

Purificação e caracterização de uma metaloprotease do veneno da serpente *Bothrops lanceolatus*

Envenenamentos causados pela picada da serpente caribenha *Bothrops lanceolatus* são caracterizados pela frequente ocorrência, de trombose sistêmica, a qual pode levar as vítimas à morte por infarto do miocárdio, pulmonar ou cerebral. A predisposição à trombose difere drasticamente do quadro hemorrágico observado no envenenamento por outras serpentes do gênero. Em ambos os casos, o veneno destas serpentes é uma complexa mistura de toxinas capazes de interferir em diferentes vias da coagulação. Dentre estas, as metaloproteases são as enzimas mais abundantes e consideradas componentes essenciais para o desenvolvimento dos distúrbios hemostáticos. O objetivo deste trabalho é isolar a enzima majoritária do veneno da serpente *Bothrops lanceolatus* e caracterizar suas funções biológicas, buscando identificar componentes determinantes para o desenvolvimento da trombose. O isolamento da enzima foi realizado por métodos clássicos de purificação, em duas etapas cromatográficas, acompanhando-se a atividade proteolítica sobre azocaseína. A caracterização bioquímica da enzima purificada foi realizada através de (1) inibição da atividade proteolítica com inibidores específicos; (2) seqüenciamento por espectrometria de massas; (3) avaliação da atividade pró-coagulante; (4) ativação de protrombina; (5) efeito sobre a agregação plaquetária e (6) avaliação da citotoxicidade em células endoteliais e fibroblastos. A enzima purificada possui 50 kDa, é inibida especificamente por orto-fenantrolina e sua seqüência peptídica a identifica como uma metaloprotease da classe PIII. A enzima possui atividade pró-coagulante de forma dose-dependente (1-10 ug enzima), sendo capaz de ativar pró-trombina na menor dose testada. Além disso, um micrograma de enzima provoca a ativação e agregação plaquetária. Nas doses testadas, a enzima não altera a viabilidade celular de fibroblastos e células endoteliais. A avaliação da ativação endotelial encontra-se em andamento.