

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

FRACIONAMENTO DA PEÇONHA DA SERPENTE  
*Bothrops alternatus* E DETERMINAÇÃO DE SUAS  
ATIVIDADES BIOLÓGICAS E ENZIMÁTICAS.

**Cristiani Baldo**

**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  
Junho-2001

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS  
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

FRACIONAMENTO DA PEÇONHA DA SERPENTE  
*Bothrops alternatus* E DETERMINAÇÃO DE SUAS  
ATIVIDADES BIOLÓGICAS E ENZIMÁTICAS.

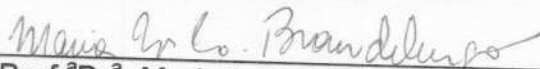
**Cristiani Baldo**

Aprovada pela Banca Examinadora em 20/06/01

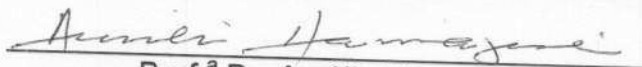
nota 100,0



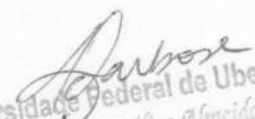
Prof.º Msc. Fábio de Oliveira



Prof.ª Dr.ª Maria Inês Homs Brandeburgo



Prof.ª Dr. Amélia Hamaguchi

  
Universidade Federal de Uberlândia  
Prof.ª Dra. Ana Angélica Almeida Barbosa  
Coordenadora do Curso de Ciências Biológicas

Uberlândia- MG  
Junho-2001

"Nada temas, pois eu te resgato, e te chamo pelo nome, és meu.  
Se tiverdes de atravessar a água, estarei contigo, e os  
rios não te submergirão. Se caminhares pelo fogo, não  
te queimarás, e a chama não te consumirá. Porque és  
precioso a meus olhos, porque te aprecio e te amo"

Is 43, 1-4

## Agradecimentos

A Deus, pelo dom da vida . Por ser minha fonte de inspiração e sabedoria.

A meus pais e irmãs , pelo carinho e apoio que foram fundamentais para a realização deste trabalho.

Ao Fábio de Oliveira, pela orientação precisa e amiga a mim dirigida. Obrigada por tudo que me ensinou, pela paciência e carinho. Tenho certeza que este trabalho é apenas o primeiro, que iremos realizar juntos.....

À Júnia de Oliveira Costa, pela amizade, esforço e dedicação que nos fizeram alcançar nossos objetivos. Sua ajuda foi fundamental para realização deste trabalho, tenho certeza que trabalharemos muito tempo juntas e conseguiremos novas vitórias.

À Prof. Maria Inês Homsí Brandeburgo, por sua contribuição valiosa no desenvolvimento deste trabalho. Meus sinceros agradecimentos e admiração;

À Prof. Amélia Hamaguchi, pelo apoio e incentivo que foram muito importantes para a realização deste trabalho.

À todos os amigos do Laboratório de Química de Proteínas e Produtos Naturais: Fran, Luiz Carlos, Luiz Fernando, Gilvan, Carla, Helen, Rodrigo, Taty, Renata, Elizângela, Ana Flávia, Fábio Moroni, Poliana, William. Agradeço por todo auxílio, atenção e carinho.

Às minhas queridas amigas Nádia e Priscila, pelo carinho, paciência e dedicação, que selaram para sempre nossa eterna amizade. Adoro vocês.

Aos funcionários Cleuber, Tianinha, Marlene, D. Nenzinha por toda ajuda e atenção.

Ao CNPq e Fapemig pelo auxílio financeiro.

E a todos que direta ou indiretamente contribuíram para realização deste trabalho....



# Sumário

1. <u>INTRODUÇÃO</u> .....	01
2. <u>OBJETIVOS</u> .....	11
3. <u>MATERIAL</u> .....	12
4. <u>MÉTODOS</u> .....	14
4.1. Fracionamento da peçonha bruta de <i>Bothrops alternatus</i> .....	14
4.1.1. Fracionamento da peçonha bruta de <i>Bothrops alternatus</i> em gel de CM Sephadex C-25.....	14
4.1.2. Fracionamento da peçonha bruta de <i>Bothrops alternatus</i> em gel de DEAE Sephadex A-25.....	15
4.1.3. Fracionamento da peçonha bruta de <i>Bothrops alternatus</i> em gel de DEAE Sephacel.....	15
4.2. Dosagem protéica.....	15
4.3. Atividades Biológicas e Enzimáticas.....	16
4.3.1. Teste de degradação do Fibrinogênio bovino.....	16
4.3.2. Atividade Proteolítica sobre a Caseína.....	16
4.4. Atividade Hemorrágica.....	17
4.5. Atividade Fosfolipásica A <sub>2</sub> .....	17
4.6. Eletroforese em gel de poliacrilamida com agentes desnaturantes.....	18
5. <u>RESULTADOS</u> .....	19
5.1. Fracionamento da peçonha bruta de <i>Bothrops alternatus</i> .....	19

5.1.1. Fracionamento da peçonha bruta de <i>Bothrops alternatus</i> em gel de CM Sephadex C-25.....	19
5.1.2. Fracionamento da peçonha bruta de <i>Bothrops alternatus</i> em gel de DEAE Sephadex A-25.....	21
5.1.2.1. Eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes.....	24
5.1.2.2. Atividades Biológicas e Enzimáticas das frações obtidas do fracionamento em gel de DEAE Sephadex A-25.....	25
5.1.2.2.1. Atividade Proteolítica sobre o fibrinogênio bovino.....	25
5.1.2.2.2. Atividade protelítica sobre a caseína.....	26
5.1.2.2.3. Atividade Hemorrágica.....	27
5.1.3. Fracionamento da peçonha bruta de <i>Bothrops alternatus</i> em gel de DEAE Sephacel.....	28
5.1.3.1. Eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes.....	31
5.1.3.2. Atividades Biológicas e Enzimáticas das frações obtidas do fracionamento em gel de DEAE Sephacel.....	32
5.1.3.2.1. Atividade Proteolítica sobre o fibrinogênio bovino.....	32
5.1.3.2.2. Atividade protelítica sobre a caseína.....	33
5.1.3.2.3. Atividade Hemorrágica.....	34
6. <u>DISCUSSÕES</u> .....	35
7. <u>CONCLUSÕES</u> .....	42
8. <u>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</u> .....	43

## Lista de Abreviaturas

- AMBIC**- Bicarbonato de amônio  
**Bis acrilamida**- N, N' metileno-bis-acrilamida  
**CaCl<sub>2</sub>**- Cloreto de cálcio  
**CM**- carboximetil  
**DEAE**- Dietilaminoetil  
**EDTA**- Ácido etilenodiaminotetracético  
**HCl**- Ácido clóridico  
**NaOH**- Hidróxido de sódio  
**PAGE**- Eletroforese em gel de poliacrilamida  
**PB**- Peçonha bruta  
**PLA<sub>2</sub>**- Fosfolipase A<sub>2</sub>  
**SDS**- Dodecil sulfato de sódio  
**TEMED**- N,N,N',N' – tetrametiletilenodiamino  
**Tris**- Tris (hidroximetil) aminometano  
**UAC**- Unidade de atividade caseinolítica específica



## Resumo

As serpentes pertencentes ao gênero *Bothrops* são encontradas em todo o território nacional, sendo responsáveis pela maioria dos acidentes ofídicos notificados anualmente ao Ministério da Saúde. Os acidentes provocados por serpentes botrópicas caracterizam-se por efeitos locais e sistêmicos. A maioria das toxinas responsáveis por estes efeitos são enzimas que podem apresentar atividades proteolítica, hemorrágica, fosfolipásica A<sub>2</sub>, dentre outras. O presente trabalho teve como objetivo o fracionamento da peçonha bruta de *Bothrops alternatus* e delineamento das atividades proteolítica, hemorrágica e fosfolipásica A<sub>2</sub> das frações obtidas. A peçonha bruta de *B. alternatus* foi submetida a uma única etapa cromatográfica utilizando-se as seguintes resinas de troca iônica : 1° - CM Sephadex C-25 (50 mg de peçonha bruta-PB, tampão acetato de amônio, 0,05 M, pH 5,0); 2° -DEAE Sephadex A-25 (100 mg de PB, tampão bicarbonato de amônio (AMBIC), 0,05M, pH 7,8); e 3° -DEAE Sephacel (200 mg de PB, tampão AMBIC,0,05 M, pH7,8). O primeiro fracionamento resultou em apenas um pico principal, com uma recuperação protéica final de somente 14,61%. No segundo e terceiro fracionamentos foram obtidas 8 frações, designadas de D1 a D8 e A1 a A8, com recuperação protéica de 26,5% e 50,31%, respectivamente. A atividade proteolítica foi realizada, utilizando o fibrinogênio bovino e a caseína como substratos. Nos dois últimos fracionamentos todas as frações obtidas apresentaram atividade proteolítica sobre o fibrinogênio bovino, exceto A7 e A8. A atividade caseinolítica também foi encontrada na maioria das frações, exceto em D7, A7 e A8. A presença de toxinas hemorrágicas foi verificada, por meio da inoculação subcutânea das amostras, no dorso de camundongos machos.

Esta atividade foi evidenciada nas frações D4, D5, D7, A3, A4 e A7, onde as frações D5, D7 e A7 apresentaram halos hemorrágicos mais evidentes. A atividade PLA<sub>2</sub> foi determinada por titulação potenciométrica, utilizando como substrato emulsão aquosa de gema de ovo. A atividade PLA<sub>2</sub> foi encontrada apenas na PB, estando ausente em todas as frações isoladas. Não foi realizada nenhuma atividade para as frações obtidas a partir do fracionamento com a resina CM Sephadex C-25. Os resultados obtidos neste trabalho nos permitiram verificar que a resina DEAE Sephacel é mais eficiente para separar os componentes da PB de *B. alternatus*. Também foi evidenciado que a PB de *B. alternatus* é muito rica em enzimas proteolíticas. No entanto, os fatores responsáveis pela ausência da atividade fosfolipásica A<sub>2</sub> não foram determinados, sendo necessário novos estudos visando a identificação das fosfolipases A<sub>2</sub> ativas presentes na peçonha desta serpente.

## 1.Introdução

Os acidentes causados por animais peçonhentos constituem um problema de saúde pública, principalmente nas regiões tropicais e subtropicais do mundo. As serpentes peçonhentas existentes no Brasil pertencem aos gêneros *Bothrops*, *Crotalus*, *Lachesis* e *micrurus*, que são responsáveis por mais de 20.000 acidentes notificados anualmente ao Ministério da Saúde (RIBEIRO & TANUS, 1997). Embora raramente fatais, os casos de intoxicação por serpentes do gênero *Bothrops*, somam aproximadamente 90% dos acidentes ofídicos ocorridos no Brasil (ROSENFELD, 1971; RIBEIRO, 1990). Este gênero compreende aproximadamente vinte espécies, dentre as quais destaca-se a *Bothrops alternatus*, popularmente conhecida como urutu-cruzeiro. Esta serpente possui hábitos noturnos, é ágil, violenta e extremamente voraz.

A peçonha botrópica é uma mistura complexa de proteínas e peptídeos com ampla variedade de atividades biológicas. Estes, constituem aproximadamente 90-95% de seu peso seco (SCHMIDT *et al.*,1976). Também estão presentes íons



metálicos, carboidratos, nucleosídeos, aminas e em menor proporção os lipídeos e aminoácidos livres (RUSSEL, 1980; TU 1988 *apud* MARKLAND, 1998).

Os acidentes provocados por serpentes botrópicas caracterizam-se por efeitos locais e sistêmicos. Os efeitos sistêmicos mais comuns são a indução do estado de choque, principal causa de morte, distúrbios na coagulação sangüínea, alterações cardiovasculares (VITAL BRASIL, 1982; MEBS & OWNBY, 1990), hemorragias gastrointestinais, náuseas, vômitos e hematúria (RUSSEL, 1979).

Quanto aos efeitos locais destacam-se dor, edema, hemorragia local e necrose tecidual, que dependendo do local afetado, tempo decorrido entre o acidente e aplicação do soro e quantidade de peçonha injetada, podem levar à perda e amputação do membro afetado (OLIVEIRA, 1999).

O edema local é provavelmente causado pelo efeito direto das toxinas nos vasos sangüíneos, causando a liberação de mediadores endógenos como a histamina, cinina e prostaglandinas devido à ação da peçonha nos mastócitos, cininogênio e fosfolipídeos, respectivamente (GUTIÉRREZ, 1990).

A complexa lesão causada por peçonhas botrópicas se deve à somatória dos efeitos isolados de diferentes componentes, com ações biológicas distintas ou que atuem sinergisticamente. Os principais constituintes das peçonhas relacionados com os efeitos locais são as proteases, fosfolipases e miotoxinas. Portanto o desenvolvimento de técnicas bioquímicas visando a purificação e o isolamento desses componentes são imprescindíveis no esclarecimento dos efeitos e mecanismos de ação das peçonhas (HOMSI-BRANDEBURGO, 1987).

A toxicidade das peçonhas da família Viperidae, é atribuída em grande parte à presença de enzimas proteolíticas (LOBO DE ARAÚJO *et al*, 1998). Essas enzimas atuam numa grande variedade de substratos naturais, tais como:



hemoglobina, colágeno, gelatina, fibrinogênio, fibrina e glucagon (IWANAGA & SUZUKI, 1979).

As enzimas proteolíticas estão associadas à atividades biológicas específicas, como atividade hemorrágica, atividade coagulante e anticoagulante. Muitas dessas enzimas foram isoladas e caracterizadas como metaloproteinases (BJARNASON & FOX, 1988; KINI & EVANS, 1992), pois constituem uma família de enzimas proteolíticas dependentes de metal (HITE *et al* 1992; BODE *et al*, 1993). As enzimas proteolíticas podem ser classificadas em dois grupos, conforme a especificidade aos substratos: o primeiro grupo compreende as toxinas hemorrágicas que possuem alta especificidade ao substrato e são capazes de provocar hemorragia (MANDELBAUM *et al*, 1984; MORI *et al*, 1987). O segundo grupo é representado pelas toxinas não hemorrágicas, que têm ampla especificidade aos substratos e não são capazes de causar hemorragia (ASSAKURA *et al*, 1985; MORI *et al*, 1987).

As hemorragias locais e sistêmicas são comuns em acidentes botrópicos e resultam provavelmente da interação de vários fatores presentes na peçonha (MANDELBAUM, 1990). O principal fator responsável pela hemorragia são as toxinas hemorrágicas (hemorraginas), cujo mecanismo de ação consiste na degradação das proteínas da matriz extracelular e pelo efeito citotóxico direto sobre as células endoteliais ; sua ação ocorre quase que exclusivamente na membrana basal dos vasos capilares (KAMIGUTI *et al*, 1996).

São sugeridos dois mecanismos, através dos quais as hemácias e os componentes do sangue podem extravasar pelos vasos danificados pelas toxinas hemorrágicas: um deles é por meio das junções entre as células endoteliais, e o outro através dos espaços vazios deixados pelas células danificadas (LOMONTE *et al*, 1994).

Algumas vezes duas metaloproteases isoladas da mesma peçonha podem hidrolisar os mesmos substratos, porém apenas uma é capaz de causar hemorragia. Como exemplo podemos citar o fator hemorrágico HF2 e a bothropasina isoladas da peçonha de *Bothrops jararaca* (ASSAKURA *et al*, 1986). Ambos hidrolisam a caseína, fibrinogênio e a cadeia B da insulina, no entanto o fator HF2 tem ação hemorrágica cerca de 50 vezes maior que a bothropasina (MANDELBAUM, 1990).

Segundo KAMIGUTI *et al* (1996), a diferença entre proteínas com atividade hemorrágica e não hemorrágica está localizada na região entre os aminoácidos 51 e 130 das moléculas. Entretanto, as posições específicas dos aminoácidos determinantes ou responsáveis pela ligação à membrana basal, que induzem a hemorragia, ainda não foram determinadas.

O sistema hemostático humano é baseado em complexas interações envolvendo as proteínas do sangue, plaquetas, células endoteliais e estruturas subendoteliais. As peçonhas de serpentes possuem inúmeros componentes que interferem na hemostasia, provocando diversas alterações. De modo geral, elas podem interferir na cascata de coagulação sangüínea por meio de diversos mecanismos, tais como: a ação sobre o fibrinogênio (enzimas "thrombin-like"), ativação do fator V, fator X, protrombina, por ação plaquetária e por ter atividade semelhante à tromboplastina (MARKLAND, 1998).

Um grupo terapeuticamente importante são as enzimas "thrombin-like", que possuem ação direta sobre o fibrinogênio convertendo-o em fibrina. Este é o evento central da coagulação sangüínea, e é normalmente desencadeado pela trombina. O fibrinogênio é uma glicoproteína plasmática solúvel, formada por três pares de cadeias não idênticas A- $\alpha$ , B- $\beta$  e  $\gamma$ , com peso molecular de 63.000, 56.000 e 47.000, respectivamente (MARKLAND, 1998).



A conversão do fibrinogênio em coágulo de fibrina pode ser dividida em três etapas: a primeira etapa consiste na proteólise do fibrinogênio, que ocorre por meio da hidrólise das cadeias A- $\alpha$  e B- $\beta$ , resultando na liberação de pequenos fragmentos denominados fibrinopeptídeos A e B, respectivamente. Em seguida ocorre a polimerização dos monômeros liberados pela trombina, possivelmente em consequência da interação eletrostática entre os grupos que foram expostos pela ação enzimática. Forma-se então o coágulo "frouxo" de fibrina, pois ainda não existe ligação cruzada entre esses monômeros (WITE *et al*, 1976). O coágulo "denso" de fibrina é formado por ação do fator XIIIa, que promove a ligação cruzada entre as cadeias laterais de lisina e glutaminil, formando um polímero de fibrina insolúvel. A ativação deste fator se dá por meio da ação da trombina sobre o fator XIII (proenzima) convertendo-o em fator XIII ativo (SEERGERS & OUYANG, 1979 *apud* OLIVEIRA, 1997).

Entretanto, a maioria das enzimas "thrombin -like" não são capazes de ativar o fator XIII, desta maneira há a formação somente do coágulo "frouxo", que é rapidamente removido da circulação, tanto pela fibrinólise, como pela via do sistema retículo endotelial (MAHIR *et al*, 1987). Portanto, as enzimas "thrombin -like" possuem efeito anticoagulante "in vivo" e coagulante "in vitro". Dessa forma, algumas dessas enzimas têm sido usadas clinicamente na prevenção e no tratamento de desordens trombóticas e alguns distúrbios da coagulação sangüínea (BELL, 1988 *apud* OLIVEIRA, 1997).

Várias enzimas "thrombin-like" já foram isoladas e caracterizadas da peçonha de serpentes. Um exemplo é a batroxobina, isolada de *Bothrops atrox* (STOCKER & BARLOW, 1976; STOCKER & MEIER, 1988 *apud* MARKLAND, 1998), "in vivo" esta enzima possui ação desfibrinogenante,

consumindo o fibrinogênio do sangue e "in vitro" é procoagulante. A batroxobina, difere da trombina, pois remove somente o fibrinopeptídeo A, não ativa o fator XIII e não promove a agregação plaquetária (MARKLAND, 1998). Esta enzima tem sido muito usada na prevenção e tratamento de desordens trombóticas, infarto do miocárdio, embolia pulmonar, angina peitoral, e glomerulonefrite (BELL *et al*, 1988; STOCKER *et al*, 1980; FURUKAWA & ISHIMARU, 1990; *apud* MARKLAND, 1998).

Por outro lado existem enzimas cujo mecanismo de ação consiste na ação direta sobre o fibrinogênio ou fibrina, levando à incoagulabilidade sangüínea, essas enzimas são denominadas fibrinogenolíticas e/ou fibrinolíticas, respectivamente.

As enzimas fibrinogenolíticas são classificadas conforme a especificidade de hidrólise das cadeias do fibrinogênio (MARKLAND *et al*, 1991 *apud* MARKLAND, 1998). A primeira classe de fibrinogenases são aquelas com especificidade de hidrólise das cadeias A- $\alpha$  do fibrinogênio. Elas são metaloproteases contendo zinco, com peso molecular entre 20.000 e 26.000. Essas enzimas apresentam pontes dissulfetos que são importantes para a sua estrutura e função. Várias fibrinogenases A- $\alpha$  já foram isoladas de diferentes peçonhas, tais como: *Bothrops moojeni* (ASSAKURA *et al*, 1985; OLIVEIRA *et al*, 1999; SERRANO *et al*, 1993), *Crotalus atrox* (PANDYA & BUDZYNSKI, 1984).

A segunda classe de fibrinogenases são as que possuem especificidade pela cadeia B- $\beta$  do fibrinogênio. Essas enzimas são serino proteases, com peso molecular entre 23.000 a 31.000 e são mais estáveis ao calor que as fibrinogenases cadeia A- $\alpha$  (MARSHALL, 1983). Como exemplos podemos citar as fibrinogenases isoladas da peçonha de *Crotalus atrox* (SAPRU *et al*, 1983 ; PANDYA & BUDZYNSKI *et al*, 1984).



A terceira classe de fibrinogenases são aquelas com especificidade pela cadeia  $\gamma$  do fibrinogênio. Este tipo de fibrinogenase é bastante raro, porém já foi isolada por NIKAI *et al.*, (1984) da peçonha de *Crotalus atrox* (toxina hemorrágica).

A maioria das enzimas fibrinogenolíticas são metaloproteinases, com especificidade pela cadeia A- $\alpha$ , muitas delas são também fibrinolíticas. Já as serinoproteinases clivam preferencialmente a cadeia B- $\beta$ , e a atividade fibrinolítica é rara. Há grande interesse em enzimas fibrinogenolíticas, pois estas, assim com as "thrombin-likes" podem ser usadas no tratamento de várias desordens trombóticas e oclusão arterial (MARKLAND, 1998).

Um componente sempre presente nas diferentes peçonhas de serpentes é a enzima termoestável fosfolipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>). As PLA<sub>2</sub> são enzimas amplamente distribuídas em várias espécies do reino animal e têm sido tradicionalmente classificadas em formas intra e extracelular.

Em geral a forma intracelular das PLA<sub>2</sub> não apresenta toxicidade e está envolvida no metabolismo de fosfolipídeos, transdução de sinais e em várias outras funções celulares vitais (ARNI & WARD, 1996).

As PLA<sub>2</sub> extracelulares são abundantes nas secreções pancreáticas de mamíferos e compõem a peçonha de serpentes, abelhas, lagartos e escorpiões (DANIELLE *et al.*, 1997).

Baseando-se em características estruturais, as PLA<sub>2</sub> extracelulares podem ser divididas em três classes (RENETSEDER *et al.*, 1984): I, II e III. Estas enzimas possuem baixo peso molecular (entre 12.000 e 15.000), com 119 a 143 aminoácidos e sete pontes dissulfetos intracadeia (PAN *et al.*, 1994). A classe I é composta por enzimas isoladas de secreções pancreáticas de mamíferos e de serpentes da família Elapidae e Hydrophidae. A classe II inclui as PLA<sub>2</sub> presentes nas peçonhas das

serpentes da família Viperidae. A classe III é representada por enzimas isoladas principalmente da peçonha de abelhas e lagartos (RENETSEDER *et al*, 1984).

Uma classe adicional de PLA<sub>2</sub> extracelulares foi proposta por DENNIS (1994), estas enzimas possuem alto peso molecular (85.000) e são encontradas em plaquetas humanas e em rim de ratos.

As PLA<sub>2</sub> são responsáveis pela hidrólise específica da ligação 2-acil-éster dos fosfolipídeos, liberando ácidos graxos e lisofosfatídeos. Consequentemente, ocorre a liberação do ácido araquidônico, precursor dos eicosanóides (prostaglandinas, tromboxanos e leucotrienos), dando início a uma série de reações inflamatórias (KINI & EVANS, 1989).

Nas peçonhas de serpentes, as PLA<sub>2</sub>, além de sua função catalítica primária, são responsáveis por diversos efeitos biológicos como miotoxicidade, citotoxicidade, neurotoxicidade, inibição da agregação plaquetária, convulsão, hipotensão, hemólise indireta, anticoagulação, hemorragia e formação de edema (VALIENTE *et al*, 1992).

A ação miotóxica das peçonhas de serpentes pode estar relacionada com as fosfolipases do tipo A<sub>2</sub>. A ação direta destas PLA<sub>2</sub> miotóxicas na membrana muscular agravam o quadro clínico provocado pelo envenenamento ofídico, resultando em mionecrose aguda (SOARES *et al*, 1999), levando à perda tecidual, invalidez e até amputação do membro afetado (GUTIÉRREZ & LOMONTE, 1995).

O mecanismo de ação pelo qual as fosfolipases A<sub>2</sub> causam danos musculares ainda não é muito claro. GUTIÉRREZ & LOMONTE (1995) propuseram um modelo para o mecanismo de ação das miotoxinas: primeiramente estas se ligariam à membrana plasmática de células musculares, por meio de um sítio ainda não identificado (proteína, receptor ou fosfolipídeos), levando a desorganização dos componentes fosfolipídicos, permitindo a saída de moléculas intracelulares como a



creatina-quinase. Esse desarranjo dos componentes fosfolípidicos pode causar severas alterações na integridade estrutural e funcional da membrana plasmática, com subsequente influxo de íons cálcio, causando a contração de sarcômeros (HARRIS, 1984) e ativação de proteases dependentes de cálcio e fosfolipases  $A_2$  endógenas.

A literatura descreve poucos trabalhos referentes à peçonha de *Bothrops alternatus*, no entanto, os mesmos revelam que esta possui características e particularidades que merecem ser exploradas.

Dentre os trabalhos referentes à peçonha de *B. alternatus*, cita-se:

- NISENBOM *et al* ( 1986) isolaram uma fosfolipase  $A_2$  com peso molecular em torno de 15.000 e com atividade letal cerca de 46 vezes maior que a peçonha bruta;
- SMOLKA *et al* (1998) purificaram uma "thrombin-like", denominada balterobina, com peso molecular de 30.000;
- CASTRO *et al* (1998) isolaram um inibidor de trombina (bothroalternina), pertencente à família das lectinas , com peso molecular de 27.000, que possui cerca de 95% de homologia com a bothrojaracina; inibidor de trombina isolada da peçonha de *B. jararaca* (ZINGALI *et al* 1993, *apud* CASTRO *et al*, 1998).
- PÉREZ *et al* (1999) estudaram a atividade proteolítica, mionecrótica e hemorrágica causadas por serpentes jovens, mostrando que essas atividades são mais intensas quando comparadas à peçonha de serpentes adultas;
- SOUZA *et al* (2000) descreveram uma metaloprotease com peso molecular de 55.000(alternagina), capaz de inibir a ligação do colágeno à  $\alpha_2\beta_1$  integrina. A  $\alpha_2\beta_1$  integrina é um receptor para o colágeno e desempenha papel essencial na adesão de células normais e tumorais à matriz extracelular.

Atualmente a soroterapia é o único meio utilizado no tratamento da intoxicação por serpentes peçonhentas, no entanto, este método é incapaz de neutralizar os efeitos locais, agindo somente nos efeitos sistêmicos provocados pela peçonha. Devido a este fato, estudos visando o desenvolvimento de estratégias terapêuticas mais eficientes têm se intensificado nas últimas décadas. Além disso, enzimas com atividade proteolítica estão sendo muito estudadas, pois podem desfazer os coágulos de fibrina conseqüente a disfunção do sistema hemostático (THWIN *et al*, 1998).

Portanto, estudos visando a identificação dos componentes ativos da peçonha de *Bothrops alternatus* poderão contribuir para a compreensão de seus efeitos deletérios e possíveis funções terapêuticas.



## 2. Objetivos

Este trabalho teve como objetivos:

- Fracionar a peçonha bruta da serpente *Bothrops alternatus* por meio de cromatografia de troca iônica;
- Testar a atividade proteolítica das frações isoladas, utilizando o fibrinogênio bovino e a caseína como substratos;
- Determinar as atividades hemorrágica e fosfolipásica A<sub>2</sub> das frações obtidas;

### 3. Material

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

#### 3.1) Peçonha bruta:

A peçonha bruta de *Bothrops alternatus* foi cedida pela Prof<sup>a</sup>. Msc. Vera Lúcia de Campos Brites, do Instituto de Biologia da UFU e pelo Biólogo Luiz Henrique Anzaloni Pedrosa da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. A peçonha bruta foi dessecada e depois armazenada a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

#### 2.2) Cromatografia, eletroforese e dosagem protéica:

- CM Sephadex C-25 (Amersham Pharmacia)
- DEAE Sephadex A-25 (Amersham Pharmacia)
- DEAE Sephacel (Amersham Pharmacia)

- Acrilamida, Bis-acrilamida, TEMED, SDS , Comassie Brilliant Blue R-250, EDTA, Soroalbumina bovina, Azul de bromofenol,  $\beta$ -mercaptoetanol, Persulfato de amônio, Padrão de Peso Molecular Dalton Mark V II-L ( Sigma Chem. Co ).

### **2.3) Atividade proteolítica e fosfolipásica A<sub>2</sub> :**

- Fibrinogênio bovino ( Sigma Chem. Co )
- Caseína pura (Lafan, Química Fina Ltda)
- Desoxicolato de Sódio ( Sigma Chem. Co )

### **2.4) Atividade Hemorrágica:**

Os camundongos utilizados foram gentilmente cedidos pela Pentapharm do Brasil (Uberlândia, MG).

Os demais reagentes utilizados tais como: HCl, NaOH, CaCl<sub>2</sub> , álcool etílico e metílico foram utilizados em grau analítico.



## 4. Métodos

### 4.1) Fracionamento da peçonha bruta de *Bothrops alternatus*

#### 4.1.1) Fracionamento da peçonha bruta de *B. alternatus* em gel de CM Sephadex C-25

Cerca de 50 mg da peçonha bruta de *B. alternatus* foram dissolvidas em 0,5 ml de tampão acetato de amônio 0,05M pH 5,0. Em seguida a mistura foi centrifugada a 13.000 rpm por 10 minutos em temperatura ambiente. O sobrenadante foi aplicado a uma coluna de troca iônica em gel de CM Sephadex C-25 (0,7 x 64 cm), equilibrada com o mesmo tampão. A amostra foi eluída em temperatura ambiente pelo estabelecimento de um gradiente convexo de concentração usando o tampão acetato de amônio 0,05 a 1 M em pH 5,0; frações de 3,0 ml foram coletadas num fluxo de 20 ml por hora com auxílio de um coletor GILSON. A absorvância de cada fração coletada foi lida em 280 nm em um espectrofotômetro SPEKOL (Zeiss).

#### **4.1.2) Fracionamento da peçonha bruta de *Bothrops alternatus* em DEAE Sephadex A-25**

Aproximadamente 100 mg da peçonha bruta de *B. alternatus* foram preparadas e aplicadas a uma coluna de troca iônica em gel de DEAE Sephadex A-25 (0,7 x 64 cm), nas mesmas condições do item 4.1.1, exceto pela substituição do tampão acetato de amônio pH 5,0 pelo tampão bicarbonato de amônio pH 7,8.

#### **4.1.3) Fracionamento da peçonha bruta de *Bothrops alternatus* em gel de DEAE Sephacel**

Este fracionamento foi realizado em uma coluna de troca iônica em gel de DEAE Sephacel (1,5 x 15 cm), exatamente nas mesmas condições descritas para o item anterior, salvo pela utilização de 200 mg de peçonha bruta.

#### **4.2) Dosagem Protéica**

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), utilizando-se a soroalbumina bovina para estimar a reta padrão. As amostras de proteínas foram completadas para o volume de 1,0 ml com água, aos quais foram acrescentados 500 µl dos reagentes R1 ou R2 (previamente preparados em nosso laboratório); a seguir foi feita a leitura em espectrofotômetro SPEKOL UV VIS da Zeiss a 310nm, contra um branco sem proteína. O reagente R1 é composto por 0,21% CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O dissolvido em NaOH 30,4% e o R2 é formado por uma solução de NaOH a 30%.



### **4.3. Atividades Biológicas e Enzimáticas**

#### **4.3.1) Teste de degradação do fibrinogênio bovino**

A atividade proteolítica foi testada sobre o fibrinogênio bovino segundo OLIVEIRA et al (1999). Cerca de 5  $\mu$ g de proteínas foram adicionados em 50  $\mu$ l da solução de fibrinogênio bovino (1,5mg/ml salina), logo após as amostras foram incubadas por 120 minutos a 37°C. A reação enzimática foi interrompida com a adição de 25 $\mu$ l de STOP (TRIS HCl 0,06 M pH 6,8, glicerol a 10% (v/v),  $\beta$ -mercaptoetanol a 10% (v/v), SDS a 2% e azul de bromofenol 0,05%). Em seguida, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida a 14% com agentes desnaturantes.

#### **4.3.2) Atividade proteolítica sobre a caseína**

Cerca de 50  $\mu$ l da amostra contendo 20  $\mu$ g de proteína foram incubadas a 37°C, por 30 minutos com 950  $\mu$ l de uma solução de caseína (1mg/ ml de tampão bicarbonato de amônio 0,1M, pH 7,8). A reação foi interrompida pela adição de 50  $\mu$ l de ácido tricloro acético a 25%, em seguidas as amostras foram centrifugadas a 14.000 rpm, por 15 minutos a 4 °C e as absorbâncias foram lidas a 280 nm. Uma unidade de atividade caseinolítica corresponde a um acréscimo de 0,001 em absorbância 280 nm nas condições de reação acima definidas.



### 4.3.3) Atividade Hemorrágica

A atividade hemorrágica foi realizada segundo NIKAI (1984). Cerca de 50  $\mu$ g de proteínas foram injetadas subcutaneamente no dorso de camundongos machos. Após três horas, os animais foram sacrificados, as peles removidas para observação dos halos hemorrágicos na face interna da pele.

### 4.3.4) Atividade fosfolipásica

A atividade fosfolipásica  $A_2$  foi determinada por titulação potenciométrica segundo o método descrito por DE HAAS *et al.* (1968). Como substrato foi utilizada uma emulsão aquosa de gema de ovo (uma gema em 50 ml de água desionizada) em presença de desoxicolato de sódio e de  $CaCl_2$ , como segue: 15 ml da emulsão aquosa da gema de ovo, 1 ml de  $CaCl_2$  0,6 M e 10 ml da solução de desoxicolato de sódio 0,03 M; o volume foi completado para 100 ml com água desionizada. 10 ml dessa solução foram utilizados para cada ensaio enzimático. Os ácidos graxos liberados enzimicamente foram titulados com uma solução padrão de NaOH 0,1204 M em pH 8,0 e temperatura ambiente (28°C). A atividade fosfolipásica específica foi realizada utilizando-se 10  $\mu$ g da amostra, e calculada pela quantidade de microequivalentes de base consumida por minuto, por mg de proteína.

## 4.5) Eletroforese em gel de poliacrilamida e 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 agentes desnaturantes na presença de  $\beta$ -mercaptoetanol. Na preparação dos géis a 14%, foram utilizadas as seguintes soluções:

SOLUÇÕES ESTOQUES	VOLUME ( $\mu$ l)	
	GEL DE SEPARAÇÃO	GEL DE EMPILHAMENTO
Tris-HCl 2M pH 8,8	1170	-
Tris-HCl 2M pH 6,8	-	167
EDTA 200 mM	63	27
Acrilamida:bis (30 : 0,8)	2920	435
Água desionizada	2015	1990
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% (p/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 desionizada, 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 à 100°C por 5 minutos e aplicadas ao gel de poliacrilamida.

Foi utilizado o seguinte marcador de peso molecular (Dalton Mark VII-L):  $\alpha$ -lactoalbumina (PM 14.400), inibidor de tripsina (PM 20.100), tripsinogênio de pâncreas (PM 24.000), anidrase carbônica (PM 29.000), gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase (PM 36.000), ovoalbumina (PM 45.000) e soroalbumina bovina (PM 66.000).

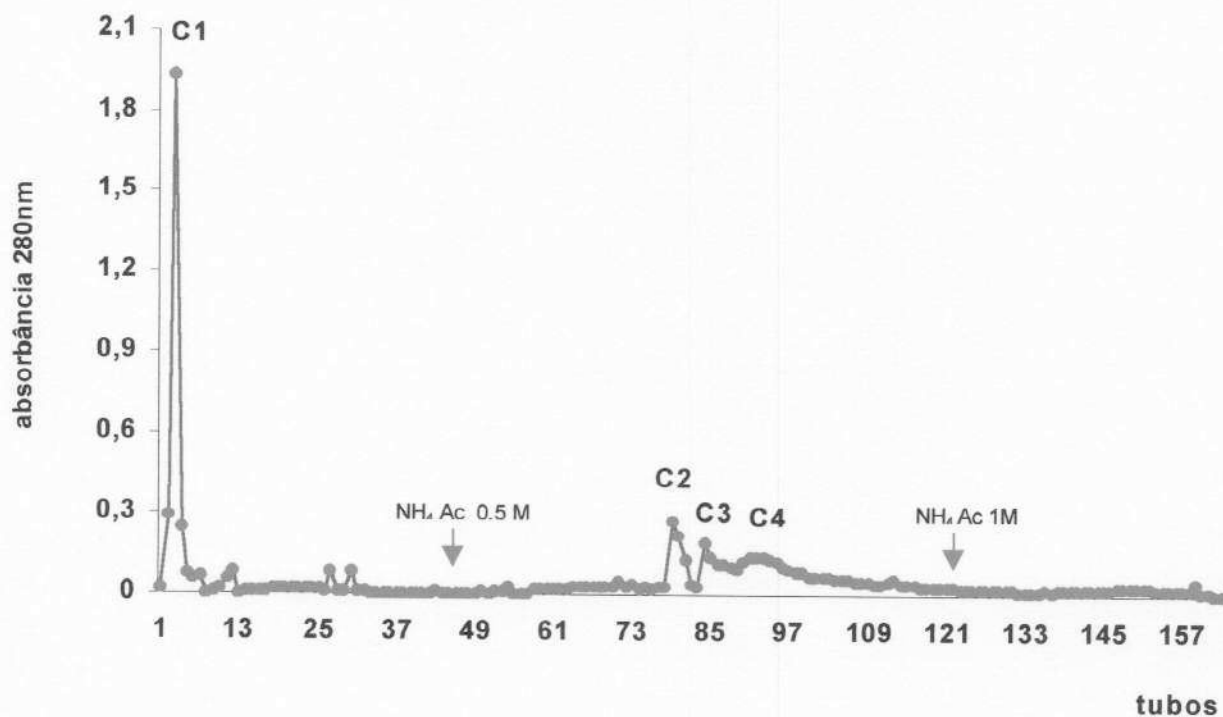
## 5. Resultados

### 5.1) Fracionamento da peçonha bruta de *Bothrops alternatus*

#### 5.1.1) Fracionamento da peçonha bruta de *Bothrops alternatus* em gel de CM Sephadex C-25

Inicialmente, o fracionamento da peçonha bruta foi realizado em gel de CM Sephadex C-25 em um gradiente convexo de concentração em tampão acetato de amônio 0,05 a 1 M em pH 5,0. O perfil cromatográfico está mostrado na figura 01. Neste fracionamento a peçonha bruta foi resolvida em 4 frações principais, denominadas de C1 a C4. A recuperação protéica foi aproximadamente 14,61% ( tabela 01).





**Figura 01:** Cromatografia de 50 mg da peçonha bruta de *B. alternatus* em gel de CM Sephadex C-25 (0,7 x 64 cm); equilibrada com tampão acetato de amônio 0,05M, pH 5,0. As amostras foram eluídas num gradiente convexo de concentração do mesmo tampão ( 0,05 a 1,0 M ), num fluxo de 20 ml/hora à temperatura ambiente. Frações de 3,0 ml foram coletados.

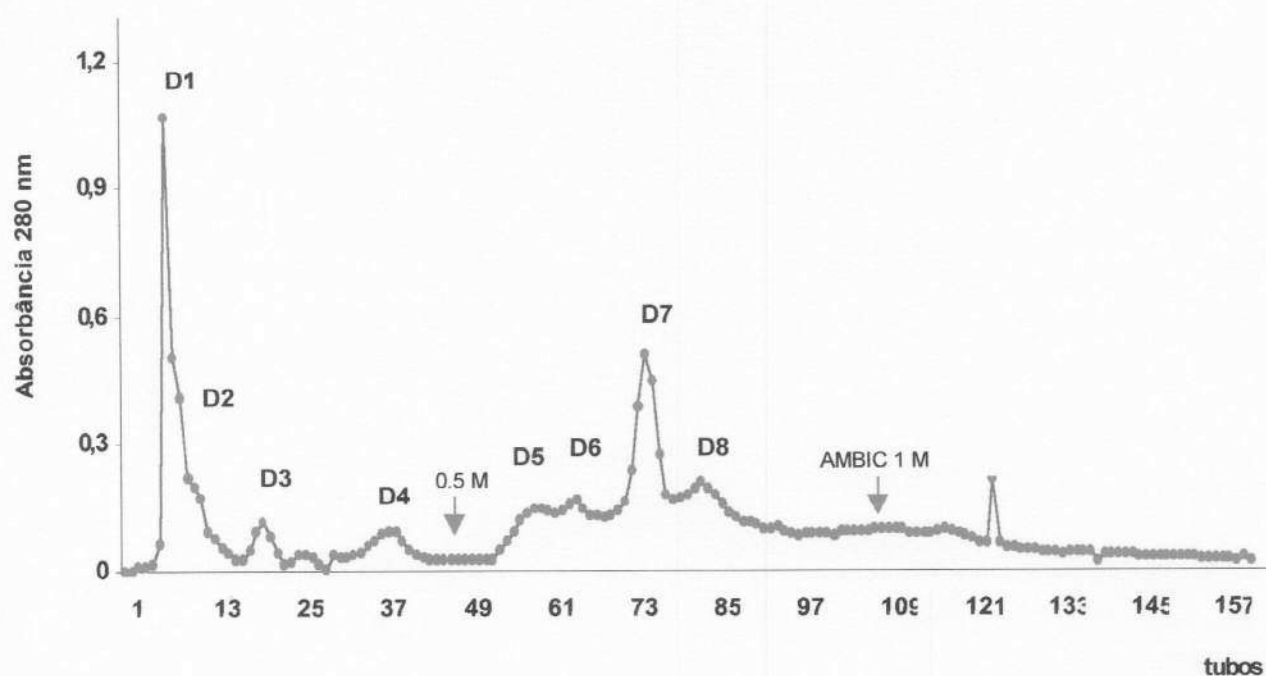
**Pontos de corte:** C1 (tubos 02 ao 04), C2 (81 ao 83), C3 (86 ao 88), C4 (93 ao 98).

**Tabela 01:** Recuperação protéica por absorvância à 280 nm das frações obtidas do fracionamento em CM Sephadex C-25

<b>Amostras</b>	<b>A<sub>280 nm</sub></b>	<b>Recuperação %</b>
PB	41,70	100,00
C1	5,49	13,17
C2	0,15	0,36
C3	0,12	0,29
C4	0,30	0,72
Total	6,10	14,61

### **5.1.2) Fracionamento da peçonha bruta de *Bothrops alternatus* em gel de DEAE Sephadex A-25**

O segundo fracionamento da peçonha bruta foi realizado em gel de DEAE Sephadex A-25 em um gradiente de concentração em tampão bicarbonato de amônio (0,05-1M), em pH 7,8, conforme descrito no item 4.1.2. O perfil cromatográfico está mostrado na figura 02. Neste fracionamento a peçonha bruta foi resolvida em 8 frações, designadas de D1 a D8. Todas as frações apresentaram atividade proteolítica sobre o fibrinogênio bovino. A atividade caseinolítica também esteve presente em todas as frações, exceto em D7. A atividade hemorrágica ficou restrita às frações D3, D4 e D7. Nenhuma das frações isoladas apresentou atividade fosfolipásica A<sub>2</sub>, sendo esta encontrada somente na peçonha bruta. Na tabela 02 estão expressos os valores de rendimento protéico obtidos por absorvância à 280nm.



**Figura 02:** Cromatografia de 100 mg da peçonha bruta de *B. alternatus* em gel de DEAE Sephadex A-25 (0,7 x 64 cm) , equilibrada com tampão bicarbonato de amônio 0,05 M, pH 7,8. A coluna foi eluída em um gradiente convexo de concentração usando tampão bicarbonato de amônio (0,05 a 1M), num fluxo de 20 ml/hora em temperatura ambiente. Frações de 3,0 ml foram coletadas.

**Pontos de corte:** D1 (tubos 06 ao 09); D2 (10 ao 15); D3(19 ao 23); D4(35 ao 42); D5(56 ao 63); D6(64 ao 69); D7(74 ao 78); D8(82 ao 88).

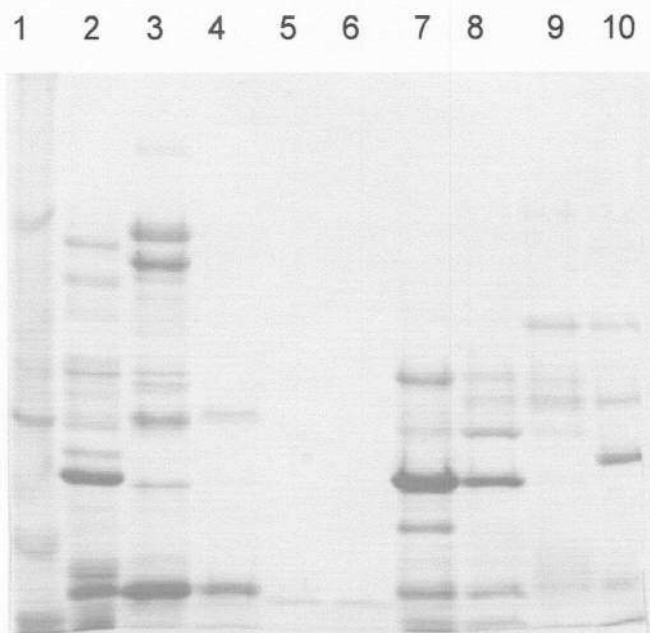


**Tabela 02:** Recuperação protéica por absorvância à 280 nm das frações obtidas do fracionamento em DEAE Sephadex A-25

<b>Amostras</b>	<b>A<sub>280 nm</sub></b>	<b>Recuperação %</b>
PB	79,62	100,00
D1	3,5	4,4
D2	1,8	2,3
D3	1,1	1,4
D4	2,2	2,8
D5	2,5	3,1
D6	2,2	2,8
D7	4,5	5,7
D8	3,2	4,0
Total	21,0	26,5

### 5.1.2.1) Eletroforese em gel de poliacrilamida com agentes desnaturantes

A figura 03 mostra o resultado da eletroforese em gel de poliacrilamida a 14%, em condições desnaturantes, das frações resultantes do fracionamento da peçonha bruta de *B. alternatus*, em gel de DEAE Sephadex A-25. O perfil eletroforético mostra frações com inúmeras bandas, como por exemplo a fração D1 que possui grande parte das bandas existentes na peçonha bruta. No entanto, as frações D3 e D4 apresentaram somente uma banda principal.

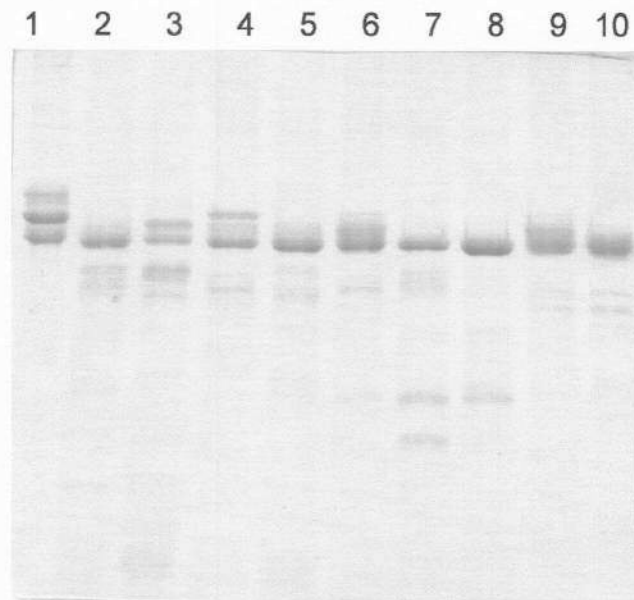


**Figura 03:** Eletroforese em gel de poliacrilamida com agentes desnaturantes a 14% da peçonha bruta de *B. alternatus* e das frações obtidas no fracionamento com a resina DEAE Sephadex A-25. **Linha 01:** Padrão de peso molecular: Dalton Mark VII-L: soroalbumina bovina (66.000), ovoalbumina (45.000), gliceraldéido-3fosfato-desidrogenase (36.000), anidrase carbônica (29.000), tripsinogênio (24.000), inibidor de tripsina (20.100),  $\alpha$ -lactoalbumina (14.400); **linha 02:** peçonha bruta de *B. alternatus*; **linhas 03 a 10:** frações D1 a D8, respectivamente.

## 5.1.2.2) Atividades Biológicas e Enzimáticas das frações obtidas do fracionamento em gel de DEAE Sephadex A-25

### 5.1.2.2.1) Atividade Proteolítica sobre o fibrinogênio bovino

A figura 04 mostra o resultado da teste de degradação do fibrinogênio bovino pela peçonha bruta de *B. alternatus* e as frações obtidas do fracionamento em DEAE Sephadex A-25. A peçonha bruta hidrolisou as cadeias  $\alpha$  e  $\beta$  do fibrinogênio bovino. Todas as frações obtidas apresentaram atividade sobre o fibrinogênio bovino. As frações D2, D3, D5, D6 e D8 hidrolisaram as cadeias  $\alpha$  e  $\beta$ , mostrando a mesma especificidade de hidrólise da peçonha bruta. Já as outras frações (D1, D4 e D7) degradaram preferencialmente a cadeia  $\alpha$  do fibrinogênio.



**Figura 04:** Eletroforese em gel de poliacrilamida com agentes desnaturantes a 14% dos produtos de hidrólise do fibrinogênio bovino, causada pela peçonha bruta de *B. alternatus* (PB) e pelas frações isoladas por troca iônica em DEAE Sephadex A-25. **Linha 01**-fibrinogênio bovino controle incubado sem proteína, **linhas 02 a 10:** fibrinogênio incubado com PB e as frações D1 a D8, respectivamente.



### 5.1.2.2.2) Atividade Proteolítica sobre a Caseína

A atividade caseinolítica foi realizada de acordo com o item 2.3.2. De acordo com os resultados mostrados na tabela 03, observamos que as frações D1, D2 e D5 apresentaram elevada atividade caseinolítica, sendo que a D5 é aproximadamente 4,5 vezes mais potente que a PB. As frações D3, D4 e D8 apresentaram atividade caseinolítica residual, enquanto que em D7 não foi encontrada tal atividade.

**Tabela 03** : Atividade Caseinolítica da peçonha bruta e das frações isoladas em gel de DEAE Sephadex A-25

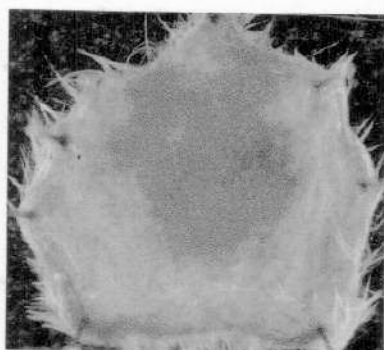
<b>Amostras</b>	<b>Atividade Caseinolítica (Expressa em UAC)*</b>
PB	136,1
D1	443,0
D2	580,6
D3	42,6
D4	53,8
D5	617,6
D6	266,5
D7	8,8
D8	25,1

PB: peçonha bruta

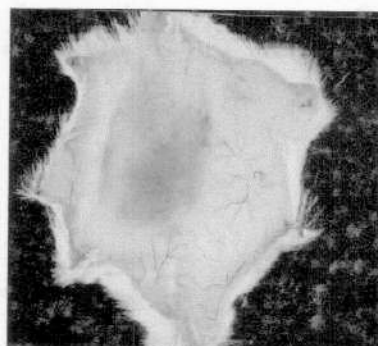
\* Unidade de Atividade Caseinolítica Específica: uma unidade de atividade caseinolítica, corresponde ao cada acréscimo de 0,001 na absorvância à 280nm nas condições estabelecidas para a reação.

### 5.1.2.2.3) Atividade Hemorrágica

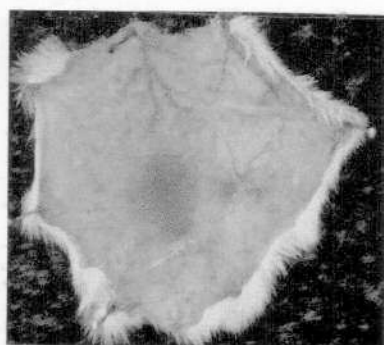
A figura 04 mostra a lesão causada, quando doses de 50  $\mu$ g de proteína da peçonha bruta e das frações isoladas (D1 a D8) foram injetadas subcutaneamente no dorso de camundongos conforme descrito no item 2.3.3. A presença do halo hemorrágico na face interna da pele é indicativo de atividade. Somente as frações D4, D5 e D7 apresentaram halo hemorrágico, evidenciando a presença de hemorraginas nestas frações. A atividade hemorrágica foi mais evidente nas frações D5 e D7, pois causaram halo hemorrágico maior e mais intenso.



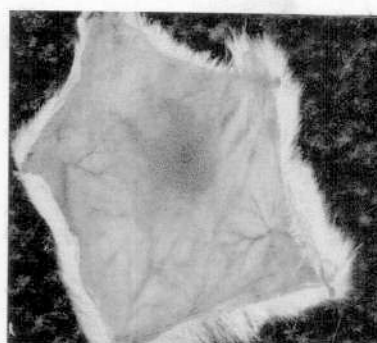
PB



D4



D5



D7

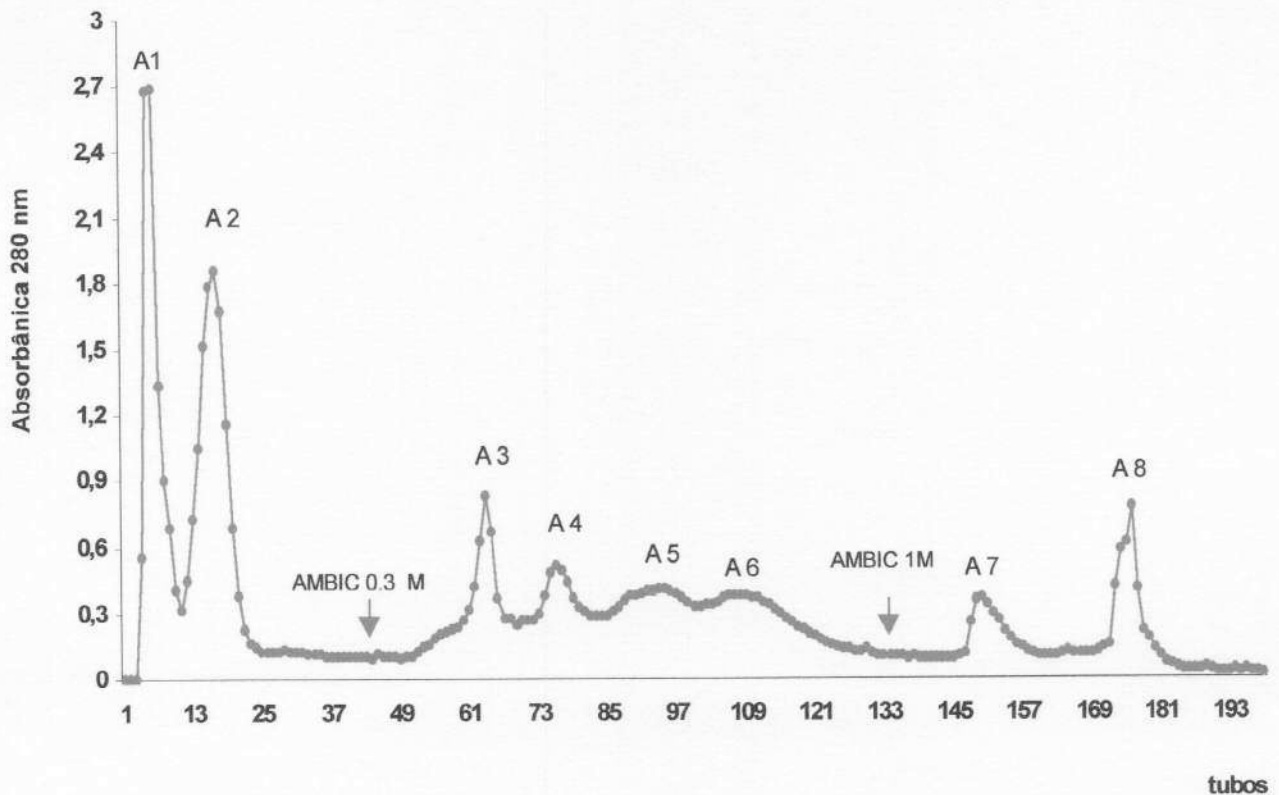
**Figura 05** : Atividade hemorrágica da peçonha bruta (PB) e das frações obtidas no fracionamento com a resina DEAE Sephadex A-25. Amostras contendo 50mg de proteínas foram injetadas subcutaneamente no dorso de camundongos machos. Após três horas os camundongos foram sacrificados para a observação dos halos hemorrágicos na face interna da pele.

### 5.1.3) Fracionamento da peçonha bruta de *Bothrops alternatus* em gel de DEAE Sephacel

A peçonha bruta de *B. alternatus* também foi submetida a uma cromatografia de troca iônica em gel de DEAE Sephacel. O perfil cromatográfico está mostrado na figura 06. A peçonha total foi resolvida em 8 frações distintas (A1 a A8). A atividade proteolítica realizada sobre o fibrinogênio bovino e sobre a caseína foi encontrada em todas as frações, exceto nas frações A7 e A8. A atividade hemorrágica ficou restrita às frações A3, A4 e A7, sendo a última a fração mais potente. Quanto à atividade fosfolipásica A<sub>2</sub>, esta se restringiu somente à peçonha bruta, estando ausente em todas as frações isoladas.

A recuperação protéica estimada por absorvância à 280 nm foi de aproximadamente 50,38% ( tabela 04).





**Figura 06:** Cromatografia de 200 mg da peçonha bruta de *B. alternatus* em gel de DEAE Sephacel (1,5 x 15 cm), equilibrada com tampão bicarbonato de amônio 0,05 M, pH 7,8. A coluna foi eluída em um gradiente convexo de concentração usando tampão bicarbonato de amônio (0,05 a 1M), num fluxo de 20 ml/hora em temperatura ambiente. Frações de 3,0 ml foram coletadas.

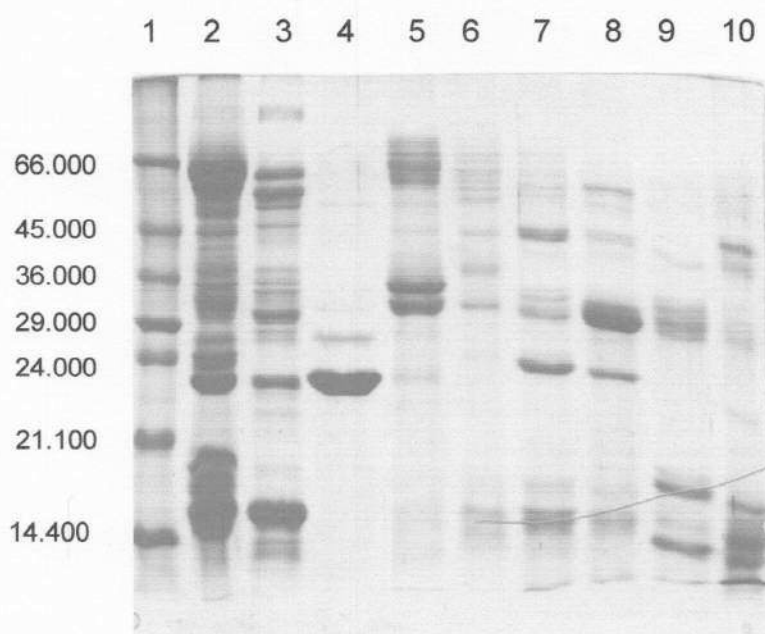
**Pontos de corte:** A1(tubo 04 ao 09); A2 (14 ao 21); A3(61 ao 68); A4(73 ao 80); A5(88 ao 98); A6(103 ao 113); A7(148 ao 156); A8 (173 ao 177).

**Tabela 04:** Recuperação protéica por absorvância a 280 nm das frações obtidas do fracionamento em DEAE Sephacel.

<b>Amostras</b>	<b>A<sub>280 nm</sub></b>	<b>Recuperação %</b>
PB	193,00	100,00
A1	21,14	10,96
A2	24,87	12,89
A3	10,70	5,55
A4	7,07	3,67
A5	7,75	4,02
A6	6,43	3,34
A7	7,71	34,00
A8	11,47	5,95
Total	97,25	50,38

### 5.1.3.1) Eletroforese em gel de poliacrilamida

A figura 07 mostra o resultado da eletroforese em gel de poliacrilamida a 14% em condições desnaturantes, da peçonha bruta e das frações isoladas a partir do fracionamento em gel de DEAE Sephacel. Nesta mesma figura podemos observar que a fração A2 (linha 04) apresenta-se com uma única banda principal bem evidenciada, com peso molecular de 23.000.



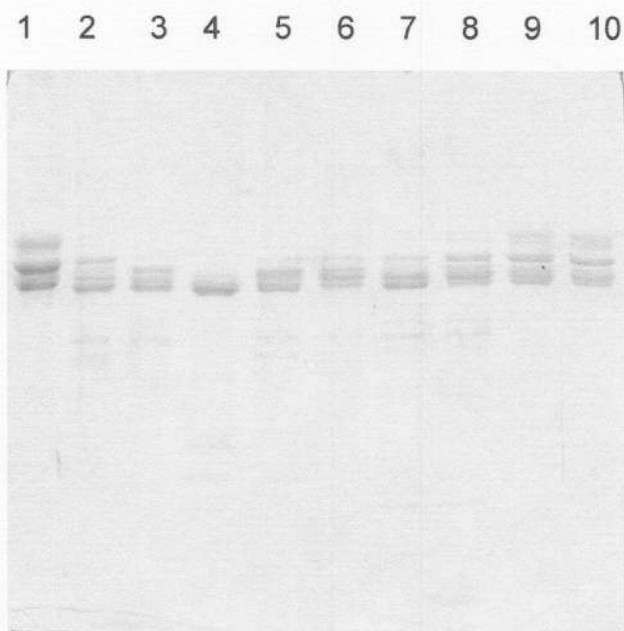
**Figura 07:** Eletroforese em gel de poliacrilamida a 14% com agentes desnaturantes da peçonha bruta de *B. alternatus* e das frações obtidas no fracionamento com a resina DEAE Sephacel. **Linha 01:** Padrão de peso molecular: Dalton Mark VII-L: soroalbumina bovina (66.000), ovoalbumina (45.000), gliceraldéido-3fosfato-desidrogenase (36.000), anidrase carbônica (29.000), tripsinogênio (24.000), inibidor de tripsina (20.100),  $\alpha$ -lactoalbumina (14.400); **linha 02:** peçonha bruta de *B. alternatus*; **linhas 03 a 10:** frações A1 a A8, respectivamente



## 5.1.3.2) Atividades Biológicas e Enzimáticas das frações obtidas do fracionamento em gel de DEAE Sephacel

### 5.1.3.2.1) Atividade Proteolítica sobre o fibrinogênio bovino

A figura 08 apresenta o resultado da atividade fibrinogenolítica da peçonha bruta e das frações isoladas (A1 a A8). Podemos verificar que apenas a fração A2, tal como a peçonha bruta foi capaz de degradar as cadeias  $\alpha$  e  $\beta$  do fibrinogênio. As frações A1, A3, A4, A5 e A6 hidrolisaram preferencialmente a cadeia  $\alpha$ , enquanto que as frações A7 e A8 apresentaram fraca atividade fibrinogenolítica, degradando parcialmente a cadeia  $\alpha$ .



**Figura 08:** Eletroforese em gel de poli-acrilamida 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 01**-fibrinogênio bovino controle incubado sem proteína, **linhas 02 a 10:** fibrinogênio incubado com PB e as frações A1 a A8, respectivamente.

### 5.1.3.2.2) Atividade Proteolítica sobre a Caseína

A tabela 05 mostra o resultado da atividade caseinolítica realizada com a peçonha bruta e com as frações isoladas. Observamos que a fração A2 possui atividade caseinolítica extremamente alta. As frações A1, A3 e A4 apresentaram atividade caseinolítica semelhante à da peçonha bruta. As frações A5 e A6 apresentaram somente traços dessa atividade, enquanto que as frações A7 e A8 não tiveram nenhum efeito sobre a caseína.

**Tabela 05** : Atividade Caseinolítica da peçonha bruta e das frações isoladas em gel de DEAE Sephacel

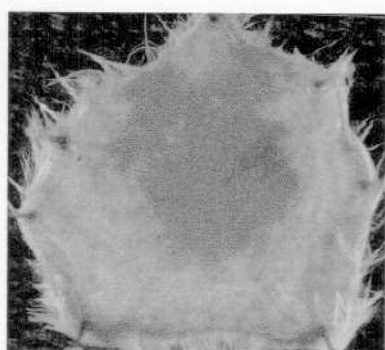
Amostras	Atividade Caseinolítica (espessa em UAC)*
PB	136,10
A1	147,89
A2	642,00
A3	137,40
A4	124,58
A5	27,50
A6	15,20
A7	2,90
A8	0,70

PB: peçonha bruta

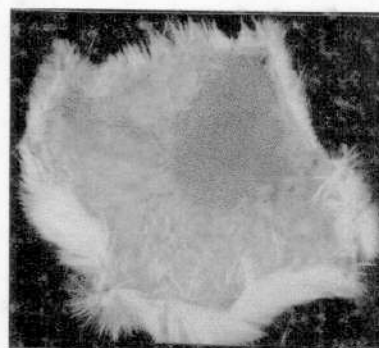
\* Unidade de Atividade Caseinolítica Específica: uma unidade de atividade caseinolítica corresponde ao acréscimo de 0,001 na absorbância à 280nm nas condições estabelecidas para a reação.

### 5.1.3.2.3) Atividade hemorrágica

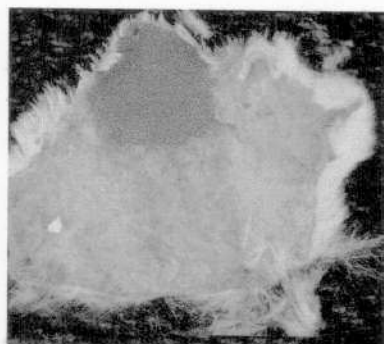
Os resultados obtidos para a atividade hemorrágica estão apresentados na figura 09. A atividade hemorrágica ficou restrita às frações A3, A4 e A7, onde a última apresentou um halo hemorrágico mais intenso, sendo portanto a fração mais hemorrágica.



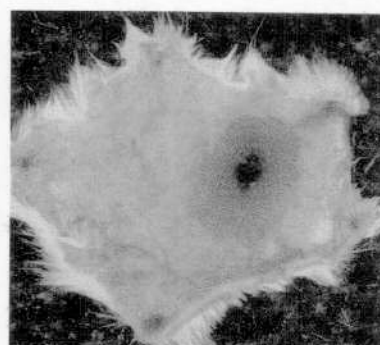
PB



A3



A4



A7

**Figura 09:** Atividade hemorrágica da peçonha bruta (PB) e das frações obtidas no fracionamento com a resina DEAE Sephacel. Amostras contendo 50 mg de proteínas foram injetadas subcutaneamente no dorso de camundongos machos. Após três horas os camundongos foram sacrificados para a observação dos halos hemorrágicos na face interna da pele.



## 6)Discussões

A principal característica da maioria das peçonhas botrópicas é sua alta atividade proteolítica, responsável pelos efeitos locais e sistêmicos observados durante o envenenamento (ASSAKURA *et al*, 1985; SERRANO *et al* , 1993; OLIVEIRA *et al* ,1999).

Em nossa região, grande parte dos acidentes ofídicos, confirmados e registrados pelo Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia, são provocados por serpentes botrópicas. Este foi um dos principais motivos que nos levaram a estudar a peçonha de *Bothrops alternatus*.

O presente trabalho teve como objetivos fracionar a peçonha bruta de *B. alternatus* e identificar as frações isoladas, quanto à sua atividade proteolítica (fibrinogenolítica, caseinolítica e hemorrágica) e fosfolipásica A<sub>2</sub>.

Todas as etapas de fracionamento foram realizadas, utilizando-se os tampões acetato ou bicarbonato de amônio, pois estes tampões são voláteis e facilmente eliminados pela liofilização, não sendo portanto, necessário submeter as frações obtidas à etapa de desalifcação por diálise ou a uma filtração.

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

Inicialmente, a peçonha bruta de *B. alternatus* foi submetida a uma cromatografia de troca iônica em gel de CM Sephadex C-25. Esta resina caracteriza-se por possuir grupamentos fixos negativos (resina catiônica), sendo utilizada para separar proteínas básicas. Este fracionamento resultou em apenas um pico principal, constituído por proteínas ácidas, que não se ligaram à resina ("void"). De acordo com este resultado, podemos inferir que as proteínas que compõem a peçonha bruta de *B. alternatus* possuem caráter predominantemente ácido ou neutro, sendo necessário utilizar resinas aniônicas para uma separação mais eficiente de seus constituintes. A cromatografia da peçonha bruta de *B. alternatus*, em resina de CM Sephadex C-25 não foi satisfatória, uma vez que, o principal objetivo deste trabalho é fracionar a peçonha bruta e determinar as atividades biológicas e enzimáticas das frações obtidas. Por este motivo não realizamos as atividades propostas, pois o pico principal obtido, continha provavelmente todas as proteínas que compõem a peçonha bruta.

As resinas aniônicas, ao contrário das catiônicas, possuem grupos fixos carregados positivamente, onde as proteínas básicas são excluídas primeiramente. A primeira resina aniônica testada foi a DEAE Sephadex A-25, que além de separar proteínas de acordo com suas cargas, separa também conforme o peso molecular das



mesmas. Neste fracionamento, a peçonha bruta foi resolvida em oito frações principais (D1 a D8).

As enzimas fibrinogenolíticas encontradas nas peçonhas de serpente são classificadas de acordo com a especificidade de hidrólise das cadeias A- $\alpha$ , B- $\beta$  e  $\gamma$  do fibrinogênio. Esta especificidade pode ser claramente visualizada na figura 04, onde observamos que todas as frações foram capazes de hidrolisar o fibrinogênio, porém de maneira diferente. Algumas frações tais como D1, D4 e D7 degradaram preferencialmente a cadeia  $\alpha$  do fibrinogênio bovino, enquanto que D2, D3, D5, D6 e D8 hidrolisaram as cadeias A- $\alpha$  e B- $\beta$ . Nenhuma fração foi capaz de hidrolisar a cadeia  $\gamma$ . Este tipo de fibrinogenase é bastante raro.

A atividade proteolítica realizada sobre a caseína revelou que todas as frações, exceto D7 e D8 apresentaram esta atividade. É interessante ressaltar que a fração D3 hidrolisou as cadeias  $\alpha$  e  $\beta$  do fibrinogênio, mas apresentou atividade caseinolítica muito baixa, enquanto que a fração D2 mostrou alta atividade caseinolítica e degradou apenas a cadeia  $\alpha$  do fibrinogênio formando subprodutos de hidrólise diferentes de D1. Isto evidencia especificidade de hidrólise diferentes. No entanto, a fração D5 exibiu alta atividade fibrinogenolítica e caseinolítica. Esses testes sugerem que a peçonha de *B. alternatus* é rica em enzimas proteolíticas, com diferente especificidade de hidrólise tanto para o mesmo como para diferentes substratos.

A atividade hemorrágica ficou restrita a três frações (D4, D5 e D7), onde as frações D5 e D7 apresentaram halos hemorrágicos mais intensos e de maior diâmetro.



Segundo BJARNASOM & FOX (1988), as toxinas hemorrágicas são classificadas de acordo com seu peso molecular. Deste modo, aquelas que possuem o peso molecular entre 20.000 a 30.000, pertencem á classe I, tais como a protease A de *Bothrops moojeni* (ASSAKURA *et al*, 1985); e as três hemorraginas isoladas de *Bothrops insulares* (SELISTRE *al et*, 1990). A classe II compreende as proteínas com peso molecular entre 30.00 a 60.000, neste grupo estão incluídas os fatores hemorrágicos HF1 e HF2 de *B. jararaca* (MANDELBAUM, 1984). A classe III é composta por toxinas maiores e mais potentes, com peso molecular entre 60.00 e 100.00, como a BaH1 de *B. asper* (BORKOW *et al*, 1993).

Na eletroforese em gel de poliacrilamida a 14%, com agentes desnaturantes ( fig. 03), podemos observar que as frações D3 e D4 apresentam somente uma banda, com peso molecular de 14.000 aproximadamente. No entanto, ambas possuem atividade proteolítica sobre o fibrinogênio bovino, e a fração D4 apresenta efeito hemorrágico. Na literatura não foram descritas proteases com peso molecular tão baixo, sendo este peso relacionado às fosfolipases  $A_2$  e/ou miotoxinas. Entretanto, em nosso laboratório foram obtidos resultados semelhantes com a peçonha da serpente *B. moojeni*, onde foi isolada uma protease com forte atividade sobre o fibrinogênio bovino e com peso molecular próximo a 15.000 (OLIVEIRA, F. comunicação pessoal). Portanto, nossos resultados poderiam indicar novas proteases com propriedades diferentes das enzimas já descritas para serpentes botrópicas.

Mas, a ação proteolítica das frações D3 e D4 também poderia estar relacionada com outra(s) proteína(s) que não foi(ram) visualizada(s) no gel, devido à baixa concentração das amostras.

O último fracionamento foi realizado com a resina DEAE Sephacel, onde a peçonha total foi resolvida em oito frações distintas (A1 a A8). Em relação ao fracionamento anterior (DEAE Sephadex A-25), esta resina resultou num perfil cromatográfico mais satisfatório. Analisando o perfil eletroforético (fig. 07, linha 04), percebemos que a fração A2 possui um excelente grau de pureza, apresentando poucos contaminantes que podem ser facilmente eliminados com um novo fracionamento. Esta fração possui alta atividade proteolítica, degradando as cadeias A- $\alpha$  e B- $\beta$  do fibrinogênio e alta atividade caseinolítica; não apresenta atividades hemorrágica e fosfolipásica A<sub>2</sub>, sendo provavelmente uma fibrinogenase com peso molecular de 23.000 aproximadamente.

A atividade fibrinogenolítica está presente em quase todas as frações, exceto nas frações A7 e A8. As frações A1, A3, A4, A5 e A6 quebraram preferencialmente a cadeia A- $\alpha$  do fibrinogênio.

A atividade caseinolítica também foi encontrada em quase todas as frações com exceção de A7 e A8, que não apresentaram atividade fibrinogenolítica, hemorrágica ou fosfolipásica A<sub>2</sub>.

Dentre as frações obtidas no fracionamento com a resina DEAE Sephacel, somente A3, A4 e A7 apresentaram atividade hemorrágica, sendo que a fração A7 provocou halo mais intenso.

Nos dois últimos fracionamentos utilizamos o pH em torno de 7,8, por ser o pH ótimo para a maioria das enzimas proteolíticas e fosfolipases A<sub>2</sub> (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).



Em todos os fracionamentos realizados, o rendimento protéico foi estimado por meio da absorbância à 280 nm. O menor valor encontrado foi com a resina CM Sephadex C-25 (14,61%). No fracionamento com a resina DEAE Sephadex A-25 obtivemos cerca de 26,5%, valor este muito inferior ao esperado. No último fracionamento, realizado em gel de DEAE Sephacel, foi obtido o maior valor de recuperação protéica (50,38%), no entanto, ainda é muito inferior aos 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*.

A atividade PLA<sub>2</sub> foi testada para a peçonha bruta e para todas as frações obtidas nos dois últimos fracionamentos realizados. A peçonha bruta apresentou uma atividade específica em torno de 54,5 U/min/mg. No entanto, esta atividade não foi encontrada em nenhuma das frações isoladas. Para comprovar a ausência de enzimas PLA<sub>2</sub> ativas, foram testados também todos os tubos considerados linha de base. A linha de base corresponde aos tubos onde a absorbância é inferior a 0.05 a 280 nm.

A ausência da atividade em todas as frações obtidas poderia ser explicada pela desnaturação das PLA<sub>2</sub> no decorrer do fracionamento, porém, sabemos que as PLA<sub>2</sub> são enzimas extremamente estáveis, de forma que seria pouco provável a perda da atividade por este motivo (ARNI & WARD, 1996).

Para descartar totalmente esta hipótese, a peçonha bruta foi deixada em solução aquosa por 48 horas em temperatura ambiente. Após esse tempo, a peçonha bruta apresentou atividade específica de 42,0 U/min/mg. A variação da atividade específica encontrada entre a peçonha bruta mantida sob condições adequadas em relação à deixada em temperatura ambiente foi pouco significativa.



Estudos anteriores descrevem a presença de inibidores específicos da atividade PLA<sub>2</sub>, que seriam responsáveis pela baixa atividade encontrada em algumas peçonhas botrópicas ( VIDAL & STOPPANI, 1971; VIDAL *et al*, 1972 *apud* NISENBOM, 1986).

No entanto a presença de inibidores específicos em todas as frações obtidas, seria pouco provável, de modo que novos estudos, utilizando outros métodos de fracionamento, seriam necessários para identificar as enzimas PLA<sub>2</sub> ativas da peçonha de *B. alternatus*.

Em síntese, este trabalho nos permitiu verificar que a peçonha de *B. alternatus* é muito rica em enzimas proteolíticas. Portanto, estudos futuros visando a purificação e caracterização bioquímica dessas enzimas, poderão fornecer valiosas contribuições para a clínica médica, pois muitas possuem ação anti-trombótica e podem ser utilizadas na prevenção de alguns distúrbios da coagulação sangüínea.

## 7. Conclusões

De acordo com os resultados obtidos neste trabalho, podemos concluir que:

- Para fracionar a peçonha bruta de *B. alternatus*, a resina DEAE Sephacel foi mais eficiente; apresentando melhor perfil cromatográfico quando comparadas com as resinas CM Sephadex C-25 e DEAE Sephadex A-25;
- A peçonha da serpente *Bothrops alternatus* é muito rica em enzimas proteolíticas, possuindo alta atividade sobre o fibrinogênio bovino e sobre a caseína;
- Toxinas hemorrágicas estão presentes na peçonha bruta de *Bothrops alternatus*;
- A atividade PLA<sub>2</sub> não foi encontrada em nenhuma das frações isoladas, devido à fatores ainda não determinados.

## 8. Referências Bibliográficas

ARNI, R. K.; WARD, R. J. Phospholipase A<sub>2</sub> - A structural review. **Toxicon**. Oxford. v.34, n.08, p.827-41,1996.

ASSAKURA, M. T. ; REICHL, A. P.; ASPERTI, M. C.; *et al.* Isolation of the major proteolytic enzyme from the venom of the snake *Bothrops moojeni* (caissaca). **Toxicon**. v.23, p.691-706,1985.

ASSAKURA, M. T. ; REICHL, A. P. ; MANDELBAUM, F. R. Comparison os immunological, biochemical and biophysical properties of three hemorrhagic factors isolated from the venom of *Bothrops jararaca* (jararaca). **Toxicon**. v.24, p.943-46, 1986.

BJARNASON, J. W.; FOX, J.. W.. Hemorrhagic toxins from snake venoms. **J. Toxicol. Toxin. Rev.** v.07, n.121, p.209-17,1988.

BODE, W. ; GOMIS-RUTH, F. X.; STOCKER, W. Astacins, serralytins, snake venom and matrix metalloproteinases exhibit identical zinc-binding environments and topologies and should grouped into common family, the "metzinccins". **FEBS lett.** v.331,p.134,1993.

BORKOW, G.; GUTIÉRREZ, J.M.;OVADIA, M. Isolation and characterization of synergistic hemorrhagins from the venom of the snake *Bothrops asper*. **Toxicon**. v.31, p.1137-50,1993.

CASTRO, H. C.; DUTRA, D. L. S.; OLIVEIRA-CARVALHO. *et al.* Bothroalternin, a thrombin inhibitor from the venom of *Bothrops alternatus* . **Toxicon**. v.36, n.12. p. 1903-12,1998.



- DANIELLE, J. J.; BIANCO, I. D.; DELGADO, C. *et al.* A new phospholipase A<sub>2</sub> isoform isolated from *Bothrops neuwiedi* (larará chica) venom with novel kinetic and chromatographic properties. **Toxicon**.v.35, n.8, p.1205-15, 1997.
- DENNIS, E. A. Diversity of group types, regulation and function of phospholipase A<sub>2</sub>. **J. Biol. Chem.** v. 269, p.13057-60,1994.
- DE HASS, G. H.; POSTEMA, N. M.; NIEUWENHUIZEN, W.; VAN DEENEN, L. L. M. Purification and properties of phospholipase A from porcine pancreas. **Biochem. Biophys. Acta.** v.159, p.103-17, 1968.
- GUTIÉRREZ, J. M. Local pathological effects induced by *Bothrops* snake venoms. **Memórias do Instituto Butantan.** 52(supl.):37-38.1990.
- GUTIÉRREZ, J. M.; LOMONTE, B. Phospholipase A<sub>2</sub> myotoxins from *Bothrops* snake venoms. **Toxicon.** v.33, n.11, p.1405-74,1995.
- HARRIS, J. B. Polypeptides from snake venoms which act on nerve and muscle. In : **Progress in Medicinal Chemistry** ( ELLIS, G. P., WEST, G. B. ), Elsevier Science Publishers, B. V. 1984.
- HITE, L. A. ; FOX, J. W.; BJARNASON, J. B. A new family of proteinases is defined by several snake venom metalloproteinases. **Biol. Chem. Hoppe-Seyler.** v.373, p. 381-90,1992.
- HOMSI-BRANDEBURGO, M. I. **Fracionamento do veneno de *Bothrops jaracussu***: caracterização química parcial de componentes ativos e estudo dos efeitos farmacológicos e anatomopatológico da Bothropstoxina. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.1987.132 p. (tese de doutorado).

ITZHAKI, R. F.; GILL, D. M. A microbiuret method for estimating proteins. **Analytical Biochemistry**, v.9, p.401-10,1964.

IWANAGA, S.; SUZUKI, T. Enzymes in snake venoms. In: **Handbook of Experimental Pharmacology**, Berlin. v.52, p.61-158,1979.

KAMIGUTI, A. S.; HAY, C. R. M.; THE AKSTON, R. D. G. et al. Insights into the mechanism of hemorrhage caused by snake venom metalloproteinase. **Toxicon**. v.34, n.06, p.627-642,1996.

KINI. R. M.; EVANS. H. J. A model to explain the pharmacological effects of snake venom phospholipases A<sub>2</sub>. **Toxicon**. Oxford, v.27. n.6, p.613-35,1989.

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**. n.30, p.265-74.1992.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins, during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**. v.227, p.680-85,1970.

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.745-58,1998.

LOMONTE, B.; GUTIÉRREZ, J. M.; BORKOW, G. et al. Activity of hemorrhagic metalloproteinase BaH1 and myotoxin II from *Bothrops asper* snake venom on capillary endothelial cells in vitro. **Toxicon**. v.32, p.505-12. 1994.



MAHIR, M. S.; HYND, J. W.; FLUTE, P. T. *et al.* Effects of defibrinogenation on the early patency rate of experimental small calibre arterial grafts. **Br. J. Surg.** v.74, p. 508-17, 1987.

MANDELBAUM, F. R. ;ASSAKURA, M. T.; REICHL, A. P. Characterization of two hemorrhagic factors isolated from the venom of *Bothrops neuwiedi* (jararaca pintada). **Toxicon.** v.22, p.193-196,1984.

MANDELBAUM, F. R. Snake venom hemorrhagins, **Memórias do Instituto Butantan**, 52 (supl.): p.35-36,1990.

MARKLAND, F. S. Snake venoms and the hemostatic system. **Toxicon.** v.36, n.12, p.1749-998, 1998.

MARSHAL, L. R.; HERRMANN, R. P. Coagulant and anticoagulant actions of Australian snake venoms. **Thromb. Haem.** v. 50, p.707-18,1983.

MEBS, D.; OWNBY, C. L. Myotoxic components of snake venoms: their biochemical and biological activities, **Pharm. Ther.** v.48, p.223-36,1990.

MORI, N.; NIKAI, T.; SUGIHARA, H.; TU, A.T. Biochemical characterization of hemorrhagic toxins with fibrogenase activity isolated from *Crotalus ruber ruber* venom. **Arch. Biochem. Biophys.** v.253, p.713-22, 1987.

NIKAI, T.; MORI, N.; KISHIDA, M.; *et al.* Isolation and biochemical characterization of hemorrhagic toxin from the venom of *Crotalus atrox* . **Arch. Biochem. Biophys.** v. 231, p.309-11,1984.

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.259-72, 1986.



OLIVEIRA, F. ; RODRIGUES, V. M. ; BORGES, M. H. *et al.* Purification and partial characterization of a new proteolytic enzyme from the venom of *Bothrops moojeni* (Caissaca). **Biochem. and Molec. Biology Int.** v.47, n.06, p.1069-77, 1999.

OLIVEIRA, F. **Purificação e caracterização química parciais de uma enzima proteolítica do veneno de *Bothrops moojeni* (caissaca).** Universidade Federal de Uberlândia, 1997,91p, ( tese de mestrado).

OLIVEIRA, R. B. **Fatores epidemiológicos e clínicos associados à incoagulabilidade sangüínea no envenenamento por Serpentes do gênero *Bothrops*.** Universidade Federal de Uberlândia, 1999,107p, (tese de mestrado).

PANDYA, B. V.; BUDZYNSKI, A. Z.. Anticoagulant proteases from Western diamondback rattlesnake (*Crotalus atrox*) venom. **Biochem.** v.23, p.460-71,1984.

PAN, F. M.; CHANG, W.; CHIOU, S. cDNA and protein sequences coding for the precursor of phospholipase A<sub>2</sub> from Taiwan cobra, *Naja Naja Atra*. **Biochem. and Molec. Biology Int.**v.33, n.01, p.187-94,1994.

PEREZ, O. A. ; KOSCINCZUK, P. ;NEGRETTE, M. S. *et al.* Effects os *Bothrops alternatus* venom os Argentina on muscle and different organs in mices. **Acta Physiol. Phamacol Ther Latioam.** v.46, n.02. p.97-102,1999.

RENETSEDER, R.; BRUNIE, S.; DIJKSTRA, B. W. *et al.* A comparison of the cristal structures of phospholipase A<sub>2</sub> from bovine pancreas and *Crotalus atrox* venom. **J. Biol. Chem.** v.260, p.11.627-34,1985.

RIBEIRO, L. A .Epidemiology of ophidic accidents. **Memórias do Instituto Butantan.** 52(supl.):15-16.1990.

- RIBEIRO, L. A. ;JORGE. M. T. Acidentes por serpentes do gênero *Bothrops*: série de 3.139 casos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v.30, n.06, p.01-10,1997.
- ROSENFELD, G. Symptomatology, pathology and treatment of snake bites in South America. In: **Venomous and their venoms**. BUCHERL, W. and BUCKLEY, E. E., eds). New York: Academic Press, v.2, p.345-403, 1971.
- RUSSEL, F. E. The clinical problem of crotalid snake venom poisoning. In: snake venom. **Hanbook of Experimental Pharmacology**. v.52, p.978-88, 1979.
- SAPRU, Z. Z.; TU, A. T.; BAILEY, G. S. Purification and characterization of fibrinogenase from the venom of western diamondback rattlesnake (*Crotalus atrox*). **Biochim. Biophys. Acta**. v.747, p.225-33.1983.
- SCHMIDT, M. E.; ABDELKBAKI, Y. Z.; TU, A. T. Nephrotoxic action of rattlesnake and sea snake venoms: na electron-microscopic study. **J. Path.** v.118, p.49-53,1976.
- SERRANO, S. M. T.; MATOS, N.F. C.; MANDELBAUM, F. R. *et al*. Basic proteinases from *Bothrops moojeni* (caissaca) venom. Isolation and activity of two serine proteinases MSPI and MSPII on synthetic substrates and on platelet aggregation. **Toxicon**. v.31, p.471,1993.
- SELISTRE, H. S.;QUEIROZ, L. S.;CUNHA, O. A. B.;SOUZA, G. E. P. *et al*. Isolation and characterization of hemorrhagic, myonecrotic and edema inducing toxins from *Bothrops insularis* (jararaca ilhoa) snake venom. **Toxicon**. v.28 p.261-73,1990.
- SMOLKA, M. B.; MARANGONI, S.; OLIVEIRA, B. *et al*. Purification and partial characterization of a "thrombin-like" enzyme, Balterobin, from the venom of *Bothrops alternatus*. **Toxicon**. v.36, n.07, p.1059-63,1998.