

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA  
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**FRACIONAMENTO DA PEÇONHA DA SERPENTE  
*Bothrops alternatus* E DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE  
PROTEOLÍTICA DE SUAS FRAÇÕES ISOLADAS**

**Júnia de Oliveira Costa**

**Monografia apresentada à coordenação do  
Curso de Ciências Biológicas, da  
Universidade Federal de Uberlândia, para  
obtenção do grau de Bacharel em Ciências  
Biológicas.**

**Uberlândia - MG**

**Fevereiro - 2003**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA  
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**FRACIONAMENTO DA PEÇONHA DA SERPENTE  
*Bothrops alternatus* E DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE  
PROTEOLÍTICA DE SUAS FRAÇÕES ISOLADAS**

**Júnia de Oliveira Costa**

**Fábio de Oliveira**

**Monografia apresentada à coordenação do  
Curso de Ciências Biológicas, da  
Universidade Federal de Uberlândia, para  
obtenção do grau de Bacharel em Ciências  
Biológicas.**

**Uberlândia - MG**

**Fevereiro - 2003**

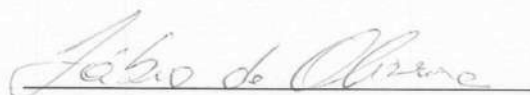
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA  
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

FRACIONAMENTO DA PEÇONHA DA SERPENTE  
*Bothrops alternatus* E DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE  
PROTEOLÍTICA DE SUAS FRAÇÕES ISOLADAS

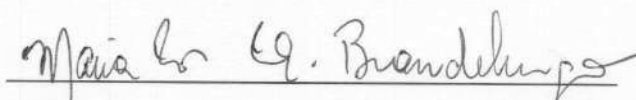
**Júnia de Oliveira Costa**

Aprovada pela Banca Examinadora em 20/02/03

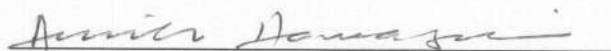
Nota 100



**Prof. Dr. Fábio de Oliveira**



**Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Maria Inês Homs Brandeburgo**



**Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Amélia Hamaguchi**

Uberlândia, 27 de fevereiro de 2003

"Se Deus houvesse isentado o homem do trabalho do corpo, seus membros estariam atrofiados; se o houvesse isentado do trabalho da inteligência, seu espírito teria permanecido na infância, no estado de instinto animal; por isso, Ihe fez do trabalho uma necessidade e Ihe disse: Procura e acharás, trabalha e produzirás; dessa maneira, será o filho de tuas obras, delas terá o mérito e serás recompensado segundo o que tiverdes feito".

## OFERECIMENTO

Ofereço este trabalho à minha **querida mãe Dione**, sempre amiga e companheira em todos os momentos de minha vida. Seu esforço, dedicação e carinho fez de mim uma pessoa muito feliz.

**Amo você.**



## AGRADECIMENTOS

Ao meu amigo e orientador Fábio de Oliveira. Juntos, conseguimos desenvolver bons trabalhos graças à sua sabedoria e dedicação. Nosso convívio ao longo do meu curso fez-me admirar-lhe intensamente enquanto pessoa e profissional. Minha eterna gratidão.

À Cristiani Baldo (Cris), pela parceria no desenvolvimento de vários trabalhos. Sua ajuda foi essencial para o meu engrandecimento e aprendizado. Obrigada pelo seu companheirismo e dedicação durante esses anos...

À Prof<sup>a</sup> Maria Inês Homs Brandeburgo, por ter me acolhido neste laboratório. Obrigada pela oportunidade de trabalhar contando sempre com os seus ensinamentos.

À Prof<sup>a</sup> Amélia Hamaguchi, pelo incentivo incondicional na busca contínua de novas descobertas e realização de novos trabalhos.

Ao meu amigo e colega Gilvan. Sua simplicidade e prontidão em ajudar as pessoas torna-o uma pessoa grandiosa. Torço sempre por você para que consiga tudo o que almejar na vida, pois você merece.

Ao divertidíssimo Luiz Carlos, pelo dom de fazer-me rir mesmo nos momentos estressantes. Continue sempre com o seu bom humor....

Aos colegas do Laboratório de Química de Proteínas e Produtos Naturais: Luiz Fernando, Rodrigo, Veridiana, Fábio Moroni, Francislene, Renata, Míriam, Luiz

Henrique, Rone, Ana Flávia, William, Hélen, Poliana, Elizângela. Meus sinceros agradecimentos.

Ao Cleuber, pela paciência e disposição em ensinar-me muito do que aprendi em informática. Tenho uma longa dívida com você ( muitas folhas A4, alguns disquetes, sem falar nos arquivos que eu achava que tinha perdido e quando eu menos esperava, o súper Cleuber salvava!). Obrigada, por poder contar com a sua ajuda.

À Tianinha, pelo seu carinho e amizade durante a nossa convivência. Gosto muito de você.

À dona Nenzinha, pela ajuda indispensável.

À Marlene, que apesar de sempre me chamar de Nubinha (brincadeira), ajudou-me sempre que precisei.

Ao seu Vilmar, sempre prestativo e educado.

Ao CNPq e FAPEMIG pelo indispensável apoio financeiro.

Ao Rafael e Sandra, funcionários da Diretoria de Pesquisa e Pós-Graduação, pela prontidão e educação que sempre me atenderam. Rafael, funcionários como você não são comumente encontrados. Você é uma raridade...

Ao Pablo Veras Peixoto, pelo inestimável auxílio durante os meus trabalhos.

Às minhas avós Aurora e Aparecida, por tudo que fizeram por mim.

Ao Luís Antônio, por tratar-me como uma filha e fazer muito por mim.

Ao Beto e à Denise por tratar-me como alguém da família. Este trabalho e vários outros foram realizados confortavelmente graças a vocês.

Ao meu namorado Michel, sempre paciente e amoroso mesmo nos momentos mais difíceis. Minha vida tornou-se mais alegre depois que te conheci. Você é muito importante para mim.

Amo você!!!

À Carla, que se mostrou prestativa e amiga durante nossa convivência. Obrigada por sempre ter podido contar com você.



## ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS.....	7
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	8
3.1. Material.....	8
3.1.1. Peçonha bruta de <i>Bothrops alternatus</i> .....	8
3.1.2. Cromatografia e eletroforese.....	8
3.1.3. Padrões para determinação do peso molecular.....	9
3.1.4. Determinação das atividades enzimáticas e biológicas.....	9
3.2. Métodos.....	10
3.2.1. Fracionamento da peçonha de <i>Bothrops alternatus</i> .....	10
3.2.1.1. Fracionamento da peçonha bruta de <i>Bothrops alternatus</i> em gel de DEAE Sephacel.....	10
3.2.2. Cromatografia da fração D6 em gel Sephadex G-75.....	10
3.2.3. Cromatografia em gel de afinidade da fração D6G2 em Heparina Agarose.....	11
3.2.4. Quantificação de proteínas.....	11
3.2.5. Ensaio Enzimáticos.....	12
3.2.5.1. Teste de degradação do fibrinogênio bovino.....	12
3.2.5.2. Teste de degradação do coágulo de fibrina.....	12
3.2.5.3. Atividade coagulante sobre o plasma bovino.....	12
3.2.5.4. Teste de degradação da caseína.....	13
3.2.5.5. Ensaio de incoagulabilidade sanguínea.....	13
3.2.5.6. Teste com inibidores enzimáticos.....	13

3.2.6. Efeitos do pH sobre a atividade proteolítica.....	13
3.2.7. Eletroforese em gel de poliacrilamida.....	14
3.2.7.1. Eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes para a determinação do peso molecular.....	15
4. RESULTADOS.....	17
4.1. Fracionamento da peçonha bruta de <i>Bothrops alternatus</i> em gel de DEAE Sephacel.....	17
4.1.1. Eletroforese em gel de poliacrilamida a 14 % em condições desnaturantes.....	19
4.1.2. Atividade fibrinogenolítica pH dependente.....	20
4.1.3. Atividade caseinolítica pH dependente.....	21
4.1.4. Atividade fibrinogenolítica tempo dependente.....	22
4.1.5. Atividade caseinolítica tempo dependente.....	23
4.1.6. Atividade coagulante sobre o plasma bovino.....	24
4.1.7. Ensaio de incoagulabilidade sanguínea.....	24
4.2. Cromatografia em gel filtração da fração D6 em Sephadex G-75.....	25
4.3. Cromatografia em gel de afinidade da fração D6G2 em Heparina Agarose.....	25
4.3.1. Eletroforese em gel de poliacrilamida a 14 % com agentes desnaturantes para determinação do peso molecular.....	26
4.3.2. Atividade proteolítica da MPA sobre o fibrinogênio, fibrina e caseína.....	27
4.3.3. Efeito dos agentes inibidores sobre a atividade fibrinogenolítica da enzima MPA.....	29
5. DISCUSSÃO.....	30

6. CONCLUSÃO.....	35
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	36

## LISTA DE ABREVIATURAS

**AMBIC** – Bicarbonato de amônio

**Bis acrilamida** – N, N' metileno-bis-acrilamida

**CaCl<sub>2</sub>** - Cloreto de cálcio

**DEAE** – Dietilaminoetil

**DFP** – diisopropilfluorfosfato

$\epsilon$  - Coeficiente de extinção

**EDTA** – Ácido etilenodiaminotetracético

**HCl** – Ácido clorídrico

**M** – Molar

**MM** – Massa molecular

**MPA** – Metaloprotease de *Alternatus*

**NaOH** – Hidróxido de sódio

**nm** – Nanômetro

**PAGE** – Eletroforese em gel de poliacrilamida

**PB** – Peçonha bruta

**PLA<sub>2</sub>** - Fosfolipase A<sub>2</sub>

**PMSF** – Fenilmetilsulfonil fluoreto

**rpm** – Rotações por minuto

**SDS** – Dodecil sulfato de sódio

**SDS-PAGE:** Eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de SDS

**TEMED** – N, N, N', N' – tetrametiletilenodiamino

**Tris** – Tris (hidroximetil) aminometano



Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Química de Proteínas e Produtos Naturais do Instituto de Genética e Bioquímica da Universidade Federal de Uberlândia.



## RESUMO

O presente trabalho descreve o fracionamento da peçonha bruta de *Bothrops alternatus* e a caracterização de suas frações isoladas quanto à atividade proteolítica e perfil eletroforético. A peçonha foi fracionada em DEAE Sephacel, previamente equilibrada em tampão bicarbonato de amônio 0,05 M, num gradiente de concentração de 0,05 a 1,0 M, apresentando um perfil cromatográfico de seis frações principais, denominadas de D1 a D6. Todas as frações (D1 a D6) degradaram a caseína e as cadeias A- $\alpha$  e B- $\beta$  do fibrinogênio bovino em pH 7,0-9,0. Uma fibrinogenase, denominada MPA, foi purificada a partir do refractionamento da fração D6 em Sephadex G-75, seguida por Heparina Agarose. Em eletroforese em gel de poliacrilamida, MPA se comportou como uma proteína de cadeia simples com peso molecular aparente de 29.000, na presença de  $\beta$ -mercaptoetanol. A enzima degrada a caseína e fibrina. A MPA hidrolisa a cadeia A- $\alpha$  mais rapidamente que a cadeia B- $\beta$ , mas não altera a cadeia  $\gamma$  do fibrinogênio. A atividade fibrinogenolítica da MPA foi inibida pela 1,10-fenantrolina. Resultados preliminares mostraram que MPA foi capaz de tornar o sangue de camundongos incoagulável.

Palavras-chave: *Bothrops alternatus*, peçonha, fibrinogenase.

## 1. INTRODUÇÃO

As serpentes *Bothrops alternatus* são conhecidas popularmente, no Brasil, como “urutu”, “urutu-cruzeiro” ou “cruzeira”, são consideradas monotípicas e de ampla dispersão, com grande distribuição na América do Sul (CAMPBELL & LAMAR, 1989). São terrestres, utilizam microambientes diversificados e ocupam diversas comunidades vegetais, mostrando uma grande capacidade de adaptação, ocupando vários biomas, o que justifica sua ampla distribuição (MESQUITA, 1997). Possuem atividade predominantemente noturna, embora possam apresentar atividades durante todos os horários do dia.

Os acidentes ofídicos são mais comuns do que aparentam e ocorrem amplamente em muitas regiões do globo terrestre. Dos vários tipos de serpentes existentes no Brasil, destacam-se as dos gêneros *Bothrops*, *Lachesis* e *Crotalus*. As serpentes botrópicas são responsáveis por 90% dos acidentes no território nacional (CARDOSO et al., 1993).

Muita controvérsia tem sido encontrada na literatura sobre as peçonhas de serpentes. Isto se deve, em parte, às diversas ações dos múltiplos componentes dessas peçonhas (JORGE et al., 1995). Esses componentes consistem principalmente de proteínas e peptídeos (cerca de 90 - 95 %), compreendendo grande variedade de enzimas e toxinas não enzimáticas (SCHMIDT et al., 1976). A porção não protéica é representada por íons metálicos, carboidratos,



nucleosídeos, aminas e em menor proporção, lipídeos e aminoácidos livres (CHIPPAUX et al., 1991).

Para que se possa entender as ações biológicas das peçonhas de serpentes, deve-se conhecer as suas propriedades mais relevantes – proteólise, efeitos sobre a coagulação, efeitos cardiovasculares e renais e efeitos sobre o sistema nervoso (JORGE et al., 1990, 1994, 1995).

Enzimas proteolíticas são comumente encontradas em peçonhas de serpentes, especialmente nas famílias Crotalidae e Viperidae. Muitos substratos como a insulina, colágeno, caseína e substratos cromogênicos têm sido usados para detectar atividade proteolítica de peçonhas (FABIANO & TU, 1981; BJARNASON & FOX, 1987; SHANNON et al., 1989; ORTHNER et al., 1988; OLIVEIRA et al., 1999).

As proteases das peçonhas de serpentes são um grupo heterogêneo de proteínas com uma larga escala de massas moleculares entre 15 e 380 kDa (KINI & EVANS, 1992). Muitas são proteínas de cadeia única (EVANS, 1984; GAO, 1998) e outras são proteínas com multi-subunidades (ZAGANELLI, 1996; FRY, 1999). As proteases documentadas bioquimicamente até o momento, podem ser classificadas de acordo com suas interações com inibidores, em dois grupos: serino e metaloproteases.

As metaloproteases são enzimas dependentes de íons metálicos para exercer sua função biológica. São inibidas por agentes quelantes como o EDTA e 1,10 fenantrolina, os quais eliminam completamente sua atividade. As metaloproteases fibrinogenolíticas hidrolisam preferencialmente a cadeia A- $\alpha$  do fibrinogênio, seguida da hidrólise da cadeia B- $\beta$ . Raramente a cadeia  $\gamma$  do fibrinogênio é hidrolisada.

As serinoproteases possuem um resíduo de serina altamente reativo, o qual exerce um papel crítico na catálise. Inibidores de serinoproteases como o diisopropilfluorfosfato (DFP) e o fenilmetilsulfonil fluoreto (PMSF) reagem com a serina do sítio ativo, inativando irreversivelmente essas proteases. As

enzimas que degradam a cadeia B- $\beta$  do fibrinogênio sem ação de fibrinólise pertencem à classe das serinoproteases (MARKLAND, 1998).

As proteases encontradas nas peçonhas de serpentes exibem uma variedade de atividades biológicas como ação coagulante (KORNALIK, 1990), anticoagulante (SEKYIA et al., 1993), hemorrágica (TU, 1991) e hipotensiva (MEBS, 1990).

A necrose tecidual é também gerada pela atividade de enzimas proteolíticas, sendo responsáveis pelas alterações locais habitualmente encontradas nos acidentes botrópicos e, eventualmente, laquéticos.

Os sinais locais decorrentes do envenenamento botrópico são equimoses, bolhas, isquemia, necrose e até gangrena (BARRAVIEIRA, 1999; BOZOLA et al., 1995; QUEIROZ et al., 1985). Algumas manifestações sistêmicas encontradas são náuseas, vômitos, sudorese, hipotensão arterial e mais raramente choque. Entretanto, as manifestações sistêmicas mais marcantes estão relacionadas às alterações da coagulação. A peçonha botrópica é predominantemente coagulante e necrosante (ESTRADE et al., 1989). Trombose venosa e embolia pulmonar parecem decorrer da inoculação da peçonha diretamente na veia (RIBEIRO et al., 1995). A coagulação intravascular disseminada é uma complicação freqüentemente fatal (RIBEIRO et al., 1995).

A natureza pró-coagulante dessas peçonhas que causam este tipo de coagulação, é devida às proteases que ativam zimogênios na cascata de coagulação (HUTTON & WARRELL, 1993). Estas proteases, análogas aos fatores endógenos da coagulação, ativam a cascata em etapas específicas. Baseadas em sua especificidade, são categorizadas como ativadoras do fator X, da protrombina e como enzimas “thrombin-like”. Os ativadores do fator X são ou metaloproteases (por exemplo ativador do fator X designado como RVV-X isolado da peçonha da serpente *Vipera russellii*, WILLIAMS & ESNOUF, 1962; TAKEYA et al., 1992) ou serinoproteases (MORITA, 1998).



As enzimas “thrombin-like” possuem especificidade de hidrólise semelhante à trombina, devido ao efeito proteolítico sobre o fibrinogênio, resultando em monômeros de fibrina. Tais enzimas liberam preferencialmente o fibrinopeptídeo A (por exemplo Batroxobina isolada da peçonha da serpente *Bothrops atrox*), não ativam o fator XIII e não são inibidas pela heparina (SOUTAR & GINSBERG, 1993).

O fator XIII da cascata de coagulação não é ativado em fator XIIIa, assim, somente o coágulo “frouxo” é formado, pois não existe ligação cruzada entre os monômeros de fibrina. Dessa forma, esse coágulo é rapidamente removido da circulação tanto pela fibrinólise, como pela via do sistema retículo endotelial. Por esse motivo, as enzimas “thrombin-like” apresentam um comportamento paradoxo conhecido como “Desfibrinogenação Terapêutica”: elas induzem coagulação *in vitro* mas causam incoagulabilidade *in vivo*. Essas enzimas tornam o sangue incoagulável, pela depleção do estoque de fibrinogênio (MAHIR et al., 1987).

As proteases das peçonhas das serpentes *Trimeresurus flavoviridis* (KOSUGI et al., 1986), *Bitis gabonica* (PIRKLE et al., 1986), *Cerastes vipera* (FARID & TU, 1989), *Cerastes cerastes* (LARABA-DJEBARA et al., 1992), *Trimeresurus stejnegeri* (ZHANG et al., 1998) e *Agkistrodon caliginosus* (CHO et al., 2001) induzem coagulação do plasma, enquanto proteases das peçonhas de *Naja nigricollis* (EVANS, 1981), *Bothrops castelnaudi* (KAMIGUTI et al., 1985), *Cerastes cerastes* (DAOUD et al., 1986a, 1986b, 1987), *Bothrops alternatus* (SMOLKA et al., 1998), *Echis carinatus* (TENG et al., 1985), *Crotalus adamanteus* (MARKLAND & DAMUS, 1971), *Vipera lebetina* (SIIGUR & SIIGUR, 1991), *Bothrops atrox* (STOCKER & BARLOW, 1976) prolongam a coagulação do plasma.

A peçonha de serpentes tem uma ação coagulante que dura alguns minutos. Esta ação no local da picada limita a absorção da peçonha pela coagulação local na lesão (KOUYOUMDJIAN & POLIZELLI, 1989;



MARUYAMA et al., 1990; MILANI et al., 1997). A ação anticoagulante é mais freqüentemente encontrada e o acompanhamento do tempo de coagulação é um dos parâmetros utilizados na estimativa da gravidade do acidente ofídico (MONTEIRO et al., 1998). O mecanismo envolve três situações: ação fibrinolítica, ativação enzimática do plasminogênio e ativação da fosfolipase A<sub>2</sub>.

Este quadro decorre do fato de que as peçonhas podem conter diversas frações afetando a coagulação em várias etapas, variando seus efeitos na dependência da quantidade e local da inoculação. O efeito sobre a circulação pode ser sinérgico ou antagônico (JORGE et al., 1995).

As plaquetas são também afetadas podendo ocorrer tanto adesão, a agregação e a desagregação, podendo conduzir à plaquetopenia (KAMIGUTI et al., 1991; KOUYOUMDJIAN & POLIZELLI, 1989; MARUYAMA et al., 1990; MYINT-LWIN et al., 1985).

Alguns fenômenos cardiovasculares podem decorrer de alterações endoteliais provocadas pelas peçonhas proteolíticas. Envenenamentos crotálicos e botrópicos produzem efeitos cardiovasculares semelhantes (ESTRADE et al., 1989).

As enzimas fibrinogenolíticas encontradas nas peçonhas de serpentes podem ser classificadas em três grupos, dependendo da especificidade de hidrólise das cadeias do fibrinogênio. O primeiro grupo são aquelas com preferência de hidrólise pela cadeia A- $\alpha$  (LEONARDI et al., 2002; ESTÊVÃO-COSTA et al., 2000), o segundo pela cadeia B- $\beta$  (GUO et al., 2001; SAMEL et al., 2002) e o terceiro pela cadeia  $\gamma$  do fibrinogênio (NIKAI et al., 1984).

Muitas enzimas proteolíticas de peçonhas de serpentes, com atividades fibrinogenolítica e anticoagulante, assim como as "thrombin-like", podem ser utilizadas no desenvolvimento de drogas para o tratamento de doenças trombóticas, tais como em transplantes de órgãos e cirurgias vasculares, para a prevenção de formação de trombos na superfície desses órgãos ou prótese e para

o melhoramento da circulação sanguínea em diversas desordens vasculares, pela redução da viscosidade do sangue (BELL, 1988; STOCKER & MEIER, 1988).

A alta atividade proteolítica é uma característica importante da peçonha da serpente *Bothrops alternatus*. Este foi o principal motivo que nos levou a interessar pelo efeito proteolítico causado pela peçonha desta serpente.

## 2. OBJETIVOS

O presente trabalho teve como objetivos fracionar a peçonha da serpente *Bothrops alternatus* e caracterizar suas frações quanto à atividade proteolítica e perfil eletroforético.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Material

##### 3.1.1. Peçonha bruta de *Bothrops alternatus*

A peçonha bruta de *Bothrops alternatus* foi gentilmente doada pela Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Vera Lúcia de Campos Brites, do Instituto de Biologia da Universidade Federal de Uberlândia (INBIO-UFU) e pelo Biólogo Luiz Henrique Anzaloni Pedrosa, da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP). A peçonha bruta foi dessecada a vácuo e armazenada a  $-20^{\circ}\text{C}$  até o momento do uso.

##### 3.1.2. Cromatografia e eletroforese

- DEAE Sephacel (Amersham Pharmacia Ltda)
- Sephadex G-75 (Amersham Pharmacia Ltda)
- Heparina agarose (Amersham Pharmacia Ltda)
- Acrilamida, bis-acrilamida, TEMED, SDS, Comassie Brilliant Blue R-250, EDTA, soroalbumina bovina, azul de bromofenol,  $\beta$ -mercaptoetanol, persulfato de amônio (Sigma Chem. Co).



### 3.1.3. Padrões para determinação do peso molecular

- Padrão de peso molecular LMW (Low Molecular Weight): fosforilase b (97.000), albumina bovina (66.000), ovoalbumina (45.000), anidrase carbônica (30.000), inibidor de tripsina (20.100) e  $\alpha$ -lactoalbumina (14.400).
- Padrão de peso molecular Dalton Mark VII-L: soroalbumina bovina (66.000), ovoalbumina (45.000), gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase (36.000), anidrase carbônica (29.000), tripsinogênio (24.000), inibidor de tripsina (20.100) e  $\alpha$ -lactoalbumina (14.400).

### 3.1.4. Determinação das atividades enzimáticas e biológicas

- Fibrinogênio bovino (Sigma Chem. Co)
- Caseína pura (Lafan, Química Fina Ltda)
- Trombina bovina (Sigma Chem. Co)
- O plasma bovino foi gentilmente doado pelo Hospital Veterinário da Universidade Federal de Uberlândia (UFU).
- Animais experimentais (camundongos albinos da raça Swiss) foram gentilmente doados pela Pentapharm do Brasil (Uberlândia-MG) e mantidos no Laboratório de Química de Proteínas e Produtos Naturais da Universidade Federal de Uberlândia (UFU) na fase de experimentação.

Os demais reagentes utilizados eram de grau analítico.



## **3.2. Métodos**

### **3.2.1. Fracionamento da peçonha de *Bothrops alternatus***

#### **3.2.1.1. Fracionamento da peçonha bruta de *Bothrops alternatus* em gel de DEAE Sephacel**

Cerca de 200 mg da peçonha bruta de *Bothrops alternatus* foram dissolvidos em 2 mL de tampão bicarbonato de amônio 0,05 M, pH 7,8, centrifugados a 10.000 rpm por 10 minutos em temperatura ambiente. O sobrenadante límpido obtido foi aplicado a uma coluna de troca iônica em gel de DEAE Sephacel (1,5 x 15 cm), equilibrada com o mesmo tampão. A amostra foi eluída em temperatura ambiente com um gradiente convexo de concentração de bicarbonato de amônio (0,05-1,0M), pH 7,8, utilizando uma câmara de mistura com um volume de 150 mL. Frações de 3,0 mL foram coletadas num fluxo de 20 mL/hora por um coletor de frações GILSON. Cada fração coletada foi acompanhada em absorvância à 280 nm em um espectrofotômetro SPEKOL UV VIS (Zeiss). Em seguida um gráfico foi construído, sendo as amostras delimitadas, reunidas em "pools", dosadas, liofilizadas e armazenadas a - 20 °C.

#### **3.2.2. Cromatografia da fração D6 em gel Sephadex G-75**

A sexta fração da cromatografia em DEAE Sephacel, denominada D6, foi liofilizada, ressuspensa em tampão bicarbonato de amônio 0,05M, pH 7,8 e aplicada a uma coluna de Sephadex G-75 (2,0 x 100cm). As amostras foram eluídas com o mesmo tampão e frações de 3,0 mL foram coletadas, num fluxo de 20 mL/hora por um coletor de frações GILSON. Cada fração coletada foi acompanhada conforme descrito no item anterior 3.2.1.1).

### 3.2.3. Cromatografia em gel de afinidade da fração D6G2 em Heparina Agarose

A fração denominada D6G2 (obtida da cromatografia da fração D6 em Sephadex G-75), depois de liofilizada, foi ressuspensa em 2,0 mL de tampão Tris-HCl 20 mM pH 7,0 em  $\text{CaCl}_2$  5 mM e aplicada a uma coluna de Heparina-Agarose (1,7 x 15cm). A amostra foi eluída com tampão Tris-HCl 20 mM, pH 7,0 contendo NaCl 1,0 M e frações de 2,0 mL foram coletadas num fluxo de 40 mL/hora. A absorvância de cada fração foi acompanhada conforme descrito no item 3.2.1.1.

### 3.2.4. Quantificação de proteínas

Para quantificar as proteínas presentes nas amostras de peçonha, soluções contendo de 0,1 a 2,0 mg de proteínas foram submetidas à dosagem pelo método do microbiureto, conforme descrito por ITZHAKI e GILL (1964). A curva padrão foi construída utilizando-se soroalbumina bovina, que apresenta um coeficiente de extinção  $\epsilon^{1,0 \text{ mg/ml}}$  em 278 nm de 0,666 (DOTY e GEIDUSCHEC, 1953). As amostras de proteínas foram completadas para o volume de 1,0 mL com água deionizada, aos quais foram acrescentados 500  $\mu\text{L}$  dos reagentes R1 ou R2 (previamente preparados em nosso laboratório). A seguir, foi realizada a leitura em espectrofotômetro SPEKOL UV VIS da Zeiss a 310nm, contra um branco sem proteína. O reagente R1 é composto por 0,21%  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  dissolvido em NaOH 30,4% e o R2 é formado por uma solução de NaOH a 30%.

### **3.2.5. Ensaio Enzimáticos**

#### **3.2.5.1. Teste de degradação do fibrinogênio bovino**

Foi realizado segundo OLIVEIRA et al. (1999). Em 50 $\mu$ L de uma solução de fibrinogênio bovino (1,5 mg/mL salina) foram adicionados 5  $\mu$ g de proteínas e a solução incubada por até 60 min a 37 °C. As amostras foram dissolvidas em 25  $\mu$ L de tampão Tris HCl 0,06 M, pH 6,8, contendo glicerol a 10% (v/v),  $\beta$ -mercaptoetanol a 10% (v/v), SDS a 2% (m/v) e azul de bromofenol 0,05%. Em seguida, foram aquecidas a 100 °C por 3 minutos e submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida a 14% com SDS, como agente desnaturante.

#### **3.2.5.2. Teste de degradação do coágulo de fibrina**

O coágulo de fibrina foi formado adicionando-se cerca de 10 unidades de trombina bovina em 50  $\mu$ L de uma solução de fibrinogênio bovino (1,5 mg/mL de salina). A atividade fibrinolítica foi realizada e analisada conforme descrito no item anterior (3.2.5.1).

#### **3.2.5.3. Atividade coagulante sobre o plasma bovino**

Amostras contendo 5  $\mu$ g de proteínas foram diluídas para um volume final de 50  $\mu$ L em salina e aplicadas a 200  $\mu$ L de plasma bovino a 37 °C. A atividade foi caracterizada pelo imediato aparecimento da rede de fibrina em comparação com o tempo de coagulação do controle, no qual contém cloreto de cálcio na concentração final de 0,04 M.



#### **3.2.5.4. Teste de degradação da caseína**

Foi realizada conforme descrito no item 3.2.5.1, substituindo o fibrinogênio bovino pela caseína.

#### **3.2.5.5. Ensaio de incoagulabilidade sangüínea**

O ensaio de desfibrinogenação foi realizado segundo o método descrito por GENE et al. (1989), com algumas modificações. Cerca de 20 µg de proteínas foram injetados intraperitonealmente em camundongos, num volume final de 200 µL de salina. Após uma hora, os animais foram sacrificados com éter e a atividade foi determinada medindo-se o tempo de coagulação do sangue, obtido por punção cardíaca. Camundongos controles receberam 200 µL de salina.

#### **3.2.5.6. Teste com inibidores enzimáticos**

O efeito dos inibidores de proteases foi estudado utilizando EDTA 10 mM, 1,10 fenantrolina 10 mM, PMSF 10 mM, aprotinina 10 mM, leupetina 1 mM e β-mercaptoetanol 10 mM sobre a atividade fibrinogenolítica. Para cada ensaio, a enzima era pré-incubada durante 30 minutos à temperatura ambiente com o inibidor. Em seguida, a atividade era realizada como descrita anteriormente (3.2.5.1).

#### **3.2.6. Efeitos do pH sobre a atividade proteolítica**

Cerca de 5 µg de amostra foram dissolvidos para um volume final de 50 µL de salina e incubados a 37 °C, durante 60 minutos, em diferentes pHs (3, 7 e

9) ou em tempos diferentes (15, 30, 45 ou 60 min) em pH 7,0. Em seguida as amostras foram colocadas em banho de gelo e as atividades proteolíticas sobre o fibrinogênio bovino e caseína foram determinadas como descrito nos itens 3.2.5.1 e 3.2.5.4, respectivamente.

### **3.2.7. Eletroforese em gel de poliacrilamida**

#### **Preparação dos géis**

Dois espaçadores em forma de fita foram utilizados para formar entre duas placas de vidro (9,5 x 10,5 x 0,2 cm), um espaço retangular de aproximadamente 1,0 mm de espessura. Com o auxílio de um suporte de montagem, as placas foram imobilizadas verticalmente, formando assim uma câmara que era preenchida com a solução do gel.

Terminada a polimerização do gel, a placa foi colocada em uma cuba de acrílico e conectada aos eletrodos. A eletroforese foi conduzida por uma corrente constante de 25 mA por aproximadamente 50 minutos.

Após a eletroforese, os géis foram retirados da placa e mergulhados em uma solução fixadora (metanol 50%; ácido acético 10%) por 5 minutos, sendo posteriormente corados por aproximadamente 10 minutos com Coomassie Brilliant Blue R-250 0,2% (m/v) em água-metanol- ácido acético (40:50:10 v/v). Em seguida, os géis foram descorados por uma solução de etanol a 30% e depois prensados entre duas folhas de papel celofane poroso através de bastidores fixados por garras e deixados à temperatura ambiente por aproximadamente 2 a 3 dias para a secagem. Neste procedimento, os géis se desidratam, transformando-se numa fina película entre as folhas de celofane, que são recortadas e guardadas para análise posterior e fotografadas.



### 3.2.7.1. Eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes para a determinação do peso molecular

As eletroforeses para a estimativa dos pesos moleculares foram realizadas segundo o método de LAEMMLI (1970), utilizando-se géis de poliacrilamida com SDS (dodecil sulfato de sódio) como agente desnaturante. Na preparação dos géis a 5% e 14% foram utilizadas as seguintes soluções:

SOLUÇÕES ESTOQUES	VOLUME ( $\mu$ L)	
	Gel de separação (14%)	Gel de empilhamento (5%)
Tris-HCl 2M pH 8,8	1.170	-
Tris-HCl 2M pH 6,8	-	167
EDTA 200mM	63	27
Acrilamida:bis (30: 0,8)	2.920	435
Água deionizada	2015	1.990
TEMED	7,5	2,5
Persulfato de amônio (10%)	37,5	18

A solução trizma base 0,1 M, EDTA 7,8 mM, glicina 0,77 M e SDS 0,3% (m/v) pH 8,3 foi utilizada como tampão para o cátodo e a mesma solução, porém sem glicina, para o ânodo.

As amostras foram dissolvidas em água deionizada. Em seguida foi adicionado 50% de tampão STOP (Tris-HCl 187 mM pH 6,8, SDS 6%, EDTA 6 mM, azul de bromofenol 1% e glicerol 27%) e 10% de  $\beta$ -mercaptoetanol. Posteriormente, as amostras foram aquecidas a 100 °C durante 3 minutos e aplicadas ao gel de poliacrilamida.

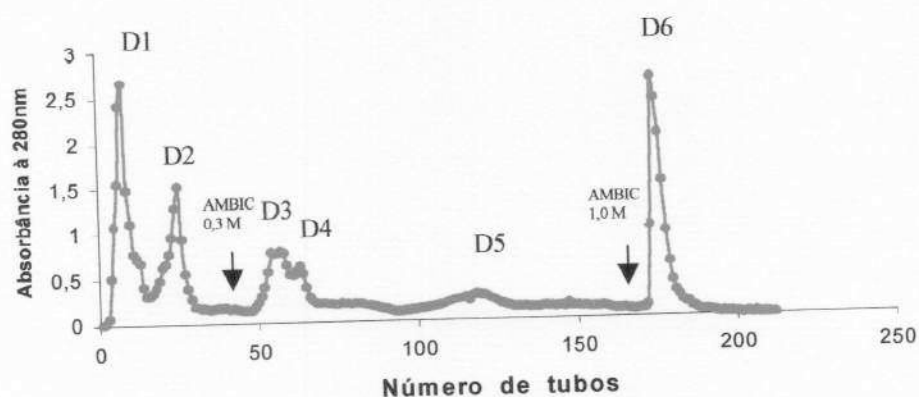
Foram utilizados os seguintes padrões para determinação dos pesos moleculares: 1 - LMW (Low Molecular Weight): fosforilase b (97.000), albumina bovina (66.000), ovoalbumina (45.000), anidrase carbônica (30.000), inibidor de tripsina (20.100) e  $\alpha$ -lactoalbumina (14.400); 2 - Dalton Mark VII-L:

soroalbumina bovina (66.000), ovoalbumina (45.000), gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase (36.000), anidrase carbônica (29.000), tripsinogênio (24.000), inibidor de tripsina (20.100) e  $\alpha$ -lactoalbumina (14.400).

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Fracionamento da peçonha bruta de *Bothrops alternatus* em gel de DEAE Sephacel

O fracionamento da peçonha bruta de *Bothrops alternatus* foi inicialmente realizado em gel de DEAE Sephacel em um gradiente convexo de concentração em tampão bicarbonato de amônio 0,05 a 1 M em pH 7,8. O perfil cromatográfico está mostrado na figura 01. A peçonha total foi resolvida em seis frações proteolíticas denominadas de D1 a D6. Sua recuperação protéica realizada por absorvância total à 280nm foi de aproximadamente 64,6 % (tabela 01).



**Figura 01:** Fracionamento de 200 mg da peçonha bruta de *Bothrops alternatus* em coluna de DEAE Sephacel (1,5 X 15 cm), equilibrada com tampão bicarbonato de amônio 0,05M, pH 7,8. As amostras foram eluídas num gradiente convexo de concentração (0,05 – 0,3 M e 0,3 – 1,0 M) do mesmo tampão, num fluxo de 20 mL/h à temperatura ambiente. Frações de 3 mL foram coletadas.

**Tabela 01:** Recuperação protéica por absorvância à 280nm das frações obtidas do fracionamento da peçonha bruta de *B. alternatus* em DEAE Sephacel

Amostras	Unidades totais de $A_{280nm}$	Recuperação Protéica (%)**
PB*	182,87	100,00
D1	29,53	16,15
D2	28,68	15,68
D3	10,19	5,57
D4	7,76	4,24
D5	10,45	5,71
D6	31,52	17,24
<b>Total</b>	<b>118,13</b>	<b>64,59</b>

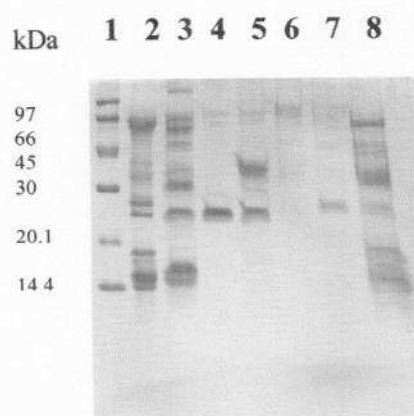
\* PB - Peçonha bruta de *Bothrops alternatus*.

\*\* Recuperação protéica realizada pela absorvância total à 280 nm de cada fração.



#### 4.1.1. Eletroforese em gel de poliacrilamida a 14 % em condições desnaturantes

A figura 02 mostra o resultado da eletroforese em gel de poliacrilamida a 14% em condições desnaturantes da peçonha bruta e das frações obtidas a partir do fracionamento em gel de DEAE Sephacel. Nesta mesma figura podemos observar que a fração D2 é formada por uma proteína majoritária com um peso molecular próximo à 23.000. Todas as demais frações são constituídas por várias proteínas.

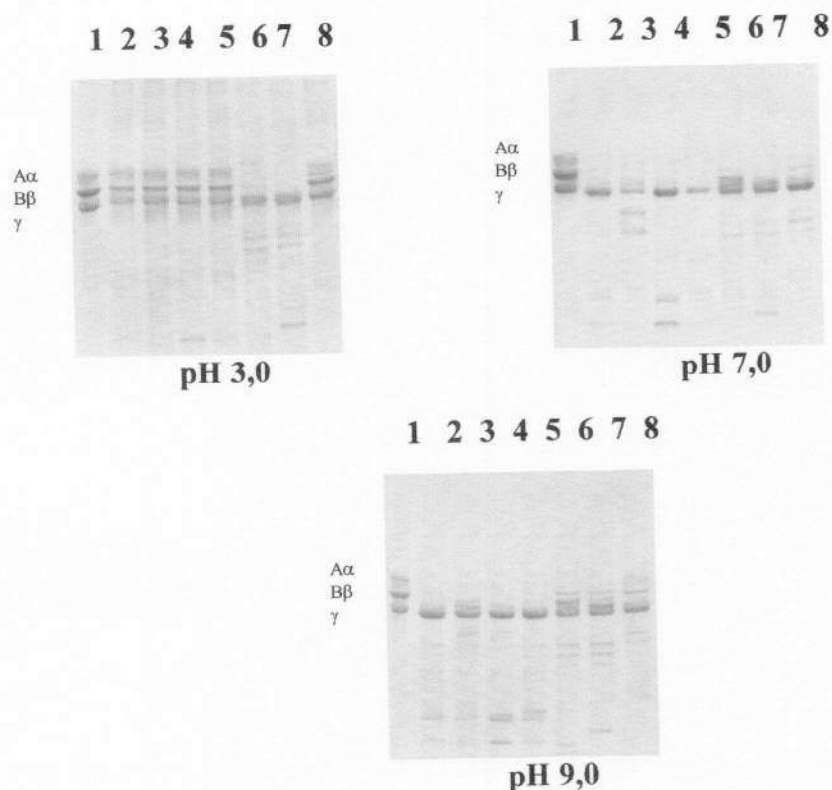


**Figura 02:** Eletroforese em gel de poliacrilamida a 14% com agentes desnaturantes da peçonha bruta de *Bothrops alternatus* e das frações obtidas no fracionamento com a resina DEAE Sephacel. Linha 1- Padrão de peso molecular LMW (Low Molecular Weight): fosforilase b (97.000), albumina bovina (66.000), ovoalbumina (45.000), anidrase carbônica (30.000), inibidor de tripsina (20.100) e  $\alpha$ -lactoalbumina (14.400); 2- Peçonha bruta de *Bothrops alternatus* ; 3- D1; 4- D2; 5- D3; 6- D4; 7- D5; 8- D6.

Condições: corrente: 25 mA; tempo de corrida: 50 minutos; solução fixadora: metanol 50 % - ácido acético 10 %; solução corante: solução 0,2% de Coomassie Brilhante Blue R-250 em metanol 50 %; solução descorante: etanol a 30%.

#### 4.1.2. Atividade fibrinogenolítica pH dependente

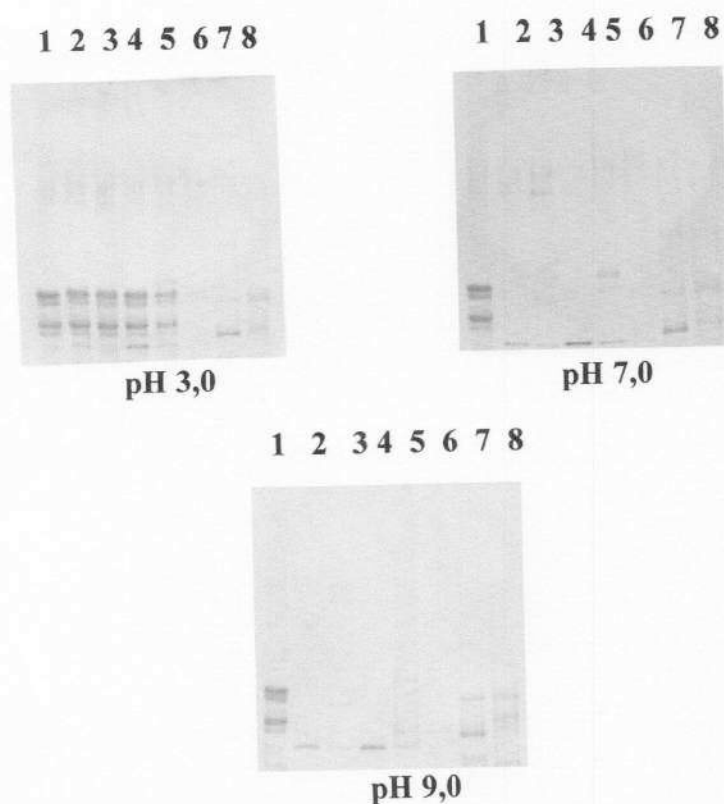
Os resultados obtidos para a atividade fibrinogenolítica em diferentes pHs (3, 7 e 9) da peçonha bruta e das frações isoladas (D1 a D6) estão apresentados na figura 03. A peçonha bruta, assim como as frações D1 a D6 degradaram melhor o fibrinogênio bovino em pH 7,0 ou 9,0. Podemos, ainda, observar que a peçonha bruta e todas as frações foram capazes de degradar em maior ou menor intensidade, as cadeias A- $\alpha$  e B- $\beta$ , mas nunca a cadeia  $\gamma$  do fibrinogênio bovino. Por outro lado, podemos observar que a peçonha bruta e as frações D1, D2, D3 e D6, apresentam pouca ou nenhuma atividade fibrinogenolítica em pH 3,0. As frações D4 e D5 parecem hidrolisar as cadeias A- $\alpha$  e B- $\beta$  independentemente do pH do meio.



**Figura 03:** Eletroforese em gel de poliacrilamida a 14% com agentes desnaturantes dos produtos de hidrólise do fibrinogênio bovino, causada pela peçonha bruta (PB) e pelas frações isoladas por troca iônica em DEAE Sephacel. Linha 1- fibrinogênio bovino controle, linhas 2 a 8: fibrinogênio incubado durante 60 min com PB e as frações D1 a D6, respectivamente.

### 4.1.3. Atividade caseinolítica pH dependente

A figura 04 mostra os resultados obtidos da atividade caseinolítica em diferentes pHs (3, 7 e 9) da peçonha bruta e das frações D1 a D6. Assim como na atividade fibrinogenolítica, a peçonha bruta e todas as frações apresentaram uma maior degradação da caseína em pH 7,0 ou 9,0. As frações D1 e D4 em pHs 7,0 ou 9,0, hidrolisaram completamente a caseína. A peçonha bruta e as frações D1, D2 e D3 quase não apresentaram atividade caseinolítica em meio ácido (pH 3,0). As frações D4, D5 e D6 apresentaram uma elevada atividade caseinolítica, independente do pH do meio.



**Figura 04:** Eletroforese em gel de poliacrilamida a 14% com agentes desnaturantes dos produtos de hidrólise da caseína, causada pela peçonha bruta (PB) e pelas frações (D1 a D6) isoladas por troca iônica em DEAE Sephacel. Linha 1- caseína controle, linhas 2 a 8: caseína incubada durante 60 min com PB e as frações D1 a D6, respectivamente.



#### 4.1.4. Atividade fibrinogenolítica tempo dependente

O teste de degradação do fibrinogênio bovino incubado com a peçonha bruta e com as frações (D1 a D6) por um período de 15 a 60 minutos, em pH 7,0, está mostrado na figura 05. Podemos observar que a hidrólise do fibrinogênio aumentou com o decorrer do tempo. A peçonha bruta e as frações D1, D2 e D3 apresentaram uma maior atividade fibrinogenolítica quando comparadas às demais frações. Todas as amostras testadas hidrolisaram a cadeia A- $\alpha$  mais rapidamente que a cadeia B- $\beta$  e parece não alterar a cadeia  $\gamma$  do fibrinogênio bovino.

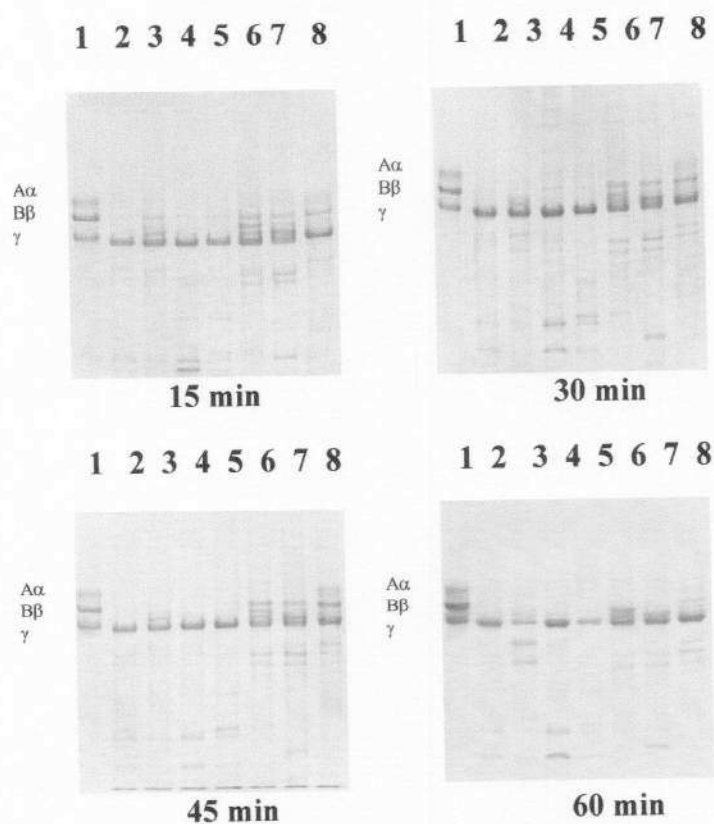
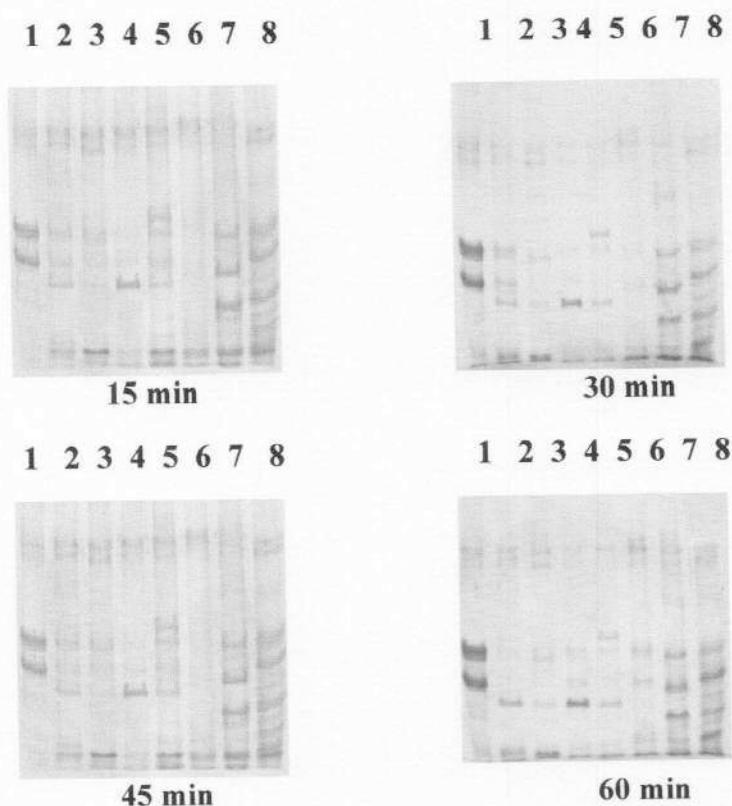


Figura 05: Eletroforese em gel de poliacrilamida a 14% com agentes desnaturantes dos produtos de hidrólise do fibrinogênio bovino, causada pela peçonha bruta (PB) e pelas frações obtidas por troca iônica em DEAE Sephacel. Linha 1- fibrinogênio bovino controle, linhas 2 a 8: fibrinogênio incubado por até 60 min com PB e as frações D1 a D6, respectivamente.



#### 4.1.5. Atividade caseinolítica tempo dependente

A figura 06 mostra a atividade proteolítica sobre a caseína da peçonha bruta e das frações D1 a D6 quando incubados por até 60 min em pH 7,0. A degradação da caseína não foi muito diferente com os tempos de incubação de 15 a 60 minutos. A peçonha bruta e as frações D1 a D4 apresentaram uma maior atividade caseinolítica quando comparadas às demais frações (D5 e D6).



**Figura 06:** Eletroforese em gel de poliacrilamida a 14% com agentes desnaturantes dos produtos de hidrólise da caseína, causada pela peçonha bruta (PB) e pelas frações obtidas por troca iônica em DEAE Sephacel. Linha 1- caseína controle, linhas 2 a 8: caseína incubada por até 60 min com PB e as frações D1 a D6, respectivamente.

#### 4.1.6. Atividade coagulante sobre o plasma bovino

A atividade coagulante sobre o plasma bovino da peçonha bruta de *Bothrops alternatus* e das frações obtidas do fracionamento em gel de DEAE Sephacel está mostrada na tabela 02. A atividade coagulante ficou restrita somente à fração D3, a qual coagulou o plasma ligeiramente mais rápido do que a peçonha bruta.

**Tabela 02:** Atividade coagulante sobre o plasma bovino da peçonha bruta de *bothrops alternatus* e das frações obtidas a partir da resina DEAE Sephacel

Amostras	Tempo de coagulação (s)
CaCl <sub>2</sub> 0,2M	188.00
PB*	44.16
D1	> 240.00
D2	> 240.00
D3	31.64
D4	> 240.00
D5	> 240.00
D6	> 240.00

\* Peçonha bruta de *Bothrops alternatus*

Amostras contendo 5 µg de proteínas foram diluídas para um volume final de 50 µl de salina e aplicadas em 200 µl de plasma bovino incubados à 37° C, conforme descrito em material e métodos.

#### 4.1.7. Ensaio de incoagulabilidade sangüínea

As frações D1 a D6 foram injetadas intraperitonealmente em camundongos. As frações D1, D3 e D6, tornaram o plasma incoagulável, mesmo após 24 horas da sua inoculação.

#### 4.2. Cromatografia em gel filtração da fração D6 em Sephadex G-75

A cromatografia da fração D6 foi realizado em gel de Sephadex G-75 em tampão bicarbonato de amônio 0,05 M, pH 7,8. O perfil cromatográfico está mostrado na figura 07. A fração D6 foi resolvida em três subfrações denominadas de D6G1, D6G2 e D6G3, respectivamente.

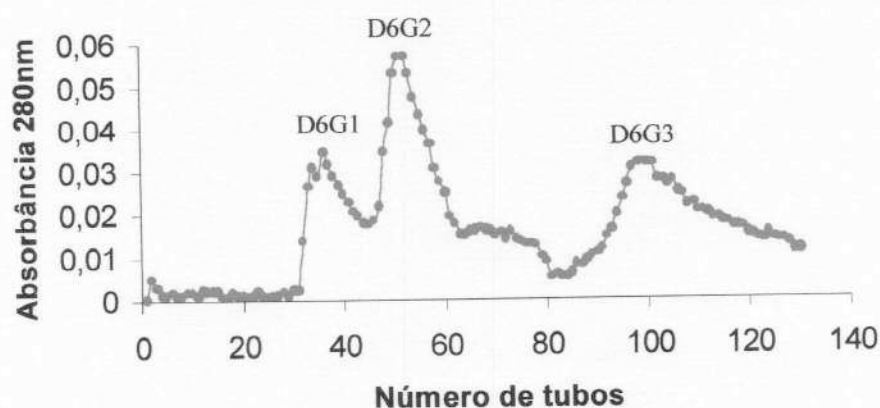
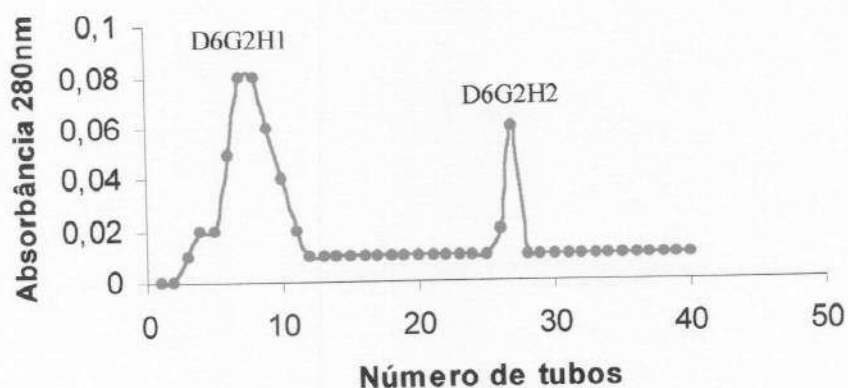


Figura 07: Cromatografia da fração D6 em coluna de Sephadex G-75 (2,0 X 100 cm), equilibrada com tampão bicarbonato de amônio 0,05M, pH 7,8. As amostras foram eluídas num fluxo de 20 mL/h à temperatura ambiente. Frações de 3 mL foram coletadas.

#### 4.3. Cromatografia em gel de afinidade da fração D6G2 em Heparina Agarose

A subfração D6G2 foi cromatografada em gel de Heparina Agarose. Esse passo resultou em duas frações denominadas de D6G2H1 e D6G2H2, respectivamente. (Figura. 08).

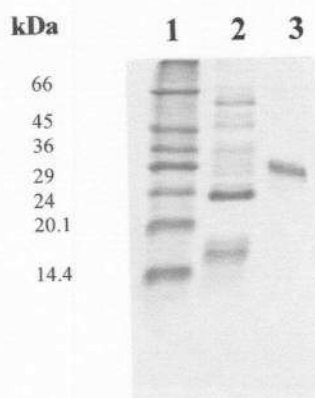




**Figura 08:** Cromatografia da fração D6G2 em coluna de Heparina Agarose (1,7 x 15 cm), equilibrada com tampão Tris HCl 20 mM + CaCl<sub>2</sub> 5 mM, pH 7,0. As amostras foram eluídas com Tris HCl 20 mM pH 7,0 contendo NaCl 1,0M, num fluxo de 40 mL/h à temperatura ambiente. Frações de 2 mL foram coletadas.

#### 4.3.1. Eletroforese em gel de poliacrilamida a 14 % com agentes desnaturantes para determinação do peso molecular

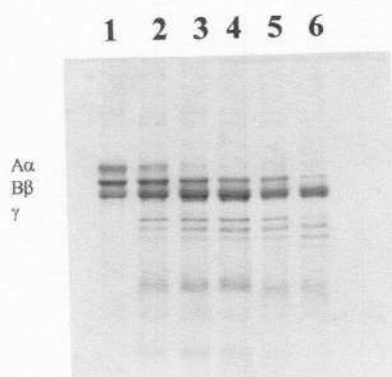
A figura 09 mostra o resultado da eletroforese em gel de poliacrilamida a 14% da peçonha bruta e da fração D6G2H1 (agora chamada de MPA: Metaloprotease de *Alternatus*), a qual apresentou banda única, com atividade proteolítica sobre o fibrinogênio, fibrina e caseína. A enzima não apresentou atividade coagulante, PLA<sub>2</sub> e nem hemorrágica. O peso molecular aparente da MPA encontrado foi de aproximadamente 29.000, sob condições redutoras.



**Figura 09:** Eletroforese em gel de poliacrilamida com agentes desnaturantes a 14%. Linha 1- Padrão de peso molecular Dalton Mark VII-L: soroalbumina bovina (66.000), ovoalbumina (45.000), gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase (36.000), anidrase carbônica (29.000), tripsinogênio (24.000), inibidor de tripsina (20.100) e  $\alpha$ -lactoalbumina (14.400); 2- Peçonha bruta de *Bothrops alternatus*; 3- MPA.

### 4.3.2. Atividade proteolítica da MPA sobre o fibrinogênio, fibrina e caseína

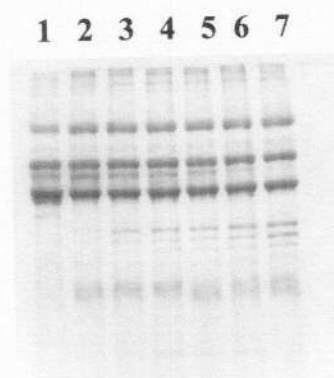
As figuras 10, 11 e 12 mostram o resultado da eletroforese em gel de poliacrilamida a 14% da atividade proteolítica da fração MPA sobre o fibrinogênio, fibrina e caseína, respectivamente. Dentre todas as atividades testadas, a atividade fibrinogenolítica foi a melhor evidenciada. A enzima MPA foi capaz de hidrolisar primeiro a cadeias A- $\alpha$ , depois a cadeia B- $\beta$ , mas não mostrou nenhum efeito sobre a cadeia  $\gamma$  do fibrinogênio bovino.



**Figura 10:** Eletroforese em gel de poliacrilamida a 14% com agentes desnaturantes dos produtos de digestão do fibrinogênio bovino pela enzima MPA.

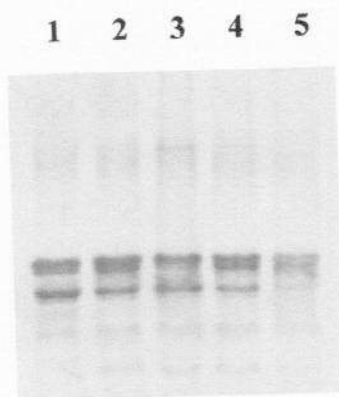
Linha 1 - Fibrinogênio Controle; linhas 2 a 6 - Fibrinogênio incubado com MPA por 15, 30, 45, 60 e 180 min, respectivamente.

Uma pequena atividade fibrinolítica da enzima MPA pode ser evidenciada pelo aparecimento de subprodutos de hidrólise de fibrina (figura 11).



**Figura 11:** Eletroforese em gel de poliacrilamida a 14% com agentes desnaturantes dos produtos de digestão da fibrina bovina pela enzima MPA. Linha 1 - Fibrina Controle; linhas 2 a 7 - Fibrina incubada com MPA por 15, 30, 45, 60, 180 e 300 min, respectivamente.

Os resultados mostrados pela figura 12 sugerem que a enzima MPA apresenta uma baixa atividade caseinolítica, mesmo quando incubada por um período de até 24 horas.

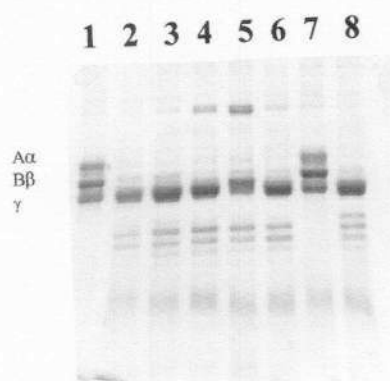


**Figura 12:** Eletroforese em gel de poliacrilamida a 14% com agentes desnaturantes dos produtos de digestão da caseína pela enzima MPA. Linha 1 - Caseína Controle; linhas 2 a 5 - Caseína incubada com MPA por 1, 3, 6 e 24 horas, respectivamente.



### 4.3.3. Efeito dos agentes inibidores sobre a atividade fibrinogenolítica da enzima MPA

A figura 13 mostra o efeito dos agentes inibidores de proteases sobre a atividade fibrinogenolítica da enzima MPA. Dentre os inibidores testados, somente a 1,10 fenantrolina foi capaz de inibir completamente a atividade da enzima. Os demais inibidores (PMSF, aprotinina, EDTA,  $\beta$ -mercaptoetanol e leupeptina) não mostraram efeitos sobre essa atividade.



**Figura 13:** Eletroforese em gel de poli-acrilamida a 14 % com agentes desnaturantes dos produtos de digestão do fibrinogênio bovino, causada pela enzima MPA tratada com inibidores de proteases. 1-fibrinogênio bovino controle; 2- fibrinogênio incubado com MPA por 180 minutos; 3 a 8- fibrinogênio mais MPA incubada por 60 minutos com PMSF 10mM, aprotinina 10mM, EDTA 10mM,  $\beta$ -mercaptoetanol 10mM e 1,10 fenantrolina 10mM e leupeptina 1mM, respectivamente.

## 5. DISCUSSÃO

O estudo da peçonha de *Bothrops alternatus*, popularmente chamada de urutu-cruzeiro, é particularmente interessante, pois, esta é uma das serpentes mais abundantes do Triângulo Mineiro, embora sua peçonha tenha sido pouco explorada.

Uma característica importante dessa peçonha é sua alta atividade proteolítica, responsável pelos efeitos locais e sistêmicos observados durante o envenenamento.

O trabalho ora proposto teve como objetivo fracionar a peçonha bruta de *Bothrops alternatus*, identificando as frações que apresentaram atividade proteolítica.

Para os dois primeiros fracionamentos realizados foram utilizados tampão bicarbonato de amônio, pois este sal é volátil e, portanto, facilmente retirado das amostras durante a liofilização. Dessa forma, não houve necessidade de submeter as frações obtidas ao processo de diálise após cada etapa cromatográfica.

Após o fracionamento, as frações isoladas foram quantificadas pelo método do microbiureto, liofilizadas e armazenadas a  $-20^{\circ}\text{C}$  até o momento da realização dos ensaios enzimáticos.

A peçonha bruta de *Bothrops alternatus* foi inicialmente cromatografada em gel de DEAE Sephacel em pH 7,8. Este é o pH ótimo para a maioria das enzimas proteolíticas já isoladas e descritas na literatura (ZAGANELLI et al, 1996; LOBO DE ARAÚJO et al, 1998; SMOLKA et al, 1998; CASTRO et al, 1998; OLIVEIRA et al, 1999; SOARES et al, 1999; RODRIGUES et al., 2000). Desse fracionamento foram obtidas seis frações principais denominadas de D1 a D6 (figura 01), as quais mostraram atividade proteolítica (fibrinogenolítica e caseinolítica).

A recuperação protéica foi estimada por meio da absorvância total à 280 nm, obtendo-se cerca de 64,6 %. Este percentual de recuperação pode ser considerado baixo quando comparado com os valores encontrados para outras peçonhas botrópicas. Segundo NISENBOM et al., (1986), resinas freqüentemente usadas no fracionamento de outras peçonhas não apresentaram recuperação protéica satisfatória para a peçonha de *Bothrops alternatus*.

Na eletroforese em gel de poliacrilamida a 14% com agentes desnaturantes da peçonha bruta e das frações obtidas a partir do fracionamento realizado em gel de DEAE Sephacel observou-se que a fração D2 possui uma proteína majoritária com um peso molecular próximo à 23.000. Todas as demais frações eram constituídas por várias proteínas (figura 02). Estudos posteriores poderão ser realizados com a fração D2 pela possibilidade de obtenção de proteína mais pura e possivelmente uma melhor caracterização da sua atividade proteolítica.

Nossos resultados demonstraram que a peçonha bruta e as frações apresentaram atividade fibrinogenolítica em pH 7,0 ou 9,0, em um tempo de incubação de até 1 hora (figuras 03 e 05, respectivamente). Por outro lado, as frações D1, D2, D3, D6 e a peçonha bruta não apresentaram atividade em pH 3,0 (figura 03).

A especificidade de hidrólise das cadeias do fibrinogênio pode ser observada nas figuras 03 e 05, onde observamos que todas as frações foram



capazes de hidrolisar o fibrinogênio bovino, porém de maneira diferente. É interessante ressaltar que a peçonha bruta e as frações D1, D2, D3 e D6, em pH 7,0 ou 9,0, degradaram primeiro a cadeia A- $\alpha$  e depois a B- $\beta$  do fibrinogênio bovino (figura 03). Nenhuma fração foi capaz de hidrolisar a cadeia  $\gamma$ . Esse padrão de especificidade é comum para a maioria das fibrinogenases isoladas de peçonhas de serpentes (OLIVEIRA et al., 1999; XIUXIA et al., 2001). As frações D4 e D5 parecem hidrolisar preferencialmente a cadeia A- $\alpha$ , independentemente do pH testado (figura 03).

Foi observado que a hidrólise do fibrinogênio aumentou com o decorrer do tempo. A peçonha bruta, assim como D1, D2 e D3 apresentaram uma maior atividade fibrinogenolítica quando comparadas às demais frações (figura 05).

A peçonha bruta e todas as frações também degradaram melhor a caseína em pH 7,0 ou 9,0 (figura 04). As frações D1 e D4, em pHs 7,0 ou 9,0, hidrolisaram completamente a caseína. Essas duas frações apresentaram uma atividade caseinolítica maior que a peçonha total. A peçonha bruta e as frações D1, D2 e D3 quase não apresentaram atividade proteolítica em meio ácido (pH 3,0) (figura 04).

A degradação da caseína não foi muito diferente com os tempos de incubação de 15 a 60 minutos (figura 06). Esses resultados mostraram que a peçonha da serpente *Bothrops alternatus* é muito rica em enzimas proteolíticas.

A fração D6, obtida a partir da cromatografia da peçonha bruta de *Bothrops alternatus* em gel DEAE Sephacel, foi submetida a outros dois passos distintos de fracionamento: Sephadex G-75 (gel filtração) e Heparina Agarose (gel de afinidade). Esses procedimentos resultaram no isolamento de uma enzima altamente fibrinogenolítica.

O fracionamento em Sephadex G-75 resultou em três frações denominadas de D6G1, D6G2 e D6G3 (figura 07). Neste gráfico, é possível notar que D6G2 apresentou-se mais simétrica em relação às demais frações. Por esse motivo, esta fração foi cromatografada em gel de Heparina Agarose,

resultando em duas frações denominadas de D6G2H1 (MPA) e D6G2H2 (figura 08). A enzima MPA (Metaloprotease de *Alternatus*), quando analisada em SDS-PAGE a 14 %, apresentou cadeia única e massa molecular aparente de 29 kDa, na presença do agente redutor  $\beta$ -mercaptoetanol (figura 09).

Nenhum resultado satisfatório por eletroferese em gel de poliacrilamida, em condições nativas, foi obtido para a enzima MPA (resultado não mostrado). Nossos resultados revelam que as metaloproteases purificadas a partir das peçonhas de serpentes não apresentam boa resolução para esse tipo de eletroforese.

A enzima MPA apresentou elevada atividade fibrinogenolítica, mas não apresentou nenhuma atividade coagulante, fosfolipásica A2 ou hemorrágica.

Os testes de degradação das cadeias do fibrinogênio bovino mostraram que a enzima MPA degrada a cadeia A- $\alpha$  mais rapidamente que a cadeia B- $\beta$ , enquanto que a cadeia  $\gamma$  permanece inalterada. Esses resultados sugerem que a enzima MPA pertence à classe das  $\alpha$ -fibrinogenases (figura 10).

Aparentemente, a enzima MPA apresentou pouca atividade proteolítica sobre as cadeias da fibrina e caseína. A atividade proteolítica dessa enzima, sobre esses substratos, pode ser evidenciada pelo aparecimento de subprodutos de hidrólise, quando analisada em SDS-PAGE a 14 % (figuras 11 e 12).

A diferença de hidrólise nos diferentes substratos (fibrinogênio, fibrina e caseína) sugere que a enzima MPA possui uma alta atividade fibrinogenolítica, apresentando baixa ou nenhuma atividade fibrinolítica e caseinolítica.

A atividade proteolítica sobre o fibrinogênio bovino foi inibida pelo agente quelante 1,10 fenantrolina. Os inibidores  $\beta$ -mercaptoetanol, PMSF, leupeptina e aprotinina não apresentaram efeito sobre essa atividade (figura 13). Esses resultados são concordantes com a literatura e sugerem que a MPA pertence à família das metaloproteases (OWNBY et al., 1994).

As enzimas fibrinogenolíticas, assim como as "thrombin-likes", despertaram interesse no uso terapêutico para o tratamento de doenças



trombóticas e oclusão arterial (MARKLAND, 1998). Em síntese, o estudo do mecanismo de ação dessas enzimas tem revelado que elas causam uma rápida e eficiente trombólise, ou seja, desfazem os coágulos de fibrina, formados quando há disfunção do sistema hemostático. Por esse motivo, essas enzimas têm despertado grande interesse para a clínica médica (WILLIS et al., 1989; AHMED et al., 1990; MAO et al., 1995; GASMI et al., 1997).

Nossos resultados mostraram que a enzima MPA, quando injetado intraperitonealmente, tornou o sangue de camundongos incoagulável. Esses dados são promissores e podem sugerir um possível uso terapêutico para essa enzima em várias disfunções circulatórias. Entretanto, é necessário a realização de outros estudos para melhor caracterizar a enzima MPA e verificar sua possível aplicação terapêutica como agente antitrombótico.



## 6. CONCLUSÃO

Nossos resultados mostraram que a peçonha da serpente *Bothrops alternatus* é rica em enzimas proteolíticas capazes de degradar vários substratos, tais como o fibrinogênio bovino e a caseína.

Os procedimentos cromatográficos utilizados neste trabalho nos permitiram purificar uma nova metaloprotease da peçonha de *B. alternatus*, a qual denominamos MPA. Essa enzima foi caracterizada como uma  $\alpha$ -fibrinogenase de cadeia simples, com peso molecular aparente de 29.000 e mostrou ser capaz de tornar o sangue de camundongos incoagulável.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHMED, N. K.; GADDJS, R. R.; TENNANT, K. D.; LACZ, J. P. Biological and thrombolytic properties of fibrolase: A new fibrinolytic protease from snake venom. **Haemostasis**, v. 20, p. 334, 1990.
- BARRAVIEIRA, B. **Venenos: aspectos clínicos e terapêuticos dos acidentes por animais peçonhentos**. Rio de Janeiro. EPUB, 411 p. 1999.
- BELL, W. R. Clinical trials with ancrod. In: **Hemostasis and animal venoms**, p. 541 (Pirkle, H; Markland, F. S., Jr Edds). New York: Marcel Dekker, 1988.
- BJARNASON, J. B.; FOX, J. W. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 911, p. 356-363, 1987.
- BOZOLA, A. R.; MARTELETO, L. F. N.; FERNANDES, C. D.; MATA, P. F.; POLIZELLI, C. Fasciotomia em acidente ofídico botrópico/ Fasciotomy in bothropic ophidic accident. **J. Bras. Med.**, v. 69, p. 158-165, 1995.
- CAMPBELL, J. A.; LAMAR, W. W. The venomous reptiles of Latin America. **Cornell University Press, Ithaca**, p. 180-186, 1989.
- CARDOSO, J. L., FAN, H. W., FRANCA, F. O., JORGE, M. T., LEITE, R. P., NISHIOKA, S. A., ÁVILA, A., SANO-MARTINS, I. S., TOMY, S. C., SANTORO, M. L. Randomized comparative trial of three antivenoms in the treatment of envenoming by lance-headed vipers (*Bothrops jararaca*) in São Paulo, Brazil. **Q. J. Med.** v. 86, p. 315-325, 1993.

- CASTRO, H. C.; DUTRA, D. L. S.; OLIVEIRA-CARVALHO et al. Bothroaltein, a thrombin inhibitor from the venom of *Bothrops alternatus* **Toxicon**, v. 36, n. 12, p. 1903-1912, 1998.
- CHIPPAUX, J. P.; WILLIAMS, V.; WHITE, J. Snake venom variability: methods of study, results and interpretation. **Toxicon**, v. 29, p. 1279, 1991.
- CHO, S. Y.; HAHN, B. S.; YANG, K. Y.; KIM, Y. S. Purification and characterization of calobin II, a second type of thrombin-like enzyme from *Agkistrodon caliginosus* (Korean viper). **Toxicon**, v. 39, p. 499-506, 2001.
- DAOUD, E., TU, A. T., EL-ASMAR, M. F. Mechanism of the anticoagulant, cerastase F-4 isolated from *Cerastes cerastes* (Egyptian sand viper) venom. **Thromb. Res.**, v. 41, p. 791-799, 1986a.
- DAOUD, E., TU, A. T., EL-ASMAR, M. F. Isolation and characterization of an anticoagulant proteinase, cerastase F-4 from *Cerastes cerastes* (Egyptian sand viper). **Thomb. Res.**, v. 42, p. 55-62, 1986b.
- DAOUD, E. W., HALIM, H. Y., SHABAN, E. A., EL-ASMAR, M. F. Further characterization of anticoagulant proteinase, cerastase F-4 from *Cerastes cerastes* (Egyptian sand viper) venom. **Toxicon**, v. 25, p. 891-897, 1987.
- DOTY, P.; GEIDUSCHEC, E. P. In: **The proteins**. I-A. (NEURATH, H.; BAILEY, K. Eds), 1953.
- ESTÊVÃO-COSTA, M. I.; DINIZ, C. R.; MAGALHÃES, A.; MARKLAND, F. S.; SANCHEZ, E. F. Action of metalloproteinases mutalysin I and II on several



components of the hemostatic and fibrinolytic systems. **Thromb Res.** v. 99, n. 4, p. 363-376, 2000.

ESTRADE, G.; GARNIER, D.; BERNASCONI, F.; DONATIEN, Y. Pulmonary embolism and disseminated intravascular coagulation after being bitten by a *Bothrops lanceolatus* snake. Apropos of a case. **Arch. Mal. Coeur Vaiss**, v. 82, p. 1903-1905, 1989.

EVANS, H. J. Cleavage of the A-chain of fibrinogen and the polymer of fibrin by the venom of spitting cobra (*Naja nigricollis*). **Biochim. Biophys. Acta**, v. 660, p. 219-226, 1981.

EVANS H. J., Purification and properties of fibrinogenase from the venom of *Naja nigricollis*. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 802, p. 49-54, 1984.

FABIANO, R. J., TU, A. T. **Biochemistry**, v. 20, p. 21-27, 1981

FARID, T. M.; TU, A. T. Characterization of Cerastobin, a thrombin-like enzyme from the venom of *Cerastes vipera* (Sahara sand viper). **Biochemistry**, v. 28, p. 371-377, 1989.

FRY, B.G., Structure-function properties of venom components from Australian elapids. **Toxicon**, v. 37, p. 11-32, 1999.

GAO, R., ZHANG, Y., MENG, Q.X., LEE, W.H., LI, D.S., XIANG, Y.L., WANG, W.Y. Characterization of three fibrinogenolytic enzymes from Chinese green tree viper (*Trimeresurus stejnegeri*) venom. **Toxicon**, v. 376, p. 47-467, 1998.

GASMI, A.; CHABCHOUB, A.; GUERMAZI, S.; KAROUI, H.; ELAYEB, M.; DELLAGI, K. Further characterization and thrombolytic activity in a rat model of a fibrinogenase from *Vipera lebetina* venom. **Thromb. Res**, v 86, n. 3, p. 233-242, 1997.

GENE, J. A.; ROY, A.; ROJAS, G.; GUTIÉRREZ, J. M.; CERDAS, L. Comparative study on coagulant, defibrinating, fibrinolytic and fibrinogenolytic activities of Costa Rica crotaline snake venoms and their neutralization by a polyvalent antivenom. **Toxicon**, v. 27, p. 841, 1989.

GUO, Y. W.; CHANG, T. Y.; LIN, K. T.; LIU, H. W.; SHIH, K. C.; CHENG, S. H. Cloning and functional expression of the mucrosobin protein, a beta-fibrinogenase of *Trimeresurus mucrosquamatus* (Taiwan Habu). **Protein Expr. Purif.** v. 23, n. 3, p. 483-490, 2001.

HUTTON, R. A., WARREL, D. A. Action of snake venom components on the haemostatic system. **Blood. Rev.**, v. 7, p. 176-189, 1993.

ITZHAKI, R. F.; GILL, D. M. A microbiuret method for estimating proteins. **Anal. Biochem.**, v.9, p.401-410, 1964.

JORGE, M. T., MENDONÇA, J. S., RIBEIRO, L. A., SILVA, M. L., KUSANO, E. J., CORDEIRO, C. L. Bacterial flora of the oral cavity, fangs and venom of *Bothrops jararaca*: possible source of infection at the site of bite. **Rev. Inst. Med. Trop.** São Paulo, v. 32, p. 6-10, 1990.

JORGE, M. T., RIBEIRO, L. A. Effect of reduction in the *Bothrops* antivenin dose administered in patients bitten by the *Bothrops* snake. **Rev. Assoc. Med. Bras.**, v. 40, p. 59-62, 1994.

JORGE, M. T., CARDOSO, J. L., CASTRO, S. C., RIBEIRO, L., FRANÇA, F. O., de ALMEIDA, M. E., KAMIGUTI, A. S., SANO-MARTINS, I. S., SANTORO, M. L., MANCAU, J. E. A randomized 'blinded' comparison of two doses of antivenom in the treatment of *Bothrops* envenoming in São Paulo, Brazil. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 89, p. 111-114, 1995.

KAMIGUTI, A.S., SOUSA, E.S., MORENA, P., NAHAS, L. The anticoagulant effect of *Bothrops castelnaudi* snake venom (Castelnaud's pit viper). **Toxicon**, v. 23, p. 383-392, 1985.

KAMIGUTI, A. S.; THEAKSTON, R. D.; DESMOND, H.; HUTTON, R. A. Systemic haemorrhage in rats induced by a haemorrhagic fraction from *Bothrops jararaca* venom. **Toxicon**, v. 29, p. 1097, 1991.

KINI, R. M.; EVANS, H. J. Structural domains in venom proteins: evidence that metalloproteinases and nonenzymatic platelet aggregation inhibitors (desintegrins) from snake venoms are derived by proteolysis from a common precursor. **Toxicon**, v. 30, p. 265-293, 1992.

KORNALIK, F. Toxins affecting blood coagulation and fibrinolysis. In: W.T. SHIER and D. MEBS, Editors, **Handbook of Toxinology**, Marcel Dekker, New York, p. 683-759, 1990.



KOSUGI, T. ARIGA, Y., NAKAMURA, M., KINJO, K. Purification and some chemical properties of thrombin-like enzyme from *Trimeresurus flavoviridis* venom. **Thromb. Haemost.**, v. 55, p. 24-30, 1986.

KOUYOUUMDJIAN, J. A.; POLIZELLI, C. Snake bites by *Bothrops moojeni*: correlation of the clinical picture with the snake size. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v. 31, p. 84-90, 1989.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-689, 1970.

LARABA-DJEBARA, F.; MARTIN-EAUCLAIRE, M.F.; MARCHOUT, P. A fibrinogen-clotting serine proteinase from *Cerastes cerastes* (horned viper) venom with arginine-esterase and amidase activities: purification, characterization and kinetic parameter determination. **Toxicon**, v. 30, p. 1399-1410, 1992.

LEONARDI, A.; GUBENSEK, F.; KRIZAJ, I. Purification and characterization of two hemorrhagic metalloproteinases from the venom of the long-nosed viper, *Vipera ammodytes ammodytes*. **Toxicon**, v. 40, n. 1, p.55-62, 2002.

LOBO DE ARAÚJO, A.; DONATO, J. L.; BON, C. Purification from *Bothrops lanceolatus* (Fer de Lance) venom of a fibrinogenolytic enzyme with esterolytic activity. **Toxicon**, v. 36, n. 05, p. 745-758, 1998.

MAHIR, M. S.; HYND, J. W.; FLUTE, P. T.; DORMANDY, J. A. Effects of defibrinogenation on the early potency rate of experimental small calibre arterial grafts. **Br. J. Surg.**, v. 74, p. 508, 1987.

MAO, J. P.; WANG, W. Y.; XIONG, Y. L.; LU, L. Fibrinogenase from the venom of *Trimeresurus mucrosquamatus*. **Asiatic Herpetol. Res**, v. 6, p. 78, 1995.

MARKLAND, F. S.; DAMUS, P. S. Purification and properties of a enzyme from the venom of *Crotalus adamanteus*. **J. Biol. Chem.**, v. 246, p. 6460, 1971.

MARKLAND, F. S. Snake venom fibrinogenolytic and fibrinolytic enzymes: An updated inventory. **Thromb. Haemost.**, v. 3, p. 668, 1998.

MARUYAMA, M.; KAMIGUTI, A. S.; CARDOSO, J. L.; SANO-MARTINS, I. S.; CHUDZINSKI, A. M.; SANTORO, M. L., MORENA, P.; TOMY, S. C.; ANTÔNIO, L. C.; MIHARA, H. Studies on blood coagulation and fibrinolysis in patients bitten by *Bothrops jararaca* (jararaca). **Thromb Haemost**, v. 63, p. 449-453, 1990.

MEBS, D. In **Handbook of Toxinology** (SHIER, W. T., and MEBS, D. Eds), p. 761-776. Dekker, New York, 1990.

MESQUITA, D. O. **Biometria, folidose e ecologia da população de *Bothrops alternatus* Duméril, Bibron e Duméril, 1854 (Serpentes: Crotalinae) da zona geográfica do Triângulo Mineiro e Alto Paranaíba - MG**. Uberlândia, 1997. 49f. Monografia (Ciências Biológicas) - Curso de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Uberlândia.

MILANI JÚNIOR R.; JORGE, M. T.; de CAMPOS, F. P.; MARTINS, F. P.; BOUSSO, A.; CARDOSO, J. L.; RIBEIRO, L. A.; FAN, H. W.; FRANÇA, F. O.; SANO-MARTINS, I. S.; CARDOSO, D.; IDE FERNANDEZ C.; FERNANDES, J. C.; ALDRED, V. L.; SANDOVAL, M. P.; PUORTO, G.;



THEAKSTON, R. D.; WARRELL, D. A. Snake bites by the jararacuçu (*Bothrops jararacussu*): clinicopathological studies of 29 proven cases in São Paulo State, Brazil. *QJM*, v. 90, p. 323-334, 1997.

MONTEIRO, R. Q., DUTRA, D. L.; MACHADO, O. L.; CARLINI, C. R.; GUIMARÃES, J. A.; BON, C.; ZINGALI, R. B. *Bothrops jararaca* snakes produce several bothrojaracin isoforms following an individual pattern. *Comp. Biochem Physiol B. Biochem Mol Biol*, v. 120, p. 791-798, 1998.

MORITA, T. Proteases which activate factor X. In: **Bailey, G. S.**, Editor. *Enzymes from snake venom*, Alaken Inc, Fort Collins, p. 179-208, 1998.

MYINT-LWIN, WARRELL, D. A.; PHILLIPS, R. E.; TIN-NU SWE; TUN-PE; MAUNG-MAUNG-LAY. Bites by Russell's viper (*Vipera russelli siamensis*) in Burma: haemostatic, vascular, and renal disturbances and response to treatment. *Lancet*, v. 2, p. 1259-1264, 1985.

NIKAI, T.; MORI, N.; KISHIDA, M.; SUGIHARA, H.; TU, A. T. Isolation and biochemical characterization of hemorrhagic toxin from the venom of *Crotalus atrox*. *Arch. Biochem. Biophys.*, v. 321, p. 309, 1984.

NISENBOM, H. E.; SEKI, C.; VIDAL, J. C. Phospholipase A<sub>2</sub>, from *Bothrops alternatus* (víbora de la cruz) venom: purification and some characteristic properties. *Toxicon*, v. 24, n. 03, p. 259-272, 1986.

OLIVEIRA, F.; RODRIGUES, V. M.; BORGES, M. H.; SOARES, A. M.; HAMAGUCHI, A.; GIGLIO, J. R., HOMSI-BRANDEBURGO M. I. Purification and Partial Characterization of a New Proteolytic Enzyme from the Venom *Bothrops moojeni* (Caissaca). *Biochemistry and Molecular Biology International*, v. 47, n. 6, p 1069-1077, 1999.



ORTHNER, C. L.; BHATTACHARYA, P.; STRICKLAND, D. K. Characterization of a protein C activator from the venom of *Agkistrodon contortrix contortrix*. **Biochemistry**, v. 27, 2558–2564, 1988.

OWNBY, C. L.; TERRY, R. C.; QUANZHI, L. Presence of heat-stable hemorrhagic toxins in snake venoms. **Toxicon**, v. 32, n. 8, p. 945-954, 1994.

PIRKLE, H., THEODOR, I., MIYADA, D., SIMMONS, G. Thrombin-like enzyme from venom of *Bitis gabonica*. Purification, properties and coagulant actions. **J. Biol. Chem.**, v. 261, p. 8830–8835, 1986.

QUEIROZ, L. S.; SANTO NETO, H.; ASSAKURA, M. T.; REICHL, A. P.; MANDELBAUM, F. R. Pathological changes in muscle caused by haemorrhagic and proteolytic factors from *Bothrops jararaca* snake venom. **Toxicon**, v. 23, p. 341-345, 1985.

RIBEIRO, L. A.; JORGE, M. T.; IVERSSON, L. B. Epidemiology of accidents due to bites of poisonous snakes: a study of cases attended in 1988. **Rev. Saúde Pública**, v. 29, p. 380-388, 1995.

RODRIGUES, V. M.; SOARES, A. M.; GUERRA SÁ, R.; RODRIGUES, V.; FONTES, M. R. M., GÍGLIO, J. R. Structural and Functional Characterization of Neuwiedase, a Nonhemorrhagic Fibrin(ogen)olytic Metalloprotease from *Bothrops neuwiedi* Snake Venom. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 381, nº 2, p. 213-224, 2000.

SAMEL, M.; SUBBI, J.; SIIGUR, J.; SIIGUR, E. Biochemical characterization of fibrinogenolytic serine proteinases from *Vipera lebetina* snake venom. **Toxicon**, v. 40, n. 1, p. 51-54, 2002.

SCHMIDT, M. E.; ABDELKBAKI, Y. Z.; TU, A. T. Nephrotoxic action of rattlesnake and sea snake venoms: electron-microscopic study. **J. Path.**, v. 118, p.49-53, 1976.

SEKIYA, F., ATODA, H., MORITA, T. **Biochemistry**, v. 32, p. 6892-6897, 1993.

SHANNON, J. D., BARAMOVA, E. N., BJARNASON, J. B.; FOX, J. W. Amino acid sequence of a *Crotalus atrox* venom metalloproteinase which cleaves type IV collagen and gelatin. **J. Biol. Chem.** v. 264, p. 11.575-11.583, 1989.

SIIGUR, E., SIIGUR, J. Purification and characterization of lebetase, a fibrinolytic enzyme from *Vipera lebetina* (Snake) venom. **Biochem. Biophys. Acta**, v. 1074, p. 223-229, 1991.

SMOLKA, M. B.; MARANGONI, S.; OLIVEIRA, B.; NOVELLO, J. C. Purification and partial characterization of a thrombin-like enzyme, Balterobin, from the venom of *Bothrops alternatus*. **Toxicon**, v. 36, n. 07, p. 1059-1063, 1998.

SOARES, A. M.; ESCARSO, S. H. A.; ÂNGULO, Y. et al. Structural and function characterization of myotoxin I, a Lys49 phospholipase A<sub>2</sub> homologue from *Bothrops moojeni* (caissaca) snake venom. **Arch. Biochem. Biophys**, v. 373, n. 01, p. 07-15, 1999.

SOUTAR, R. L.; GINSBERG, J. S. Anticoagulant therapy with ancrod. **Clinical Rev. Oncology/hematology**, v. 15, p. 23, 1993.

STOCKER, K.; BARLOW, G. H. The coagulant enzyme from *Bothrops atrox* venom (bathroxobin). In: **Methods in Enzymology** 45 B, p. 214-233. (LORAND, L., Ed) New York, Academic Press, 1976.

STOCKER, K. F.; MEIER, K. Thrombin-like snake venom enzymes. In: **Hemostasis and Animal Venoms**, eds H. Pirkle and F. S. Markland: p. 67. Marcel Dekker, New York, 1988.

TAKEYA, H.; NISHIDA, S.; MIYATA, T.; KAWADA, S.; SAISAKA, Y.; MORITA, T.; IWANAGA, S. Coagulation factor X activating enzyme from Russell's viper venom (RVV-X). A novel metalloproteinase with desintegrin (platelet aggregation inhibitor)-like and C-type lectin-like domains. **J. Biol. Chem.**, v. 267, p. 14109-14117, 1992.

TENG, C. M., OUYANG, C., LIN, S. C. Species difference in the fibrinogenolytic effects of fibrinogenases from *Trimeresurus mucrosquamatus* venom. **Toxicon**, v. 23, p. 777-782, 1985.

TU, A. T. In **Handbook of Natural Toxins** (TU, A. T., Ed), v. 5, p. 297-347. Dekker, New York, 1991.

XIUXIA, L.; JIASHU, C.; YINGNA, Z.; PENGXIN, Q.; GUANGMEI, Y. Purification and biochemical characterization of F II(a), a fibrinolytic enzyme from *Agkistrodon acutus* venom. **Toxicon**. v. 39, n. 8, p. 1133-1139, 2001.

WILLIAMS, W. J.; ESNOUF, M. P. The fractionation of Russell's viper (*Vipera russelli*) venom with special reference to the coagulant protein. **Biochem. J.**, v. 84, p. 52-62, 1962.



WILLIS, T. W.; TU, A. T.; MILLER, C. W. Thrombolysis with a snake venom protease in a rate model of venous thrombosis. **Thromb.**, v. 53, p. 19, 1989.

ZAGANELLI, G. L.; ZAGANELLI, M. G. M.; DINIZ, C. R., LIMA, M. E. Purification and characterization of a fibrinogen-clotting enzyme from the venom of jararacuçu (*Bothrops jararacussu*). **Toxicon**, v. 34, p. 807-819, 1996.

ZHANG, Y., GAO, R., LEE, W.-H., ZHU, S.-W., XIONG, Y.-L., WANG, W.Y. Characterization of a fibrinogen-clotting enzyme from *Trimeresurus stejnegeri* venom, and comparative study with other venom proteases. **Toxicon**, v. 36, p. 131-142, 1998.