007. p.221-42.
61. Siigur E, Aaspollu A, Tu AT, Siigur J. cDNA cloning and deduced amino acid sequence of fibrinolytic enzyme (lebetase) from *Vipera lebetina* snake venom. *Biochem Biophys Res Commun.* 1996;224(1);229-36.
62. Junqueira de Azevedo ILM, Ho PLA. A survey of gene expression and diversity in the venom gland of the pitviper snake *Bothrops insularis* through the generation of expressed sequence tags (ESTs). *Gene.* 2002;299(1-2);279-291.
63. Sant'Ana CD, Bernardes CP, Izidoro LF, Mazzi MV, Soares SG, Fuly AL, Zingali RB, Magro AJ, Braz AS, Fontes MR, Stábeli RG, Sampaio SV, Soares AM. Molecular characterization of BjuSSuSP-I, a new thrombin-like enzyme with procoagulant and kallikrein-like activity isolated from *Bothrops jararacussu* snake venom. *Biochimie.* 2008;90(3):500-07.
64. Ducruix A, Giegé R. Crystallization of nucleic acids and proteins (a practical approach). Oxford: Oxford University Press, 1992.
65. Yonamine CM, Prieto-da-Silva AR, Magalhães GS, Rádis-Baptista G, Morganti L, Ambiel FC, Chura-Chambi RM, Yamane T, Camillo MA. Cloning of serine protease cDNAs from *Crotalus durissus terrificus* venom gland and expression of a functional Gyroxin homologue in COS-7 cells. *Toxicon.* 2009;54(2):110-20.

66. Bazaia A, Marrakchin N, El Ayeb M, Sanz L, Calvette JJ. Snake venomomics: comparative analysis of the venom proteomes of the Tunisian snakes *Cerastes cerastes*, *Cerastes vipera* and *Macrovipera lebetina*. *Proteomics*. 2005;5(16):4223-35.
67. Kashima S, Roberto PG, Soares AM, Astolfi-Filho S, Pereira JO, Giuliati S, Faria M Jr, Xavier MA, Fontes MR, Giglio JR, França SC. Analysis of *Bothrops jararacussu* venomous gland transcriptome focusing on structural and functional aspects: I gene expression profile of highly expressed phospholipases A2. *Biochimie*. 2004;86(3):211-9.
68. Vitorino-Cardoso AF, Ramos OHP, Homs-Brandeburgo MI, Selistre-de-Araujo HS. Insight into the substrate specificity of a novel snake venom peptidase by molecular modeling. *Comp Biochem and Physiol*. 2006;144(3):334-42.
69. Lesk AM, Fordham WD. Conservation and variability in the structure of serine proteinases of the chymotrypsin family. *J Mol Biol*. 1996;258(3):501-37.
70. Ouyang C, Teng C, Haung T. Characterization of snake venom components acting on blood coagulation and platelet function. *Toxicon*. 1992;30(9):945-66.
71. Murakami MT, Arni RK. Thrombomodulin-independent activation of protein C and specificity of hemostatically active snake venom serine proteinase: crystal structure of native and inhibited *Agkistrodon contortrix contortrix* protein C activator. *J Biol Chem*. 2005;280(47):39309-15.
72. Nikai T, Ohara A, Komori Y, Fox JW, Sugihara H. Primary structure of a coagulant enzyme bilineobin from *Agkistrodon bilineatus* venom. *Arch Biochem Biophys*. 1995;18(11):89-96.
73. Silva Jr FP, de Simone SG. S1 subsite in snake venom thrombin-like enzymes: can S1 subsite hydrophobicity be used to sort binding affinities of trypsin-like enzymes to small molecule inhibitors? *Bioorg Med Chem*. 2004;12(10):2571-87.