

**Fábio de Oliveira**

**Purificação e Caracterização Química Parciais de uma  
enzima proteolítica do veneno de *Bothrops moojeni*  
(Caissaca)**

Uberlândia - Minas Gerais

maio - 1997-

b = 0

MAN  
577.15  
048p  
TES/ME

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA**  
**PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA**

**Purificação e Caracterização Química Parciais de uma  
enzima proteolítica do veneno de *Bothrops moojeni*  
(Caissaca)**

577.15 048p TES/FU  
DIRBI - UFU UMU 01177/97



1000167993

**Fábio de Oliveira**

Dissertação apresentada à Universidade  
Federal de Uberlândia, como partes das  
exigências do Curso de Pós-Graduação  
em Genética e Bioquímica, para a obtenção  
do Título de Mestre em Genética e Bioquímica

Uberlândia - Minas Gerais

Maio - 1997-



# UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

Campus Umuarama Bloco 2E Sala 37

38.400-902, UBERLÂNDIA - MG

## ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

1 - TÍTULO DA TESE: Purificação e caracterização química parciais de uma enzima proteolítica do veneno de *Bothrops moojeni* (Caissaca)

2 - ALUNO: Fábio de Oliveira

3 - PROFESSOR ORIENTADOR: Maria Inês Homsí Brandeburgo

4 - DATA: 26/ 05/ 97

5 - BANCA EXAMINADORA:

Titular Maria Inês Homsí Brandeburgo

Titular Amélia Hamaguchi

Titular Suely Vilela

Suplente Egle Machado de Almeida Siqueira

Suplente Carlos Alberto de Oliveira

6 - APRESENTAÇÃO: Início - 14:09 Término - 15:00

7 - TEMPO DE ARGUIÇÃO: Início - 15:05 Término - 16:30

8 - CONCEITO ATRIBUÍDO POR EXAMINADOR:

1º Membro da Banca A

2º Membro da Banca A

3º Membro da Banca A

Conceito Final: A

9 - OBSERVAÇÕES: \_\_\_\_\_

10 - ASSINATURA DOS MEMBROS DA BANCA:

[Assinatura]  
[Assinatura]  
Maria Inês H. Brandeburgo

11 - RESERVADO AO COLEGIADO

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA**  
**PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA**

**Purificação e Caracterização Química Parciais de uma  
enzima proteolítica do veneno de *Bothrops moojeni*  
(Caissaca)**

**Aluno: Fábio de Oliveira**

**Orientadora: Prof. Dra. Maria Inês Homs-Brandeburgo**

Dissertação apresentada à Universidade  
Federal de Uberlândia, como partes das  
exigências do Curso de Pós-Graduação  
em Genética e Bioquímica, para a obtenção  
do Título de Mestre em Genética e Bioquímica

Uberlândia- Minas Gerais

Maio - 1997-

## **Dedico este trabalho**

### **À minha mãe Sonilda,**

Pelo amor, sacrifício, dedicação e pela presença em todos os momentos da minha vida

### **À minha família,**

Pelo amor sincero, apoio e contribuição na formação da minha vida pessoal e acadêmica.

### **À minha noiva Lucimar,**

Pelo amor, carinho e companheirismo a mim dedicado.

Meu sincero amor.

### **Ao meu tio Luiz Antônio Fernandes,**

Pela convivência fraterna e sincera e pelo apoio recebido no decorrer da minha vida

### **À Maria Inês Homsí Brandeburgo,**

Pela orientação perfeita e amiga a mim dirigida. Pela contribuição calorosa e precisa na minha formação profissional. Meus agradecimentos e admiração.

## **Agradecimentos**

À todos os amigos do grupo “peçonha” pela convivência enriquecedora:

À Márcia pela convivência harmoniosa e sincera.

Ao Andreimar pelo auxílio prestado no desenvolvimento deste trabalho

À Veridiana pela troca de experiências e discussões dos resultados

À Ana Paula e Luís Fernando pelo apoio prestado na preparação de soluções e géis

À Odete que gentilmente confeccionou os gráficos

Aos funcionários do laboratório de Bioquímica e Biofísica em especial à Sebastiana, Cleuber, Adolfo, Hélio e Heleno pela colaboração dispensada a este trabalho.

Ao Laboratório de Análises Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia.

Ao Hemocentro Regional de Uberlândia pelo fornecimento do plasma humano para os ensaios da atividade biológicas

Ao Instituto Vallée e Pentapharm do Brasil pelo fornecimento de animais para os ensaios de atividade biológica

Aos professores do Departamento de Genética e Bioquímica desta Universidade.

Ao CNPq, CAPES, e PROP-UFU, pelo apoio financeiro

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

## ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO	01
2. MATERIAIS	14
2.1. Veneno bruto	15
2.2. Eletroforese e cromatografia	15
2.3. Padrões para determinação de Peso Molecular	15
2.4. Determinação do aminoácido N-terminal	16
2.5. Determinação da composição em aminoácidos	16
2.6. Determinação das atividades enzimáticas	16
3. MÉTODOS	17
3.1 Fracionamento do veneno bruto de <i>Bothrops moojeni</i>	18
3.2 Cromatografia de troca iônica em gel de CM Sepharose fast flow	18
3.2.1 Reciclagem da resina	18
3.2.2 Fracionamento em gel de CM Sepharose fast flow	18
3.2.3 Determinação quantitativa de proteínas	19
3.3 Ensaio enzimáticos	19
3.3.3 Atividade coagulante sobre o fibrinogênio	19
3.3.4 Atividade coagulante sobre o plasma	20
3.3.3 Atividade fosfolipásica (PLA2)	20
3.3.4 Atividade hemorrágica	21
3.3.5 Atividade esterásica sobre o TAME	21
3.3.6 Atividade proteolítica sobre o DL_BAPNA	21
3.3.7 Atividade proteolítica sobre a azocaseína e sobre a azoalbumina	22
3.3.8 Teste de degradação do fibrinogênio bovino e da caseína	22
3.4 Características Químicas	23
3.4.1 Análise do conteúdo de carboidratos neutros	23
3.4.2 Eletroforese em gel de poliacrilamida sem agentes desnaturantes para proteínas básicas	23
3.4.3 Eletroforese em gel de poliacrilamida com agentes desnaturantes para estimativa do peso molecular	24
3.4.4 Identificação do resíduo aminoterminal	25
3.4.5 Focalização isoeletrica	27
3.4.5.1 Preparação do gel	27
3.4.5.2 Aplicação da amostra e focalização isoeletrica	27
3.4.5.3 Detecção das proteínas e determinação do	

gradiente de pH	28
3.4.6 Determinação da composição em aminoácidos	28
3.4.6.1 Hidrólise ácida total com HCl	29
3.4.6.2 Determinação dos resíduos de meia-cistina.	29
Oxidação com o ácido perfórmico	29
3.4.6.2.1 Preparação do ácido perfórmico	29
3.4.6.2.2 Oxidação e hidrólise	30
3.4.7 Imunoelektroforese.	30
4. RESULTADOS	32
4.1 Purificação e Atividades Enzimáticas	33
4.1.1 Cromatografia de troca iônica em gel de CM Sepharose fast flow.	33
4.1.2 Recuperação protéica	34
4.1.3 Efeito dos agentes inibidores da atividade coagulante da fração MOO3 sobre o plasma humano	41
4.1.4 atividade proteolítica da fração MOO3 purificada do veneno total de <i>Bothrops moojeni</i>	43
4.2 Características Químicas	47
4.2.1 Eletroforese em gel de poliacrilamida com agentes denaturantes e determinação do peso molecular	47
4.2.2 Análise da composição em aminoácidos	50
4.2.3 Análise do conteúdo de carboidratos neutros	51
4.2.4 Critérios de Pureza	51
4.2.4.1 Eletroforese em gel de poliacrilamida sem agentes desnaturantes para proteínas básicas	51
4.2.4.2 Identificação do resíduo aminoterminal	53
4.2.4.3 Focalização isoeletrica	53
4.2.4.4 Imunoelektroforese	55
5. DISCUSSÃO	56
6. CONCLUSÃO	66
7. RESUMO	68
8. SUMMARY	70
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	72



## ABREVIATURAS:

TEMED - N,N,N',N'-tetrametiletilenediamina

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

SDS - Dodecil sulfato de sódio

DNS - Dansil cloreto

DL-BAPNA - p-Nitroanilida de Benzoil Arginina

DFP - Diisopropilfluorfosfato

EDTA - Ácido etilendiaminotetracético

PMSF - Fenilmetilasulfonil fluoreto

TAME - Hidrogenocloreto de p-toluenosulfonil-L-arginina metil éster

## LISTA DE TABELAS

Tabela 01. Relação das enzimas coagulantes do tipo trombina isoladas do veneno de várias espécies de serpentes.

Tabela 02 - Atividades enzimática específicas e os rendimentos das frações do veneno de *B. moojeni* obtidas por cromatografia em gel de CM Sepharose fast flow.

Tabela 03. Atividade coagulante, sobre o plasma humano, do veneno bruto de *Bothrops moojeni* e das frações MOO3 e MOO4.

Tabela 04. Efeito dos inibidores da atividade coagulante sobre o plasma humano induzida pela fração MOO3.

Tabela 05. Composição de aminoácidos da fração MOO3 isolada de *Bothrops moojeni*.

Tabela 06. Relação de fibrinogenases isoladas do veneno de serpentes do gênero *Bothrops* e *Philodryas*.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 01. Cascata da coagulação sangüínea.

Figura 02. Cromatografia de 150 mg de veneno bruto de *B. moojeni* em gel de CM Sepharose fast flow.

Figura 03. Eletroforese em gel de poliacrilamida com agentes desnaturantes a 16 % das frações obtidas do veneno de *B. moojeni* em cromatografia de troca iônica em gel de CM Sepharose fast flow.

Figura 04. Densitometria da fração MOO3, purificada do veneno de *B. moojeni*, por eletroforese em gel de poliacrilamida com agentes desnaturantes a 16 %.

Figura 05. Eletroforese em gel de poliacrilamida com agentes desnaturantes a 16 % dos produtos de digestão do fibrinogênio bovino pela fração MOO3

Figura 06. Eletroforese em gel de poliacrilamida com agentes desnaturantes a 16 % dos produtos de digestão do fibrinogênio bovino pela fração MOO3 tratada com leupeptina

Figura 07. Eletroforese em gel de poliacrilamida com agentes desnaturantes a 16 % dos produtos de hidrólise da caseína pela fração MOO3.

Figura 08. Eletroforese em gel de poliacrilamida com agentes desnaturantes a 16 % para a determinação do peso molecular da fração MOO3 segundo LAEMMLI (1970).

Figura 09. Curva padrão para a determinação do peso molecular da fração MOO3, na ausência e presença de agente redutor, em gel de poliacrilamida com agentes desnaturantes a 16 % pelo método de LAEMMLI (1970)

Figura 10. Eletroforese em gel de poliacrilamida para proteínas básicas a 10 %.

Figura 11. Gradiente de pH obtido na focalização isoeletrica da fração MOO3

Figura 12. Análise imunoeletrorética da fração MOO3 purificada do veneno de *Bothrops moojeni*.

## 1 - INTRODUÇÃO

Os venenos das serpentes brasileiras são ricos em enzimas proteolíticas que atuam numa grande variedade de substratos naturais, tais como: caseína, hemoglobina, colágeno, gelatina, elastina, fibrinogênio, insulina e glucagon (IWANAGA e SUZUKI, 1979). Algumas dessas enzimas são toxinas hemorrágicas que degradam proteínas da matriz extracelular (MATRISIAN 1992), outras afetam a coagulação do sangue, agindo como procoagulante, convertendo o fibrinogênio em fibrina (MARKLAND e DAMUS, 1971; OUYANG e YANG, 1974; STOCKER e BARLOW, 1976; SELISTRE e GIGLIO, 1987), enquanto outras agem como anticoagulante por exercer atividade fibrinogenolítica e fibrinolítica (BAJWA et al., 1980, KOMORI et al., 1985; DAOUD et al., 1986),

Muitas dessas enzimas foram isoladas e caracterizadas como metaloproteases (BJARNASON e FOX, 1988; KINI e EVANS, 1992), pois constituem uma família de enzimas proteolíticas dependente de metal (HITE et al., 1992; BODE et al., 1993). Essas enzimas podem ser classificadas em dois grupos, de acordo com sua especificidade ao substrato: toxinas hemorrágicas \_ enzimas com alta especificidade ao substrato que induzem hemorragia quando injetadas em animais (MANDELBAUM et al., 1984; MORI et al., 1987; SANCHES et al., 1987; TU, 1982), Toxinas não hemorrágicas \_ enzimas com ampla especificidade ao substrato que não induzem hemorragia ( ASSAKURA et al., 1985; MORI et al., 1987; SANCHES et al., 1987; TU, 1982).

WAGNER e PRESCOTT (1968) investigaram a importância dos íons metálicos na atividade proteolítica, quando estudavam a protease mais abundante do veneno de *Agkistrodon piscivorus leucostoma*, a peptidase A de *leucostoma*, uma enzima de peso molecular 22.500, ativa sobre a caseína e hemoglobina e que contém 2 átomos-gramas de cálcio e 1 átomo-grama de zinco por molécula. A remoção de íons zinco pela 1,10-fenantrolina, na

presença de íons cálcio, inibi a ação da peptidase A da *leucostoma*, a qual pode ser reativada pela adição de íons zinco. Dessa forma, esses autores concluíram que os íons metálicos são essenciais para a manutenção da conformação nativa dessa enzima (WAGNER e PRESCOTT, 1968).

SUZUKI et al. (1968) também fizeram um importante estudo da função dos íons metálicos sobre a atividade proteolítica dessas metaloproteases. Eles isolaram três proteinases do veneno de *Agkistrodon haly blomhoffii*: proteinase a, b e c, ativas em vários substratos naturais, tais como: caseína, hemoglobina, gelatina, elastina, colágeno, fibrinogênio, fibrina, insulina, glucagon e bradicinina. As três proteinases são inibidas por EDTA e suas atividades são reduzidas por agentes redutores de grupo -SS. A proteinase c possui um peso molecular de 92.000 e contém aproximadamente 2 átomos-gramas de cálcio por molécula de enzima. A remoção dos íons metálicos da proteinase c (*Halys blomhoffii*) resulta numa mudança conformacional desta enzima com concomitante perda irreversível da atividade proteolítica. Parece, portanto, que os íons metálicos e as pontes -SS estão envolvidos na atividade e na estabilização da proteinase c.

Estudos bioquímicos têm mostrado que a maioria das toxinas hemorrágicas purificadas dos venenos de serpentes são metaloproteases dependentes de zinco (BJARNASON e FOX, 1988) e que as atividades hemorrágica e proteolítica são inibidas por agentes quelantes tais como EDTA e 1,10 fenantrolina (BJARNASON e FOX, 1988).

As hemorragias locais e sistêmicas são conseqüências comuns do envenenamento por serpentes das famílias Crotalidae e Viperidae. Essas metaloproteinases hemorrágicas são responsáveis pela degradação das proteínas da matriz extra celular e pelo efeito citotóxico direto sobre as células endoteliais; sua ação ocorre basicamente ao nível da membrana basal dos

vasos capilares. KAMIGUTI et al. (1996) descreveram os efeitos de uma metaloproteinase hemorrágica de alto peso molecular, a jaragina (*B. jararaca*), sobre os componentes do plasma e das plaquetas envolvidos no mecanismo hemostático. As alterações desses componentes hemostáticos resultam em hemorragia.

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

*Bothrops jararaca*

Algumas vezes duas metaloproteases isoladas do mesmo veneno podem hidrolisar os mesmos substratos, mas uma é hemorrágica e a outra não.

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

Estudos comparativos das propriedades imunológicas de metaloproteinases (fatores hemorrágicos e proteases) isoladas dos venenos de *Bothrops jararaca*, *B. neuwiedi* e *B. moojeni*, mostraram que os fatores hemorrágicos contêm determinantes antigênicos comuns, enquanto que as proteases são imunologicamente distintas. Os anti-soros específicos contra os fatores hemorrágicos foram capazes de neutralizar tanto a atividade hemorrágica dos homólogos como as atividades dos outros fatores hemorrágicos (MANDELBAUM e ASSAKURA, 1988).

As serpentes pertencentes ao gênero *Bothrops* são responsáveis por cerca de 90 % dos acidentes ofídicos ocorridos no Brasil e se caracterizam por



afetar principalmente o mecanismo hemostático (ROSENFELD, 1971; KAMIGUTI e CARDOSO, 1989; HUTON e WARRELL, 1993; KAMIGUTI e SANO-MARTINS, 1995). As alterações da coagulação sanguínea causadas pelos venenos ofídicos têm sido investigadas “in vitro” (DENSON, 1972; NAHAS et al., 1964; NAHAS et al., 1979; SLOTTAK, 1964) e “in vivo” (AMARAL et al., 1980; JORGE e RIBEIRO, 1988; KAMIGUTI e CARDOSO, 1989; KAMIGUTI et al., 1986; MINISTÉRIO da SAÚDE, 1986) desde a década de 60 no Brasil. O veneno dessas serpentes atua na atividade coagulante do sangue por meio de diversos mecanismos; entre eles podemos citar a ação direta sobre o fibrinogênio, ativação do fator X, fator V, e da protrombina, por ação plaquetária e por ter atividade semelhante à tromboplastina. O veneno botrópico é uma mistura contendo diferentes serino proteases, particularmente a “thrombin-like”, enzima responsável pela formação do coágulo de fibrina na fase final do processo de coagulação do sangue. O evento central da coagulação é a conversão do fibrinogênio, uma glicoproteína plasmática solúvel formada por três pares de cadeias polipeptídicas não idênticas ( $A\alpha$ ,  $B\beta$ ,  $\delta$ )<sub>2</sub>, em fibrina insolúvel. A trombina exerce um papel crucial nessa reação enzimática. Ela hidrolisa as cadeias  $\alpha$  e  $\beta$  do fibrinogênio pela remoção de pequenos fragmentos designados fibrinopeptídeos A e B, respectivamente.

Após a remoção dos fibrinopeptídeos, os monômeros de fibrina resultante se polimerizam para formar uma rede de fibrina representando a composição:  $[(\alpha+\beta+\delta)_2]_n$ . Este polímero de fibrina se caracteriza pela solubilidade em soluções concentradas de uréia e se transforma em fibrina insolúvel por ação do fator XIII (LAKI e LORAND, 1948). Esta enzima é ativada pela trombina através de uma proteólise limitada e, em presença de cálcio, catalisa a formação de ligações entre resíduos lisil e glutamil, formando

a fibrina insolúvel, de composição:  $[(\alpha+\beta+\delta)_2]_n^x$  (SEEGERS e OUYANG, 1979). Muito embora a liberação do fibrinopeptídeo B pela trombina ocorra numa velocidade muito menor que a do fibrinopeptídeo A , ela aumenta substancialmente durante a formação da fibrina (BLOMBÄCK et al., 1978).

A figura 01 mostra a cascata da coagulação sangüínea e os diferentes pontos onde os venenos de serpentes podem agir sobre ela.

## VIA INTRÍNSECA

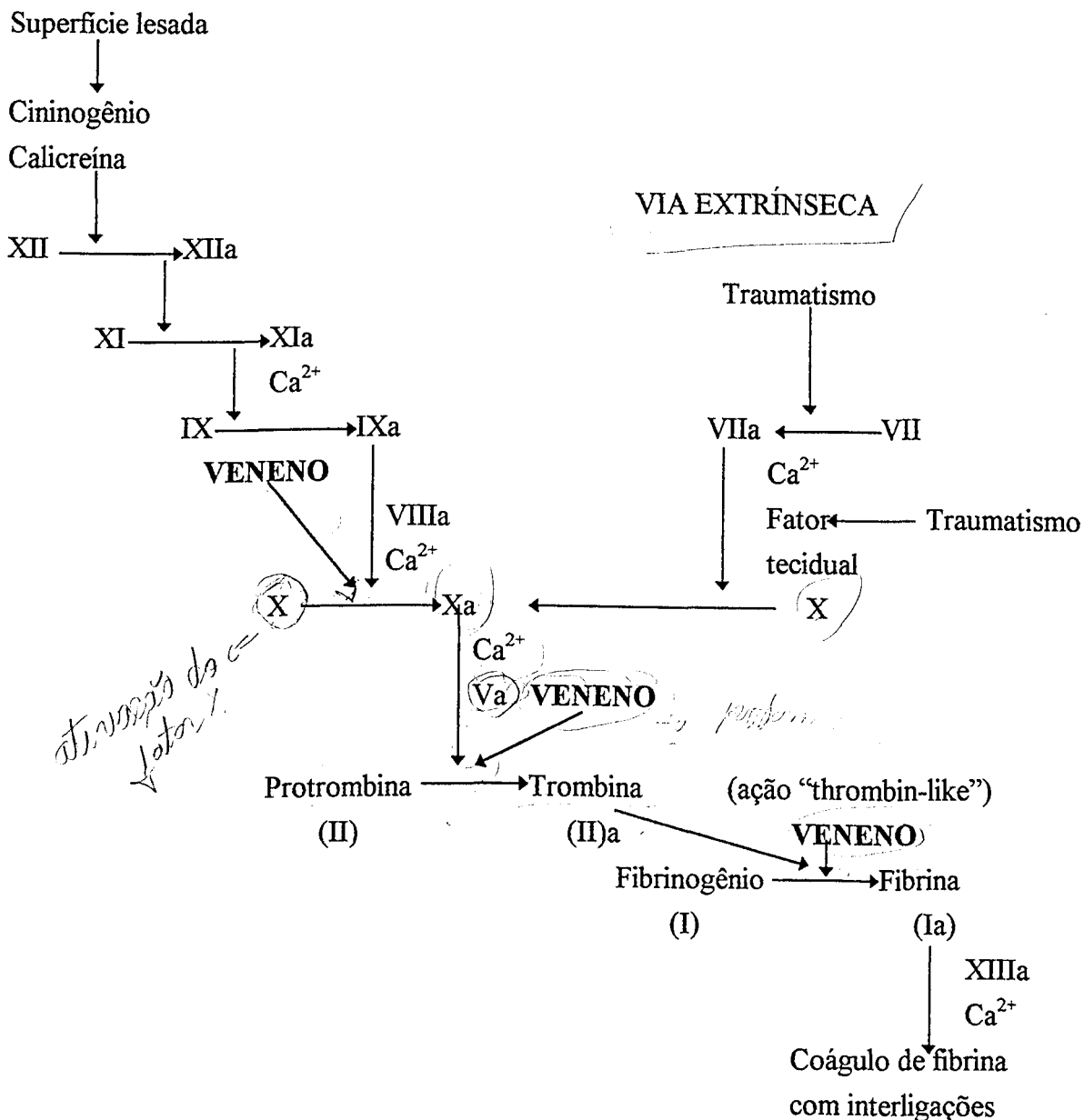


Figura 01. Cascata da coagulação sanguínea. Um coágulo de fibrina é formado pela ação conjugada das vias intrínseca e extrínseca. Esta figura mostra os diferentes pontos onde os venenos de serpentes podem agir na cascata da coagulação sanguínea.

Várias enzimas coagulantes com especificidade semelhante à trombina foram purificadas a partir do veneno de serpentes das famílias Crotalidae e Viperidae (MAGALHÃES et al., 1981; PIRKLE e STOCKER, 1991; LARABA-DJEBARA et al. 1992; ARAGON-ORTIZ e GUBENSEK, 1993; KOMORI et al., 1993; NISHIDA et al., 1994; CHANG e HUANG, 1995).

STOCKER et al. (1974) purificaram um grande número dessas enzimas a partir de venenos botrópicos: *Bothrops alternatus*, *Bothrops asper*, *Bothrops cotiara*, *Bothrops jararaca*, *Bothrops jararacussu*, *Bothrops lanceolatus*, *Bothrops neuwiedii*, *Bothrops marajoensis* e *Bothrops moojeni*. Algumas clivam preferencialmente o fibrinopeptídeo A do fibrinogênio e outras preferencialmente o fibrinopeptídeo B (PIRKLE e STOCKER, 1991). A maioria delas difere da trombina porque libera somente o fibrinopeptídeo A, não ativa o fator XIII e não é inibida pela heparina.

Essas enzimas causam uma rápida defibrinogenação quando administradas endovenosamente, devido ao efeito proteolítico sobre o fibrinogênio, formando monômeros de fibrinas (fibrinas sem ligação cruzada) que podem ser rapidamente removidos da circulação, tanto pela fibrinólise como pela via do sistema retículo endotelial (MAHIR et al., 1987; SILBERMAN et al., 1973). Tais enzimas “thrombin-like” têm sido usadas clinicamente na prevenção e tratamento de desordens trombóticas sob certas condições, 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 várias desordens vasculares pela redução da viscosidade do sangue (BELL, 1988; STOCKER e MEIER, 1988).

A tabela01 mostra a relação das enzimas coagulantes “thrombin’like” isoladas do veneno de várias espécies de serpentes.

Tabela 01. Relação das enzimas coagulantes do tipo trombina isoladas do veneno de várias espécies de serpentes.

Espécies	Peso Molecular	Fibrinopeptídeo Liberado	Inibição por		Retração do Coágulo	Ativação Fator XIII	Referências
			DFP	Heparina			
<i>A. accutus</i> (Acutin)	33,500		SIM	NÃO	-		Ouyang et al (1971)
<i>A. blomhoffi</i>	36,000	A		NÃO		NÃO	Ugarova et al. (1985)
<i>A. caliginosus</i>	(a) 34,000 - 37,000 (b) 42,000 - 43,000						Suzuki e Takahashi (1984) Suzuki e Takahashi (1984)
<i>A. c. controtrix</i> (Venzyne)	68,000	B(A)	SIM	NÃO	-		Herzig <i>et al.</i> (1970 e Welchers(1988); Dyr et al (1983)
<i>A. halys pallas</i>	43,000	B(A)	SIM			SIM	Guan et al (1984, 1985)
<i>B. garbonica</i> (Garbonase)	40,000	A,B		NÃO		SIM	Gaffney et al. (1973)
<i>B. asper</i> (Asperase)	30,000	A	SIM	NÃO		SIM	Aragon-Ortiz e Gubensek
<i>B. atrox</i> (subespecies propostas: <i>B. marajoensis</i> , <i>Batroxobin</i> , <i>Reptilase - R</i> )	42,000	A	SIM	NÃO	++	NÃO	Stocker e Barlow(1976) Blombäck (1958)
<i>B. insularis</i>	45,000			SIM		NÃO	Selistre e Giglio(1987)
<i>B. jararacussu</i>	50.600 - 60.000	AB		NÃO			Zaganelli et al. (1996)
<i>B. moojeni</i> (Batroxobin, Defibrase)	35,800	A	SIM	NÃO	++	SIM	Stocker (1978);Blomback (1958)
<i>C. rhodostoma</i> ( <i>A. rhodostoma</i> (Ancrod, Arvin)	35,000	A	SIM	SIM	-		Bell (1974,1980); Reid e CHAN (1968)
<i>C. vipera</i> (Cerastobin)	38,000	AB	SIM				Farid e Tu (1989)
<i>C. adamanteus</i> (Crostalase)	32,700	A	SIM		-		Markland e Damus (1971)
<i>C. horridus</i> (Defibrizyme)	19,500 29,500	A			+		Bonilla (1975) Shu et al. (1983)
<i>D. typus</i>	55,000 - 67,700						Hiestand e Hiestand (1979)
<i>L. muta noctivaga</i> (Clotase)	36,300	A	SIM				Magalhães et al. (1981)
<i>T. flavorividis</i>	65,000 - 70,000	A		NÃO	-	NÃO	Kosugi et al. (1986)
<i>T. gramineus</i>	45.400	+	-				Chang e Huang (1995)
<i>T. okinavensis</i>	35,000	A					Anderson (1972)
<i>Okinaxobin I</i>	37.500	B					Nose et al. (1994)
<i>Okinaxobin II</i>	37.500	AB	SIM				Nose et al. (1994)
<i>T. stejenegeri</i>	29,500						Ouyang e Yang (1974)

Por outro lado existem enzimas no veneno de serpentes que atuam diretamente sobre o fibrinogênio e/ou a fibrina levando à incoagulabilidade sangüínea, em contraste com as enzimas “thrombin-like” mencionadas anteriormente (OUYNG et al., 1992). SHIMOKAWA e TAKAHASHI (1995) fizeram um importante estudo comparativo dos mecanismos de degradação do fibrinogênio humano trabalhando com hidrolases de éster arginina, isoladas do veneno de *Agkistrodon caliginosus* e designadas de CPI-enzima-1, CPI-enzima-2, cininogenase-1 e cininogenase-2. Durante a degradação do fibrinogênio, a CPI-enzima-2 libera o fibrinopeptídeos A e B, enquanto que a cininogenase-1 libera somente o fibrinopeptídeo A. Entretanto, essas enzimas não apresentaram atividade “thrombin-like”. Comumente a trombina induz a formação de um coágulo de fibrina quando esses fibrinopeptídeos são liberados. Em particular, a liberação do fibrinopeptídeo A é condição essencial para a formação de um coágulo visível de fibrina (BLOMBÄCK, 1978). Considerando este fato, os autores sugeriram que a CPI-enzima-2 e cininogenase-1 clivam as mesmas ligações peptídicas na molécula do fibrinogênio, mas que um domínio de importância na formação do coágulo de fibrina é de algum modo perdido e que o coágulo não pode ser formado, muito embora os fibrinopeptídeos A e B sejam liberados.

As enzimas fibrin(ogen)olíticas encontradas nos venenos de serpentes podem ser classificadas em três grupos de acordo com a especificidade de hidrólise das cadeias do fibrinogênio. O primeiro grupo das fibrinogenases do veneno são aquelas com especificidades pela cadeia  $\alpha$  do fibrinogênio. Essas enzimas foram isolada a partir do veneno de *Crotalus atrox* (PANDYA e BUDZYNSKI, 1984), *Agkistrodon c. contortrix* (MARKLAND et al., 1988), *A. rhodostoma* (OUYANG e HUANG, 1983), *Trimeresurus mucrosquamatus*

(OUYANG et al., 1977; OUYANG e YANG, 1976; OUYANG e HUANG, 1979), *T. gramineus* (OUYANG e HUANG, 1979), *Bothrops moojeni* (ASSAKURA et al., 1985), *A. calinorus* (SHIMOKAWA et al., 1994), *B. jararacussu* (ZAGANELLI et al., 1996), *B. moojeni* (SERRANO et al., 1993a, 1993b) e *B. jararaca* (MARUYAMA et al., 1992). As fibrinogenases cadeia A- $\alpha$  são metaloproteinases contendo zinco e são completamente livres de atividade arginina esterásica. Elas possuem pesos moleculares entre 20.000 e 26.000. Essas enzimas apresentam pontes dissulfetos que são importantes para sua estrutura e função. Aparentemente, degradam primeiro a cadeia  $\alpha$  do fibrinogênio e depois a  $\beta$ . Um subgrupo desta classe de metaloproteinases com atividade fibrinogenase cadeia A- $\alpha$  apresenta pesos moleculares entre 46.000 a 58.000, o qual é significativamente mais alto que o de outras fibrinogenases cadeia A- $\alpha$ . Enzimas deste subgrupo foram isoladas em venenos de *Crotalus atrox* (PANDYA, 1984) e *Naja nigricollis* (EVANS, 1984; EVANS, 1988).

O segundo grupo das fibrin(ogen)ases do veneno são aquelas com especificidade pela cadeia B- $\beta$  do fibrinogênio. Essas enzimas são serino proteases, possuem atividade arginina esterásica e são inibidas por diisopropilfluorofosfato (DFP) ou fenilmetilasulfonil fluoreto (PMSF), mas não por EDTA. Essas enzimas foram encontradas nos venenos de *C. atrox* (SAPRU, 1983; PANDYA, 1984), *T. gramineus* (OUYANG, 1979) e *T. macrosquamatus* (OUYANG, 1977; OUYANG, 1976; TENG, 1985). As fibrinogenases cadeia B- $\beta$  apresentam pesos moleculares entre 23.000 a 31.000 e são mais estáveis ao calor que as fibrinogenases cadeia A- $\alpha$  (MARSHALL, 1983; OUYANG, 1979).

NIKAI e col. (1983) descreveram uma fibrinogenase A- $\alpha$  do veneno de *C. atrox* que apresenta características diferentes das demais já isoladas. Trata-se de uma enzima com atividade arginina esterase, que é inibida pelo

diisopropilfluorofosfato, mas não por EDTA, com um peso molecular aparente de 31.000 e que cliva preferencialmente a cadeia A- $\alpha$ . Essa enzima pode representar outra classe de fibrin(ogen)ase, mas são necessários estudos adicionais para confirmar essa hipótese.

O terceiro grupo das fibrin(ogen)ases do veneno são aquelas com especificidade pela cadeia  $\delta$  do fibrinogênio. Esse tipo de fibrinogenase é bastante rara, tendo sido purificada a partir do veneno de *C. atrox* (toxina hemorrágica) com peso molecular de 64.000 (NIKAI et al., 1984)

As serpentes do gênero *Bothrops* habitam preferencialmente ambientes úmidos como matas, áreas cultivadas e locais de proliferação de roedores. Possuem hábitos noturnos, são muito agressivas e quando se sentem ameaçadas atacam em silêncio.

HOGUE (1965) descreveu a espécie *Bothrops moojeni*, de nome popular caissaca, com distribuição geográfica restrita às áreas de formação aberta, estendendo-se do Brasil central até o sul do Estado do Paraná (HOGUE e ROMANO, 1972; CAMPBELL e LAMAR, 1989).

Embora sejam raros os acidentes fatais por serpentes do gênero *Bothrops*, os casos se agravam devido à intensidade dos efeitos locais.

Em nossa região, entre 1984 a 1991, a maioria dos acidentes ofídicos confirmados e registrados pelo Hospital das Clínicas de Uberlândia (UFU) foi por *Bothrops moojeni* (NISHIOKA e SILVEIRA, 1992). Este foi o principal motivo que nos levou a estudar a peçonha desta serpente.

A peçonha de *Bothrops moojeni* tem sido muito estudada por diversos pesquisadores. ASSAKURA et al. (1985), descrevendo o isolamento de uma metaloproteinase desta serpente (protease A de *moojeni*), mostraram por eletroforese que esse veneno apresenta uma quantidade significativa de



proteínas básicas. Também foram isolados do mesmo veneno uma enzima coagulante denominada batroxobina (STOCKER e BARLOW, 1976), uma fosfolipase A2 ácida (REICHL et al. 1989), uma fosfolipase básica (MOURA - DA-SILVA, 1991), duas miotoxinas básicas de baixo peso molecular (LOMONTE et al., 1990), uma metaloproteinase básica, ativa sobre a caseína e duas serino proteases (SERRANO et al., 1993a, 1993b). Muito recentemente duas miotoxinas básicas, também de baixo peso, semelhante àquelas isoladas por LOMONTE et al. (1990). Uma delas, denominada de M7 foi amplamente estudada (seqüência aminoterminal, cristalografia e estudo da transição nativo e desenovelado) (SOARES, 1997).

A principal característica do veneno de *Bothrops moojeni* é a sua alta atividade proteolítica, responsável pela maioria dos efeitos locais e sistêmicos observados durante o envenenamento por essa serpente.

O presente trabalho teve como objetivo purificar e caracterizar parcialmente uma enzima proteolítica presente no veneno de *Bothrops moojeni*

2 - MATERIAIS

## 2.1. Veneno bruto

O veneno bruto de *Bothrops moojeni* cedido pelo biólogo Luiz Henrique A. Pedrosa (FMRP), foi dessecado a vácuo a temperatura ambiente e conservado a -20 °C

## 2.2. Eletroforese e cromatografia

- Acrilamida, Bis-acrilamida (N,N'-metilenobisacrilamida), TEMED (N,N,N',N'-tetrametiletilenodiamino), SDS (dodecil sulfato de sódio), Coomassie Brilliant Blue R-250, Padrões de peso molecular (LMW), EDTA (ácido etilenodiaminotetracético), Soralbumina bovina, Azul de bromofenol,  $\beta$ -mercaptoetanol, Persulfato de amônio, Desoxicolato de Sódio (Sigma Chem. Co)

- CM Sepharose fast flow (Pharmacia, Suécia)
- Soro anti-botrópico (Instituto Butantan)
- Buffalyet pH 8,5 (Pierce)

## 2.3. Padrões para determinação de Peso Molecular

fosforilase b (97.000), soroalbumina bovina (P.M. 67.000), sorovoalbumina (P.M. 43.000), anidrase carbônica (P.M. 30.000), inibidor de tripsina (20,100) e  $\alpha$ -lactoalbumina (P.M. 14.400) (Sigma Chem. Co)

#### **2.4. Determinação do aminoácido N-terminal**

- Dansyl-cloreto (1- dimetilaminonaftaleno 5-sulfonil cloreto), Dansyl aminoácidos padrões (Sigma Chem. Co;)
- Fenil isotiocianato (PITC), Pierce;
- Ácido trifluoracético, Merck

#### **2.5. Determinação da composição em aminoácidos**

- Ácido clorídrico 5 N destilado até P.E. constante (106-107 °C) em aparelhagem de pyrex;
- Peróxido de Hidrogênio a 120 V (Carlo Erba)
- Ácido fórmico a 98 %, (Merck)

#### **2.6. Determinação das atividades enzimáticas**

- O plasma humano foi gentilmente doado pelo Hemominas-Núcleo Regional de Uberlândia
- Animais experimentais (camundongos albinos da raça Swiss) foram gentilmente doados pelo Instituto Vallée e pela Pentapharm do Brasil e mantidos no laboratório de Bioquímica da UFU.

Todos os demais reagentes usados eram de grau analítico.

### 3 - MÉTODOS

### **3.1 Fracionamento do veneno bruto de *Bothrops moojeni*:**

### **3.2 Cromatografia de troca iônica em gel de CM Sepharose fast flow**

#### **3.2.1 Reciclagem da resina:**

À princípio a resina foi reciclada segundo a indicação do fabricante. Após, utilizando-se um sistema à vácuo em funil de placa sinterizada, a resina foi reciclada em 500 ml de NaOH 0,5 N, abaixando-se o pH da mesma para 7,0 com exaustivas lavagens com água destilada; repetiu-se a operação com 500 ml de CH<sub>3</sub>COOH 1,0 N, ressuspensando o pH para 7,0 da mesma forma anterior. Finalmente a resina foi suspensa em tampão Tris-HCl 0,05 M pH=7,0 e KCl 0,1 M.

#### **3.2.2 Fracionamento em gel de CM Sepharose fast flow:**

Cerca de 150 mg de veneno bruto de *Bothrops moojeni* foram dissolvidos em 3,0 ml de tampão Tris-HCl 0,05 M pH=7,0 e KCl 0,1 M, centrifugado a 3.000 rpm por 10 min em temperatura ambiente e aplicados a uma coluna de CM Sepharose fast flow (1,5 X 30 cm) equilibrada com o mesmo tampão. A amostra foi eluída com um gradiente convexo de concentração de tampão KCl 0,1 M a 0,45 M (utilizando de uma câmara de mistura com um volume de 150 ml), e frações de 3 ml foram coletadas, num fluxo de 20 ml/hora, num coletor de frações BIO RAD. A absorbância de cada fração coletada foi lida em 280 nm, num espectrofotômetro SPECKOL.

### 3.2.3 Determinação quantitativa de proteínas:

As dosagens protéicas, em solução contendo 0,1 a 2,0 mg de proteínas, foram realizadas pelo método do microbiureto, conforme descrito por ITZHAKI e GILL (1964).

A reta 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 GEIDUSCHC, 1953).

### 3.3 Ensaio Enzimáticos:

#### 3.3.1 Atividade coagulante sobre o fibrinogênio

A atividade coagulante foi determinada pelo método descrito por WARE e SEEGERS (1949), modificado como descrito:

Amostras do veneno total ou das frações foram diluídas em tampão Tris-HCl 0,1 M pH 7,4 de modo a se obter um tempo de coagulação entre 13 e 17 segundos, por haver, neste intervalo de tempo, uma relação linear entre os inversos dos tempos de coagulação e respectivas concentrações protéicas.

A atividade coagulante foi determinada medindo-se o tempo de coagulação ao primeiro sinal de formação da rede de fibrina, após adicionar 0,4 ml da solução do veneno ou frações a 0,1 ml de solução de fibrinogênio bovino a 0,1 % (m/v, em termos de proteínas coaguláveis) em tampão Tris-HCl 0,1 M pH 7,4, contendo  $\text{CaCl}_2$  1,0 mM, a 37 °C.

O número de unidades de coagulação foi determinado através da curva padrão obtida com a trombina purificada de plasma bovino, nas mesmas condições do ensaio.

### **3.3.2 Atividade coagulante sobre o plasma humano.**

Amostras contendo 20 $\mu$ g de proteínas foram diluídas para um volume final de 50  $\mu$ l de salina e aplicadas em 200 $\mu$ l de plasma humano incubados a 37°C.

A atividade é caracterizada pelo imediato aparecimento da rede de fibrina em comparação com o tempo de coagulação do controle contendo cloreto de cálcio 0,2 M. Para verificar a influência de agentes inibidores sobre a atividade coagulante, a fração MOO3 foi pré-incubada por 30 minutos com EDTA 10 mM, leupeptina 1 mM ou  $\beta$ -mercaptoetanol 10 mM

### **3.3.3 Atividade fosfolipásica (PLA<sub>2</sub>):**

Foi realizado segundo o método descrito por DE HAAS e col. (1968). Como substrato foi utilizado uma emulsão aquosa de gema de ovo ( uma gema para 50 ml de solução ) em presença de desoxicolato de sódio e íons Ca<sup>++</sup>. Para o ensaio, 10 ml da emulsão acima foram diluídos para 30 ml, sendo a concentração final de desoxicolato de sódio e CaCl<sub>2</sub> 2,7 x 10<sup>-3</sup> M e 6,0 x 10<sup>-3</sup> M, respectivamente. Os ácidos graxos liberados enzimaticamente foram titulados com solução padrão de NaOH 0.0935 N em pH=8,0 e temperatura ambiente (28 °C). A atividade fosfolipásica foi expressa em microequivalentes de base consumida por minuto e a atividade específica pelo número de



microequivalentes de base consumida por minuto, por miligrama de proteína. Em cada ensaio foram utilizados 20µg de proteínas.

### **3.3.4 Atividade hemorrágica:**

Esta atividade foi determinada segundo a técnica descrita por NIKAI et al. (1984). As amostras com cerca de 20,0 µg de proteínas eram injetadas num volume de 0,1 ml de salina por via subcutânea no dorso de camundongos machos de 20,0 g ligeiramente anestesiados com éter. Após 5 horas, os animais eram sacrificados, as peles removidas e era observada a presença de halos hemorrágicos na face interna da pele.

### **3.3.5 Atividade Esterásica sobre o TAME**

A atividade esterásica foi determinada sobre o TAME (hidrogenocloreto de p-toluenosulfonil-L-arginina metil éster) segundo o método descrito por EHREMPREIS e SCHERAGA (1957). A titulação potenciométrica foi feita pelo método descontínuo com solução de KOH 0.0448 N, e não com NaOH em vista da inibição da atividade esterásica pelo íon  $\text{Na}^+$  (ROSSI et al., 1972). Uma unidade de TAME foi definida como a quantidade de enzima que libera 0.1 µmol de ácido em 10 minutos, a 37 °C, de uma solução a 0,01M de TAME em pH 8,0, contendo KCl 0,15 M.

### **3.3.6 Atividade amidásica sobre o DL-BAPNA**

Esta atividade foi realizada conforme descrito por ERLANGER et al. (1961), monitorizando o aumento da absorbância a 410 nm. Uma unidade de

atividade amidolítica foi definida como a quantidade de enzima que hidrolisa 1 mM de p-nitroanilida de benzoil-arginina (DL-BAPNA) por minuto a 37 °C em Tris- HCl 0,1 M pH 8,0.

### **3.3.7 Atividade proteolítica sobre a azocaseína e sobre a azoalbumina**

Esta atividade foi realizada segundo a técnica descrita por MARKLAND et al (1988). Cerca de 100 µg de amostra foram adicionados a 200 µl de Tris-HCl 50 mM pH = 7,4 em NaCl 150 mM e incubada por 3 minutos com 100µl de uma solução de azocaseína ou azoalbumina (1 mg/ml). A reação foi interrompida pela adição de 100 µl de ácido acético 50 % e as absorbância das amostras foram lidas a 405 nm. Uma unidade de atividade azoproteolítica corresponde a um acréscimo de 0,01 em absorbância 405 nm nas condições de reação acima definidas.

### **3.3.8 Teste de degradação do fibrinogênio bovino e da caseína**

Foi realizado segundo EDGAR e PRENTICE (1973), com algumas modificações. Em 50 µl de uma solução de fibrinogênio bovino (1 mg/ml H<sub>2</sub>O destilada) foram adicionados 5 µg de proteínas e a solução depois incubada por até 2 horas a 37° C. O coágulo foi dissolvido em 25 µl de tampão Tris HCl 0,06 M, pH 6,8, contendo glicerol a 10 % (v/v), β-mercaptoetanol a 10 % (v/v), SDS a 2 % (w/v) e azul de bromofenol 0,05 %. Em seguida as amostras foram submetidas a eletroforese em gel de poliácridamida a 16% com SDS como agente desnaturante

A influência de agentes inibidores de proteases foi verificada quando a fração MOO3 foi pré-incubada por 30 minutos com EDTA 10 mM, leupeptina 1 mM ou  $\beta$ -mercaptoetanol 10 mM.

Para o teste de degradação da caseína as condições utilizadas foram as mesmas citadas acima, porém o tempo de incubação da caseína com a proteína foi de até 24 horas.

### **3.4. Características Químicas**

#### **3.4.1 Análise do conteúdo de carboidratos neutros**

Foi utilizado o método do fenol-ácido sulfúrico (DUBOIS et al., 1956) para a determinação de açúcares neutros da fração proteolítica isolada.

Soluções padrões de glicose contendo de 5 a 40  $\mu$ g por ml de solução foram misturadas com 25  $\mu$ l de fenol a 80% (v/v) e 2,5 ml de ácido sulfúrico concentrado ( $d=1,84$  g/cm<sup>3</sup>, 95 - 97%). Após 30 minutos a 25° C, as absorvâncias das soluções foram lidas a 490 nm e a reta padrão determinada.

As amostras foram também dissolvidas na solução fenol-sufúrica em concentrações diferentes e em duplicatas.

#### **3.4.2 Eletroforese em gel de poliacrilamida sem agentes desnaturantes para proteínas básicas.**

A eletroforese em placa de gel de poliacrilamida sem SDS foi realizada segundo a técnica descrita por REISFELD (1962) para proteínas básicas, utilizando-se, porém, somente o gel de separação a 10 % (m,v) em acrilamida, mantendo-se a relação acrilamida : bis-acrilamida em 60:0,4.

O tempo de eletroforese foi determinado pela migração do indicador fucsina básica, preparado em solução aquosa saturada de sacarose e o tampão usado foi  $\beta$ -alanina/ ácido acético glacial 0,035 M pH 4,3.

Amostras de proteínas, contendo de 5 a 50  $\mu$ g, foram dissolvidas em água com glicerol a 10 % e aplicadas no gel polimerizado num volume de 5 a 30  $\mu$ l aproximadamente e submetidas a uma corrente constante de 20 mA obtida de uma fonte de eletroforese POWER SUPPLY da Pharmacia. Foi realizada uma pré-corrída de 30 minutos antes da aplicação da amostra.

A eletroforese foi realizada à temperatura ambiente, e após a corrida, o gel foi cuidadosamente retirado da placa, mergulhado em água e em seguida corado com Coomassie Blue R-250 (0,2 % em água: metanol 1:1 v/v), durante 30 minutos. O descoramento foi feito com uma solução de ácido acético a 7% (v/v).

### **3.4.3 Eletroforese em gel de poliacrilamida com agentes desnaturantes para estimativa do Peso Molecular**

Foi realizada eletroforese com agente desnaturante (SDS) a 16%, segundo a técnica descrita por LAEMMLI (1970) para a determinação do peso molecular. Foi utilizado um gel de empilhamento a 5 % pH 6,8, contendo 0,125 M de Tris-HCl (pH 6,8) e 0,1 % de SDS e um gel de separação a 16 % pH 8,8 e 0,1 % de SDS, mantendo a relação acrilamida:bis-acrilamida de 30:0,8.

Amostras contendo de 5 a 50  $\mu$ g de proteínas foram dissolvidas em tampão Tris-HCl 0,0625 M pH 6,8; 10 % (m/v)  $\beta$ -mercaptoetanol, 10 % (v/v) de glicerol; 0,2 % de SDS e 0,001 % de azul de bromofenol como corante. As proteínas foram completamente dissociadas por imersão da amostra por um a

cinco minutos em água fervente. Foram aplicados no gel cerca de 5 a 30  $\mu$ l de amostra, sendo também aplicados padrões de peso molecular dissolvidos no mesmo tampão. Os padrões de peso molecular utilizados foram: fosforilase b (97.000), soroalbumina bovina (P.M. 67.000), ovoalbumina (P.M. 43.000), anidrase carbônica (P.M. 30.000), inibidor de tripsina (20,100) e  $\alpha$ -lactoalbumina (P.M. 14.400), numa concentração de 2 mg/ml.

O tampão do eletrodo continha Tris 0,025 M, Glicina 0,192 M e SDS 0,1 % (m/v) em pH 8,3.

A eletroforese foi realizada com uma corrente constante de 20 mA até o indicador azul de bromofenol alcançar o final do gel (cerca de 100 minutos). As proteínas foram coradas por 30 minutos numa solução de 0,2 % (m/v) de Coomassie Brilliant Blue R-250 em água : metanol na proporção de 1:1. O gel foi descorado numa solução de ácido acético a 7 % (v/v).

A distância de migração de cada padrão foi determinada em centímetros e a curva padrão para a determinação do peso molecular foi traçada relacionando os logaritmos dos valores de peso molecular dos padrões com as distâncias de migração.

#### **3.4.4 Identificação do resíduo aminoterminal**

O resíduo N-terminal foi determinado pelo método do dansil (p-dimetilamino naftaleno 5- sulfonil cloreto: DNS-Cl) descrito por GRAY (1972).

Ao tubo de hidrólise contendo cerca de 2 nmoles da amostra seca, foram adicionados 10  $\mu$ l de uma solução de  $\text{NaHCO}_3$  0,2 M. Após a secagem em dessecador a vácuo contendo  $\text{P}_2\text{O}_5$ , a amostra foi tratada com 10  $\mu$ l de água destilada e 10  $\mu$ l de uma solução de DNS-Cl (2,5 mg/ml de acetona). O tubo

foi selado com parafilme, incubado por 1 hora a 45 °C e a amostra novamente seca em dessecador à vácuo, contendo P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>. A seguir, foram adicionados 50 µl de HCl 5,3 N destilado, o tubo foi selado e incubado a 110 °C por 14-18 horas, sendo depois aberto e a amostra seca à vácuo sobre NaOH. O dansil-aminoácido obtido foi identificado por cromatografia em placas de poliamida, como segue:

#### Cromatografia em camada delgada em placa de poliamida

A placa de poliamida utilizada possui dimensões de 7,5 X 7,5 cm. A amostra seca foi suspensa em 10 µl de etanol a 95 %, centrifugada e pipetada na origem de ambos os lados da placa de poliamida. Em um dos lados da placa foram também aplicados 2 µl de uma solução padrão de dansil aminoácidos (1 nmol/ µl).

A cromatografia desenvolveu-se em duas direções, em cinco solventes, sendo que no solvente I por 20 minutos, no solvente II por 15 minutos, após foi examinada sob luz U.V. (360 nm), no solvente III por 15 minutos, sendo então novamente examinada sob luz U.V. Para separação de DNS-His, DNS-Lys e DNS-Arg, corria-se o solvente IV por 20 minutos e o V por 30 minutos.

Os solventes utilizados foram: I- H<sub>2</sub>O: ácido fórmico (200:3 v/v); II- bezeno: ácido acético (9:1 v/v); III- acetato de etila: metanol: ácido acético (20:1:1 v/v); IV- ácido acético: piridina: H<sub>2</sub>O etanol (16:9:1000:375, v/v) e V- Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 0.05M: etanol (3:1, v/v).

Após o uso, as placas de poliamida foram lavadas com solução de acetona: ácido fórmico 90 % (9:1, v/v), durante 12 horas ou mais.

### **3.4.5 Focalização Isoelétrica**

A eletrofocalização da fração MOO3 purificada foi realizada segundo método descrito por VESTERBERG (1972) e modificado como descrito a seguir. Os experimentos foram realizados no Departamento de Física e Química da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - USP, com a colaboração do pós-graduando Andreimar Martins Soares e supervisão da Profa. Dra. Eliane C. A. Braga.

#### **3.4.5.1 Preparação do gel:**

O gel foi preparado a 5 % em acrilamida bis-acrilamida (0,8 : 30), contendo 10 % (m/v) de sacarose, 1 % (v/v) de anfólitos, 0,15 % (v/v) de TEMED e 0,070 % de persulfato de amônio. O gel foi polimerizado em placa de vidro de 12 X 14 cm, com espessura de 0,14 cm. A face interna da placa foi coberta com uma folha de poliéster (Retrophane) aderida às mesmas por meio de água destilada. A polimerização do gel foi feita sempre no dia anterior à eletroforese

#### **3.4.5.2 Aplicação da Amostra e Focalização Isoelétrica**

O gel foi colocado sobre uma placa refrigerada ligada a um banho termostático a 4 °C. Cinco tiras de papel Whatman número 3 sobrepostas foram utilizadas para contactar o gel e os eletrodos, sendo o cátodo embebido em uma solução de NaOH 1 M e o ânodo em ácido fosfórico 1 M.

A fonte de alta voltagem foi ajustada para valores máximos de 200 V, 30 mA e então realizada uma pré-focalização por 30 minutos.

Pedaços de papel de filtro da LKB de 1,0 x 0,5 cm foram embebidos nas amostras e colocados sobre o gel; sendo retirados após 60 minutos de Focalização em 300 V e 30 mA. A focalização prosseguiu por mais de 2 horas a 450 V e 20 mA, e por 1 hora a 900 V e 20 a 30 mA e por mais 30 minutos em 1200 V e 5 a 2 mA

#### **3.4.5.3 Detecção das proteínas e determinação do gradiente de pH**

Após a focalização isoeétrica, foram desprezados 0,5 cm das laterais do gel, sendo então seccionadas tiras de 1,0 X 2,0 cm do mesmo e colocadas em tubos de ensaio contendo 0,2 ml de água "millipore", para leitura do pH após 2 horas em repouso. Essas tiras foram cortadas nas laterais do gel intercaladamente, de forma a obter valores médios de pH para cada 0,5 cm do gel.

O restante do gel contendo as amostras foi então colocado em uma solução de ácido tricloroacético a 10 % (m/v) e metanol a 50 % (m/v) por 15 minutos, lavado com água destilada e corado por 2 horas em uma solução de Coomassie Brilliant Blue R-250 0,2 % em água: metanol, 1: 1. O descoramento foi feito com uma solução de metanol; ácido acético: água, 3: 1: 9 (v/v/v).

#### **3.4.6 Determinação da composição em aminoácidos**

Para a análise da composição em aminoácidos cerca de 6 nmoles da fração MOO3 foram colocados em tubos de pyrex de 5 x 0,4 cm, próprios para hidrólise e secados a vácuo.



### **3.4.6.1 Hidrólise ácida total com HCl**

A cada tubo foram adicionados 100 µl de HCl 5,3 N destilado. Os tubos foram selados a vácuo e as amostras hidrolisadas por 30 horas a 110 °C. Após a hidrólise, os tubos foram abertos e dessecados a vácuo sobre o NaOH. As amostras foram ressuspensas em tampão citrato de sódio 0,2 M pH 2,2 contendo 15 % de glicerol e centrifugadas; alíquotas dos hidrolisados foram cromatografadas, segundo SPACKMANN et al. (1958) modificado no Centro de Química de Proteína (CQP) da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP, sob responsabilidade do Professor Dr. Lewis J. Greene.

A concentração molar de cada aminoácido no hidrolisado foi determinada pela comparação das área dos picos com as áreas dos picos dos aminoácidos correspondentes num cromatograma obtido a partir de uma mistura padrão contendo 5 nM de cada aminoácido. A composição em aminoácidos da fração MOO3 foi calculada através das relações molares dos resíduos encontrados no hidrolisado

### **3.4.6.2 Determinação dos resíduos de meia cistina. Oxidação com ácido perfórmico**

#### **3.4.6.2.1 Preparação do ácido perfórmico**

O ácido perfórmico foi preparado adicionando-se 0,1 ml de peróxido de hidrogênio a 120 V a 0,9 ml de ácido fórmico a 98 %. A solução obtida permaneceu em repouso a temperatura ambiente por 1 hora e foi a seguir resfriada a 0 °C por 15 minutos

### 3.4.6.2.2 Oxidação e Hidrólise

Aproximadamente 1 mg de proteína seca foi incubada com 0,5 ml de solução de ácido perfômico durante 5 horas a 0°C. A reação foi interrompida com adição de 0,5 ml de água destilada e liofilização. A amostra foi então hidrolisada com 100 µl de HCl 5,3 N a 110 °C por 30 horas a vácuo. Após a hidrólise, a amostra foi dessecada a vácuo sobre NaOH e analisada.

### 3.4.7 Imunoeletroforese

Para a verificação da pureza da fração MOO3 realizou-se a técnica de imunoeletroforese descrita por CAMPBELL et al. (1970). As lâminas de microscopia foram recobertas com uma película de ágar a 2,5 % e, em seguida, adicionou-se 3 ml de ágar a 1,25 %, formando uma camada de 2 a 4 mm de espessura. Cortou-se dois orifício no ágar e foi colocado nos mesmos amostras contendo de 5 a 50 µg da fração MOO3.

As lâminas foram colocadas em cubas de eletroforese contendo tampão veronal pH 8,2 e força iônica 0,05 e, após estabelecer conexão entre as lâminas e o tampão, aplicou-se uma corrente elétrica constante de 5 mA por lâmina durante 80 minutos. Após a eletroforese, cortou-se uma canaleta no centro da camada de ágar, em sentido paralelo ao eixo de migração. Nesta canaleta colocou-se o soro anti-botrópico procedente do Instituto Butantan, São Paulo.

As lâminas foram deixadas em câmara úmida à temperatura ambiente por 48 horas para o desenvolvimento de arcos de precipitação. Depois desse período, as lâminas foram lavadas por 24 horas com NaCl 0,3 M e em seguida com NaCl 0,15 M, também por 24 horas.

As lâminas foram secadas em papel de filtro e coradas com negro de amido 0,1 % em solução de metanol: ácido acético (9:1 v/v) por 10 minutos, lavadas em solução de ácido acético a 2 % e secadas em estufas a 45° C.

## 4 - RESULTADOS

## 4.1 Purificação e Atividades Enzimáticas

### 4.1.1 Cromatografia de troca iônica em gel CM Sepharose fast flow

O fracionamento do veneno total de *Bothrops moojeni* foi realizado em um único passo de purificação em gel de CM Sepharose fast flow em gradiente convexo de concentração em tampão Tris HCl 0,05 M (KCl 0,1 a 0,45 M) pH 7,0 (item 3.2.2). O perfil cromatográfico é mostrado na figura 02. O veneno total foi resolvido em sete picos principais designados de MOO1 a MOO7. Nesta mesma figura podem ser observadas as atividades coagulante sobre o plasma humano (item 3.3.2) e proteolítica sobre a azocaseína e sobre a azoalbumina (item 3.3.7). A fração MOO4 apresentou a maior atividade coagulante sobre o plasma (tabela 03), enquanto que a fração MOO2 apresentou uma maior ação proteolítica sobre a azocaseína e sobre a azoalbumina (tabela 02). A atividade fosfolipásica A2, sobre a lecitina da gema de ovo, ficou restrita somente à fração MOO1 (resultados não apresentados).

A fração MOO3 não apresentou nenhuma atividade fosfolipásica ou hemorrágica com até 20 µg de proteína ou atividade amidásica sobre o DL-BAPNA, com até 100 µg.

A fração MOO3 apresentou somente traços de atividade coagulante sobre o plasma humano e fibrinogênio bovino e uma elevada atividade proteolítica sobre o fibrinogênio e caseína

#### 4.1.2 Recuperação Protéica

Na tabela 02 estão representados a recuperação de proteínas por absorvância em 280 nm e dosagem pelo microbiureto das frações obtidas do veneno de *Bothrops moojeni* cromatografadas em gel de CM Sepharose fast flow. Como pode ser observado nesta tabela a recuperação foi de aproximadamente 65 % em relação ao veneno total, sendo que a fração MOO3 corresponde a aproximadamente 1,4 % deste veneno. Também pode ser observado nesta tabela a atividade esterásica específica sobre o TAME, sendo a fração MOO4 a de maior atividade específica, enquanto a fração MOO2 apresentou maior atividade proteolítica específica sobre a azocaseína e azoalbumina, 352 U/mg e 466 U/mg, respectivamente. A fração MOO3 apresentou uma baixa atividade esterásica específica sobre o TAME (29,66 U/mg) e não mostrou nenhum efeito sobre os substratos cromogênicos.

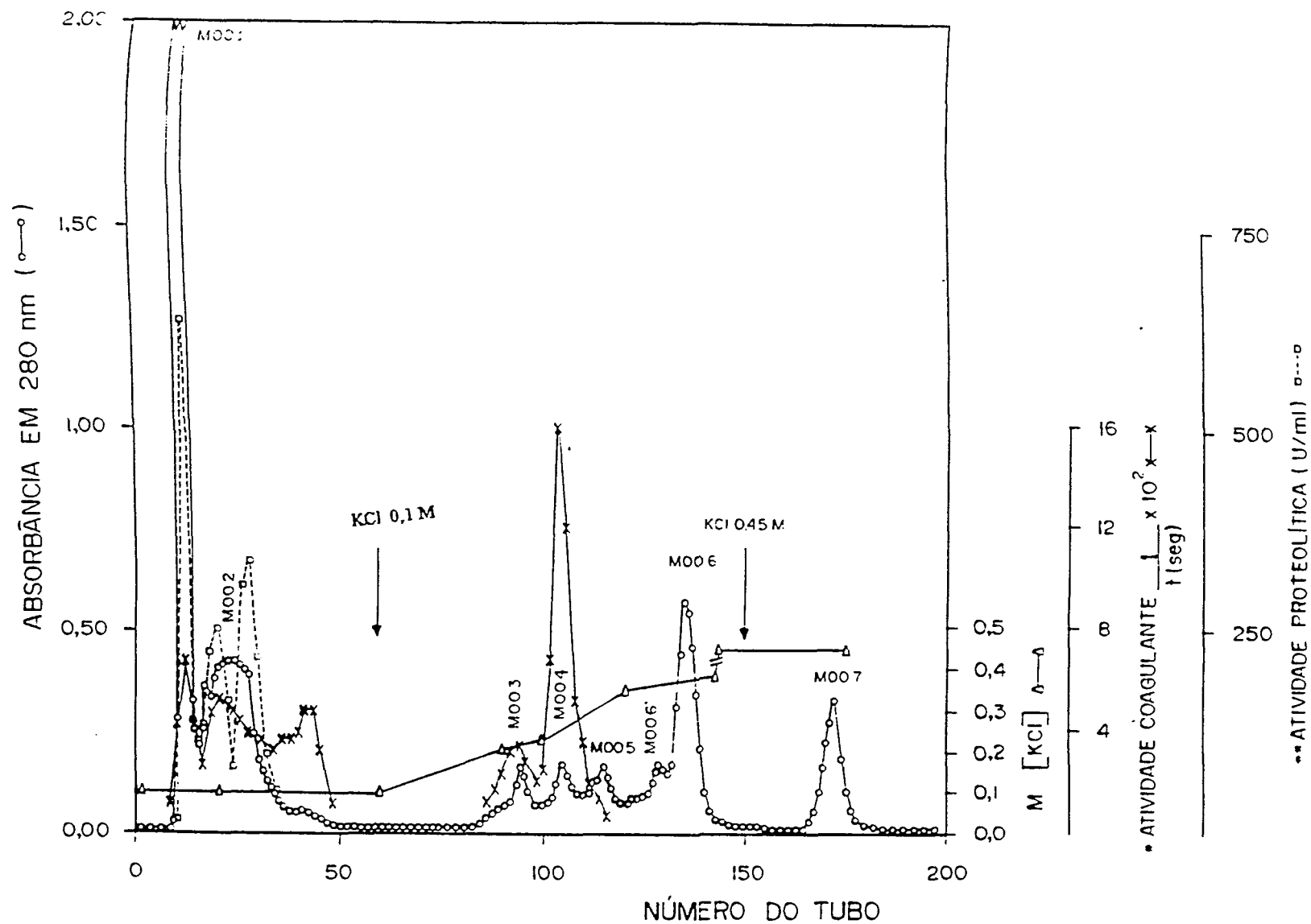


Figura 02. Cromatografia de 150 mg de veneno bruto de *B. moojeni* em coluna de CM Sepharose fast flow (30 x 1,5 cm), equilibrada em tampão Tris-HCl 0,05 M pH 7,0 contendo KCl 0,1 M. A coluna foi lavada com 180 ml de tampão de equilíbrio e posteriormente foi estabelecido um gradiente convexo de concentração de KCl (0,1 a 0,45 M) KCl, num fluxo constante de 20 ml/hora à temperatura ambiente e frações de 3,0 ml foram coletadas

\* Atividade coagulante sobre o plasma humano.

\*\* Atividade proteolítica sobre a azocaseína

**Tabela 02** - Atividades enzimáticas específicas e os rendimentos das frações do *veneno de B. moojeni* obtidas por cromatografia em gel de CM Sepharose fast flow.

Frações cromatográficas de troca iônica em CM Sepharose fast flow	Atividade esterásica sobre o TAME				Atividade proteolítica sobre a azocaseína		Atividade proteolítica sobre a azoalbumina	
	A280nm	% A280 nm	Proteína	Recup.	Atividade. Específica.	Atividade. Específica.	Atividade Específica.	
			Total(mg)	(%)	(U/mg)	(U/mg)	(U/mg)	
V. B.	150,8	100,0	60,0	100,0	62	304	364	
MOO1	35,53	24,75	13,06	21,76	45	318	416	
MOO2	39,56	26,11	13,48	22,47	18,33	352	466	
MOO3	2,16	1,42	0,81	1,35	29,66	0,0	0,0	
MOO4	2,8	1,84	0,88	1,47	118	0,0	0,0	
MOO5	3,18	2,05	1,11	1,85	45,33	0,0	0,0	
MOO6'	1,8	1,20	0,21	0,35	75,33	0,0	0,0	
MOO6	9,83	6,48	6,21	10,35	41,33	0,0	0,0	
MOO7	4,74	3,13	2,98	4,97	29,34	0,0	0,0	
Total	99,6	66,04	38,74	62,93				



A figura 03 mostra o resultado da eletroforese em gel de poliacrilamida a 16 % com agentes desnaturantes das frações obtidas do veneno bruto de *Bothrops moojeni* submetido a cromatografia de troca iônica em gel de CM Sepharose fast flow (Item 3.4.3).

Estes resultados mostram que as frações MOO1 (linha 3), MOO3 (linha 5) e MOO4 (linha 6), responsáveis pela quase totalidade da atividade coagulante, apresentam componentes majoritários totalmente distintos. A fração MOO2 (Linha 4) que também apresentou atividade coagulante não pôde ser analisada, pois se encontra muito heterogênea

A Figura 04 mostra o alto grau de pureza da fração MOO3, cerca de 92 %, quando submetida a análise de densitometria

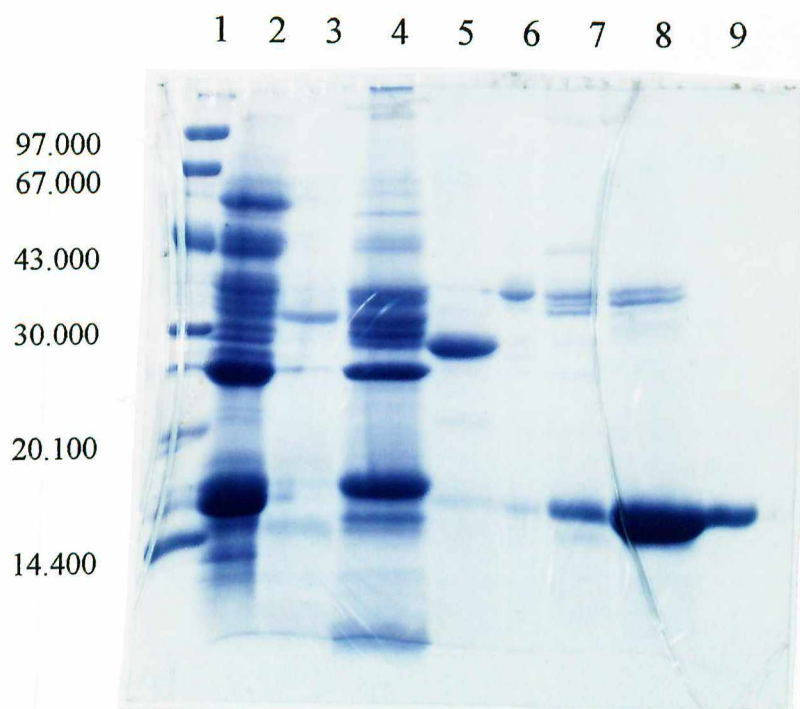


Figura 03. Eletroforese em gel de poliacrilamida com agentes desnaturantes a 16 %. Tampão Tris-glicina pH 8,3. Tempo de corrida: 100 minutos a 20 mA constante. Corante: coomassie blue G-250 0,2 % em água:metanol, 1:1 (v/v) corado por 30 minutos. Descorante: ácido acético a 7 % (v/v)

1- Padrão LWM fosforilase b (97.000), soroalbumina bovina (67.000), ovoalbumina (P.M. 43.000), anidrase carbônica (30.000), inibidor de tripsina (20.100) e  $\alpha$ -lactoalbumina (14.400); 2- VB *Bothrops moojeni*; 3- MOO1; 4- MOO2; 5- MOO3; 6- MOO4; 7- MOO5; 8- MOO6; 9- MOO7

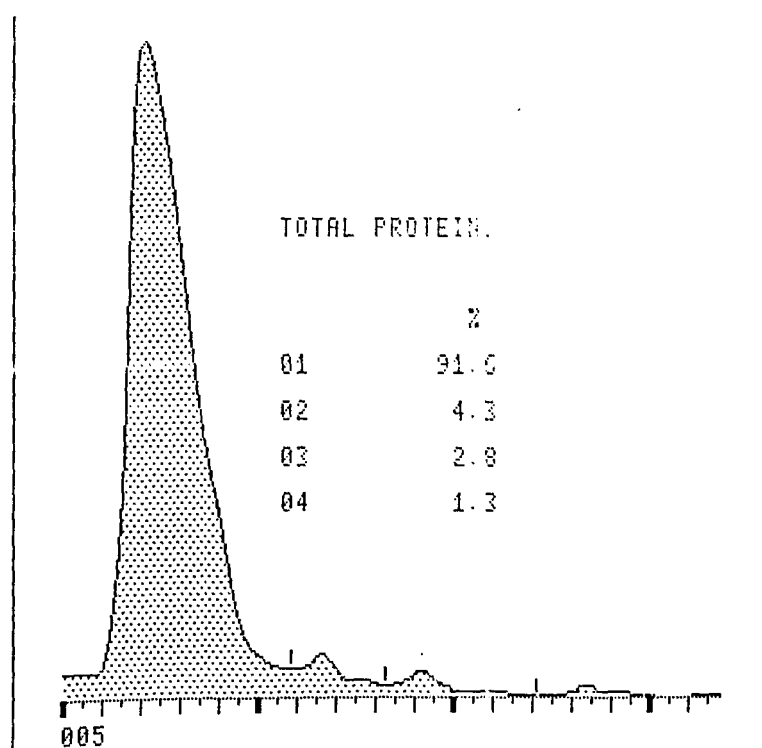


Figura 04. Densitometria da fração MOO3, purificada do veneno de *B. moojeni*, por eletroforese em gel de poliacrilamida com agentes desnaturantes a 16 %.

A tabela 03 mostra a atividade coagulante sobre plasma humano do veneno bruto de *Bothrops moojeni* comparado com as frações MOO3 e MOO4. A fração MOO4 apresentou a maior atividade coagulante, enquanto que a fração MOO3 apresentou uma atividade muito baixa (cerca de 4 vezes menor que o veneno bruto).

Tabela03. Atividade coagulante, sobre o plasma humano, do veneno bruto de *Bothrops moojeni* e das frações MOO3 e MOO4.

Enzima	Tempo de coagulação (s)
Veneno bruto	23
MOO3	91
MOO4	6

Estes resultados se referem à média de 3 ensaios. Cada ensaio foi realizado com 20 µg de proteína.

#### 4.1.3. Efeito dos agentes inibidores da atividade coagulante da fração MOO3 sobre o plasma humano

A tabela 04 mostra o efeito de agentes inibidores sobre a atividade coagulante da fração MOO3 sobre o plasma humano. O EDTA 10 mM foi mais efetivo na inibição da atividade coagulante sobre o plasma humano (83,62 %), enquanto que o β-mercaptoetanol menos efetivo (41 %), nas concentrações utilizadas por nós. A leupeptina, mesmo em concentrações 10 vezes menor, apresentou uma alta taxa de inibição (81,27 %) da atividade coagulante.

Tabela 04. Efeito dos inibidores da atividade coagulante sobre o plasma humano induzida pela fração MOO3.

Enzima	Inibidor	concentração	Recup da Atividade. coagulante (%)
MOO3			100,00
	EDTA	10 mM	16,38
	Leupeptina	1,0 mM	18,73
	$\beta$ -mercaptoetanol	10 mM	59,00

\* O controle foi realizado com a fração MOO3 na ausência de inibidores, conforme descrito no item 3.3.2. Estes resultados se referem à média de 3 ensaios. Cada ensaio foi realizado com 20 $\mu$ g da fração MOO3

#### 4.1.4 Atividade proteolítica da fração MOO3 purificada do veneno total de *Bothrops moojeni*

##### Fibrinogênio

No teste de degradação do fibrinogênio (item 3.3.8), a cadeia  $\alpha$  é degradada mais rapidamente que a cadeia  $\beta$ , enquanto que a cadeia  $\delta$  permanece inalterada, o que foi claramente observado pela eletroforese em gel de poliacrilamida com agentes desnaturantes a 16 % (figura 05), sendo que após 120 minutos a cadeia  $\alpha$  foi quase que totalmente digerida (linha 7).

A influência de alguns agentes inibidores da atividade proteolítica (EDTA,  $\beta$ -mercaptoetanol e leupeptina) pode ser observada nas figuras 05 (linhas 8 e 9) e 06 (linha 2) pela análise da digestão dos coágulos em eletroforese em gel de poliacrilamida com agentes desnaturantes a 16 %. O  $\beta$ -mercaptoetanol e a leupeptina inibiram completamente a atividade proteolítica sobre o fibrinogênio bovino, enquanto que o EDTA parece inibir parcialmente esta atividade

##### Caseína

Na figura 07 observamos a hidrólise da caseína pela fração MOO3 em eletroforese em gel de poliacrilamida com agentes desnaturantes a 16 %, por tempo que varia de 1 hora a 24 horas. Observa-se que a caseína está quase totalmente hidrolisada após 24 horas. Nesta figura podemos observar também que a segunda banda principal da caseína quase desaparece após uma hora (linha 3) e que ocorre formação de subprodutos que também sofrem a ação proteolítica (tempo-dependente) pela fração MOO3.

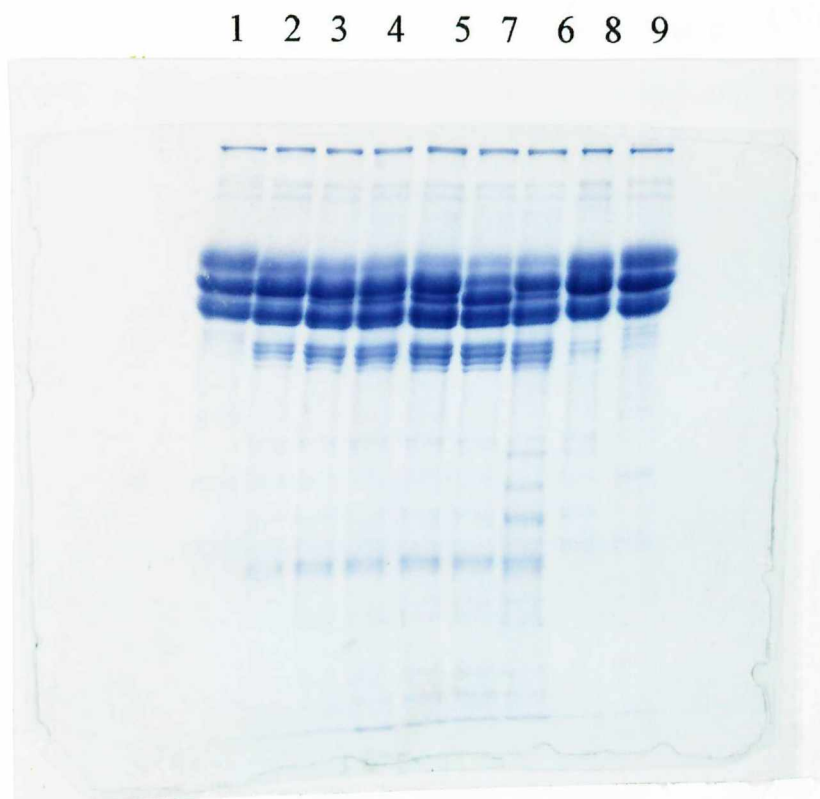


Figura 05. Eletroforese em gel de poliacrilamida com agentes desnaturantes a 16 % dos produtos de digestão do fibrinogênio bovino pela fração MOO3  
linha 1- fibrinogênio controle incubado sem MOO3 por 120 min.; linhas 2, 3, 4, 5, 7 e 6- fibrinogênio incubado com MOO3 por 15, 30, 45, 60, 90 e 120 min., respectivamente; linhas 8 e 9 - fibrinogênio incubado com MOO3 + EDTA e  $\beta$ -mercaptoetanol 10 mM por 120 min., respectivamente. Para cada ensaio 50  $\mu$ l de uma solução de fibrinogênio bovino (1 mg/ml) foram incubados com 5  $\mu$ g da fração MOO3 à 37°C, conforme descrito em materias e métodos.

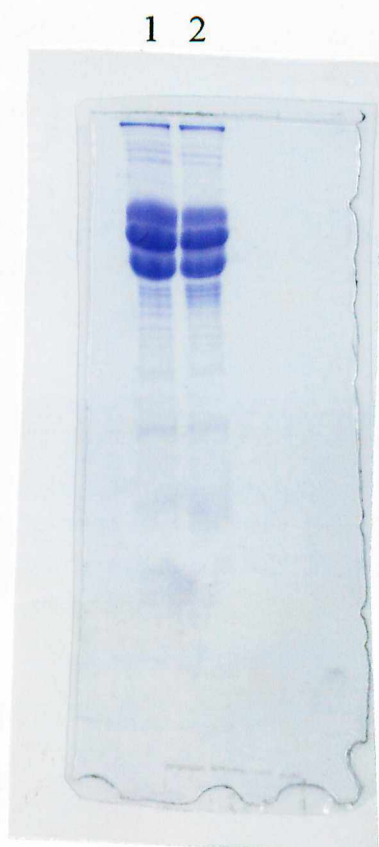


Figura 06. Eletroforese em gel de poliacrilamida com agentes desnaturantes a 16 % dos produtos de digestão do fibrinogênio bovino pela fração MOO3 tratada com leupeptina

1- Fibrinogênio controle incubado sem MOO3 por 120 min. 2- Fibrinogênio incubado com MOO3 + leupeptina 1 mM por 120 min. As condições utilizadas foram as mesmas descritas para a figura 05.



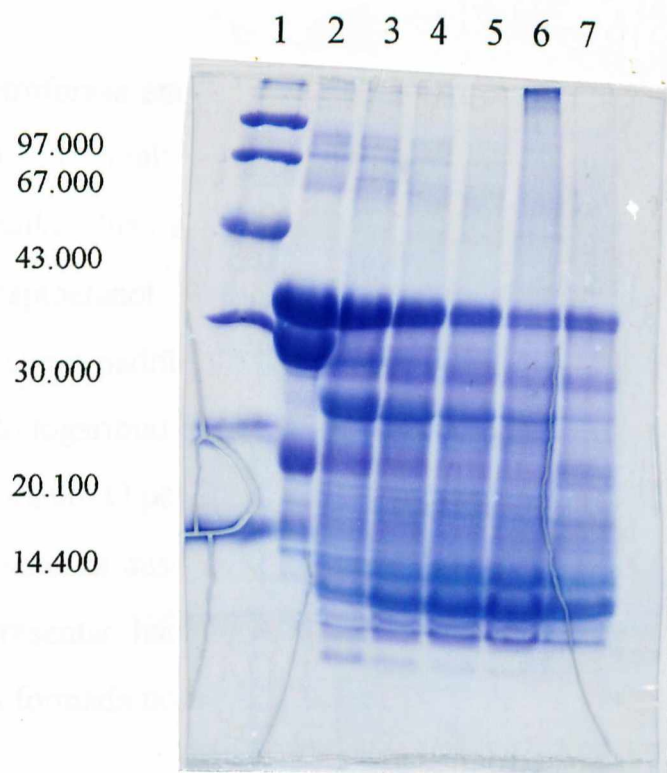


Figura 07. Eletroforese em gel de poliacrilamida com agentes desnaturantes a 16 % dos produtos de hidrólise da caseína pela fração MOO3.

Linha 1- Padrão LWM: fosforilase b (97.000), soroalbumina bovina (67.000), ovoalbumina (43.000), anidrase carbônica (30.000), inibidor de tripsina (20.100) e  $\alpha$ -lactoalbumina (14.400); linha 2- caseína controle incubada sem MOO3 por 24 horas; linhas 3, 4, 5, 6 e 7, caseína incubada com MOO3 por 1, 3, 6, 12 e 24 horas, respectivamente. Para cada ensaio 50  $\mu$ l de uma solução de caseína (1 mg/ml) foram incubados com 5  $\mu$ g da fração MOO3 à 37°C, conforme descrito em materiais e métodos.

## 4.2. Características Químicas

### 4.2.1 Eletroforese em gel de poliacrilamida com agentes desnaturantes e determinação do peso molecular

A eletroforese em gel de poliacrilamida com agentes desnaturantes a 16 % (item 3.4.3) foi realizada para estimar o peso molecular da fração MOO3. Foram utilizadas duas amostras, uma reduzida em  $\beta$ -mercaptoetanol e outra sem  $\beta$ -mercaptoetanol. O peso molecular aproximado da fração MOO3 foi obtido pela curva padrão traçada considerando-se a mobilidade eletroforética em função do logaritmo do pesos moleculares das proteínas padrões, conforme mostra a figura 08. O peso molecular aparente da fração MOO3 encontrado foi de 26.600, tanto na ausência quanto na presença de  $\beta$ -mercaptoetanol (figura 09). Por apresentar banda única em ambas as condições, sugere-se que a proteína seja formada por cadeia simples.

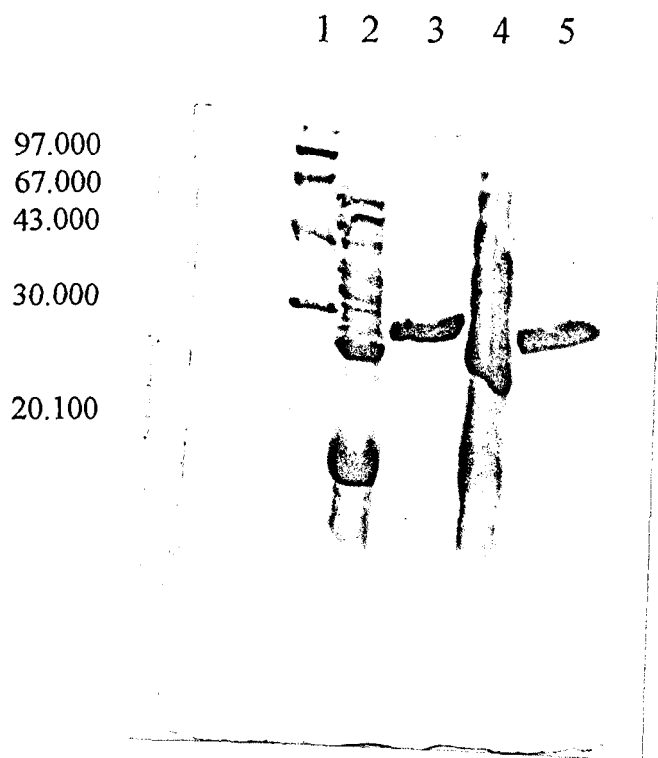


Figura 08. Eletroforese em gel de poliacrilamida com agentes desnaturantes a 16 % para a determinação do peso molecular da fração MOO3 segundo LAEMMLI (1970). Tampão Tris-glicina pH 8,3. Tempo de corrida: 100 minutos a 20 mA constante. Corante: coomassie blue G-250 0,2 % em água:metanol, 1:1 (v/v) corado por 30 minutos. Descorante: ácido acético a 7 % (v/v)

1- Padrão LWM: fosforilase b (97.000), soroalbumina bovina (67.000), ovoalbumina (P.M. 43.000), anidrase carbônica (30.000), inibidor de tripsina (20,100).

2 e 4- VB *Bothrops moojeni* com e sem  $\beta$ -mercaptoetanol, respectivamente.

03 e 5 - MOO3 com e sem  $\beta$ -mercaptoetanol, respectivamente.

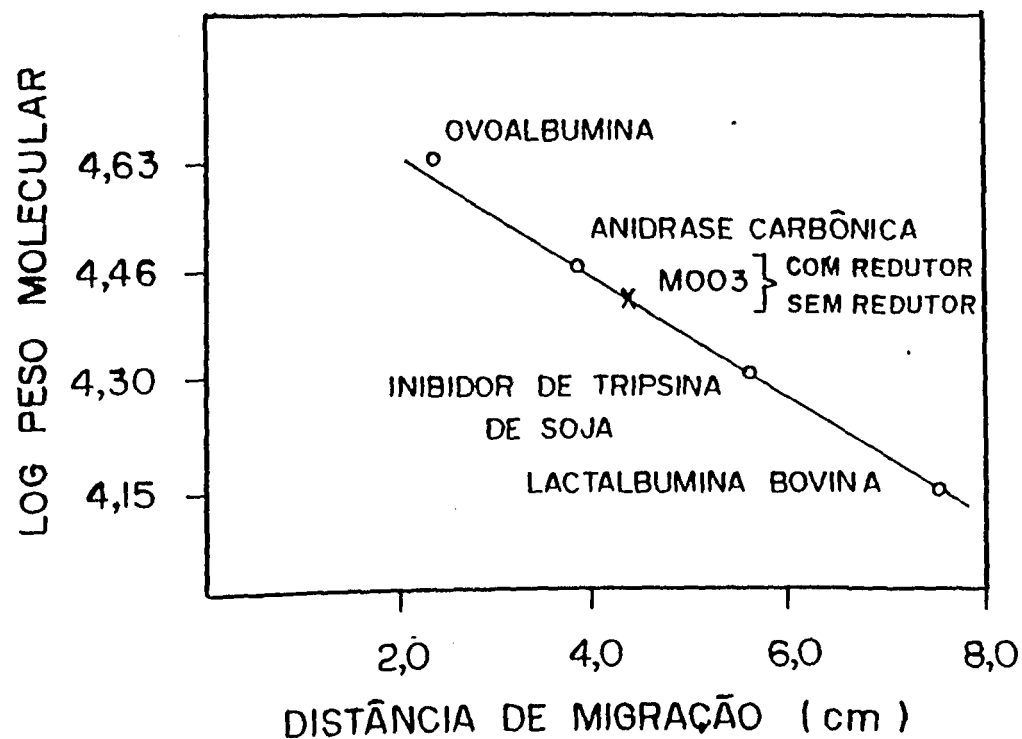


Figura 09. Curva padrão para a determinação do peso molecular da fração MOO3, na ausência e presença de agente redutor, em gel de poliacrilamida com agentes desnaturantes a 16 % pelo método de LAEMMLI (1970)

o Padrões:	ovoalbumina	(PM=43.000)
	anidrase carbônica	(PM=30.000)
	inibidor de tripsina	(PM=12.100)
	$\alpha$ -lactoalbumina	(PM=14.400)

x Frações: MOO3 (com e sem  $\beta$ -mercaptoetanol)

#### 4.2.2 Análise da composição em aminoácidos

Na tabela 05 estão representados os resultados da análise da composição em aminoácidos da fração MOO3 purificada do veneno de *Bothrops moojeni*, inclusive o conteúdo de meia-cistina.

Tabela 05. Composição de aminoácidos da fração MOO3 isolada de *Bothrops moojeni*.

AMINOÁCIDOS	Fração MOO3
Asx	30
Thr	17
Ser	26
Glx	23
Pro	11
Gly	19
Ala	16
½ Cys <sup>1</sup>	14
Val	18
Met	03
Ile	11
Leu	19
Tyr	06
Phe	07
Lys	12
His	05
Arg	12
Trp	nd
<b>TOTAL</b>	<b>249 + Trp</b>
<b>PESO MOLECULAR</b>	<b>26.766</b>

<sup>1</sup>. Determinação após oxidação com ácido perfórmico. (nd) não determinado.

### **4.2.3 Análise do conteúdo de carboidratos neutros**

Os testes para a quantificação de carboidratos neutros da fração MOO3, conforme descrito no item 3.4.1 mostraram que a fração MOO3 não apresenta carboidratos neutros.

### **4.2.4 Critérios de Pureza**

#### **4.2.4.1 Eletroforese em gel de poliacrilamida sem agentes desnaturantes para proteínas básicas**

A figura 10 mostra o resultado da eletroforese em gel de poliacrilamida para proteínas básicas a 10%, em pH 4,3 (conforme descrito no item 3.4.2), do veneno bruto e da fração MOO3, a qual apresentou banda única, com atividade proteolítica sobre o fibrinogênio e caseína e esterásica sobre o TAME.

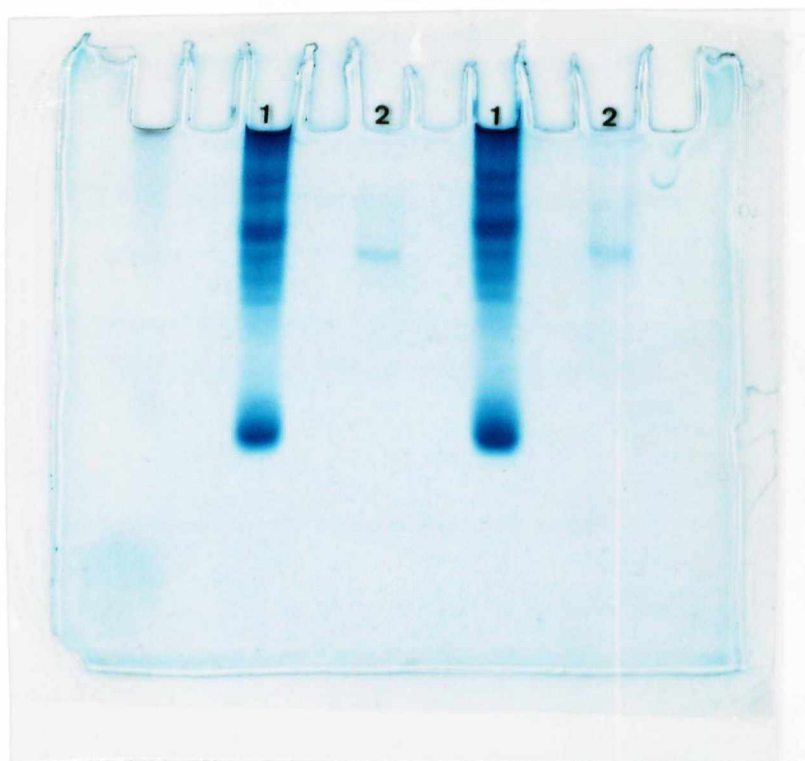


Figura 10. Eletroforese em gel de poliacrilamida para proteínas básicas a 10 %. Tampão  $\beta$ -alanina/ácido acético pH 4,3. Tempo de corrida: 50 minutos a 20 mA constante. Corante: coomassie blue G-250 0,2 % em água:metanol, 1:1 (v/v) corando por 30 minutos. Descorante: ácido acético a 7 % (v/v)

1- VB *Bothrops moojeni*

2-MOO3.

#### **4.2.4.2 Identificação do resíduo aminoterminal**

A identificação do resíduo aminoterminal da fração MOO3, conforme descrito no item 3.4.4, apresentou a alanina como o principal resíduo N-terminal, sendo representada por uma banda muito forte, e um outro N-terminal contaminante representado pela valina, mas com uma banda muito mais fraca (resultados não mostrados).

#### **4.2.4.3 Focalização Isoelétrica**

Após focalização isoelétrica, realizada como descrito no item 3.4.5, a fração MOO3 apresentou uma banda principal e uma contaminante. A curva experimental traçada, que relaciona o pH em função da distância de migração está apresentada na figura 11 e indicou  $pI = 7,8$  para o componente majoritário da fração MOO3.



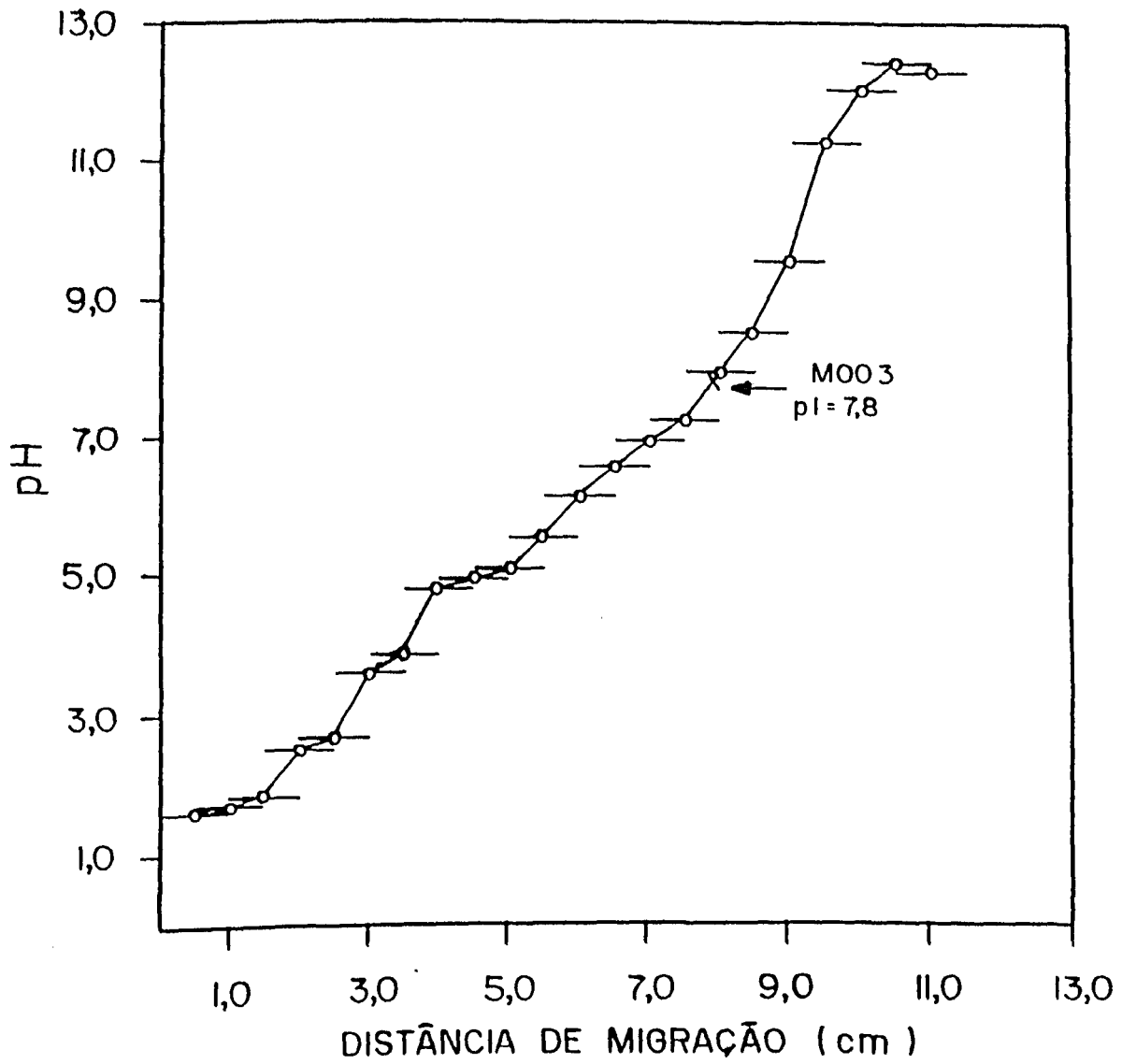


Figura 11. Gradiente de pH obtido na focalização isoeétrica da fração MOO3 e utilizado para determinação de pI.

#### 4.2.4.4 Imunoelectroforese

A figura 12 mostra a identificação e a análise de pureza da fração MOO3 isolada do veneno de *Bothrops moojeni* frente ao soro anti-botrópico. Podemos observar claramente uma linha principal de precipitação e outra contaminante bem mais difusa.

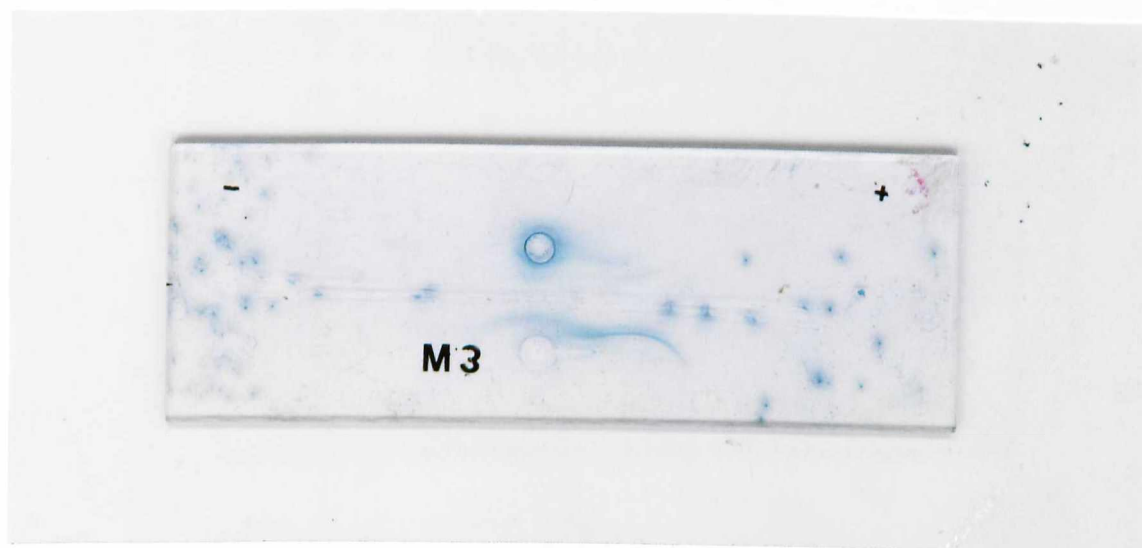


Figura 12. Análise imunoelectroforética da fração MOO3 purificada do veneno de *Bothrops moojeni*.

Eletroforese em tampão veronal pH 8,2, corrente de 5 mA constante por 80 minutos. Após eletroforese colocou-se soro anti-botrópico na canaleta central.

## 5 - DISCUSSÃO

Este trabalho teve como objetivo principal purificar e caracterizar parcialmente uma enzima proteolítica do veneno *Bothrops moojeni*.

O veneno bruto foi submetido a uma cromatografia de troca iônica em gel de CM Sepharose fast flow com gradiente convexo de concentração em tampão Tris-HCl 0,05 M pH 7,0 (0,1 M - 0,45 M KCl), onde obtivemos 7 frações principais, denominadas de MOO1 a MOO7 (Fig. 02). A figura 03 mostra o perfil eletroforético dessas frações.

Houve a necessidade de dialisar as frações obtidas, pois o sal do tampão, além de interferir na dosagem de proteínas pelo método do microbiureto, realizado para a quantificação dos ensaios biológicos e enzimáticos, também interferia na atividade coagulante. Depois da dosagem de proteínas as frações foram liofilizadas e armazenadas a - 20 °C.

Neste fracionamento a atividade coagulante sobre o plasma humano foi encontrada nas frações MOO1, MOO2, MOO3 e MOO4, com uma atividade específica mais elevada para a fração MOO4 (Tabela 03). A fração MOO4 também coagulou o fibrinogênio. A julgar pela análise eletroforética em gel de poliacrilamida com agentes desnaturantes, sugerimos que a principal proteína da fração MOO4 seja idêntica à batroxobina, uma enzima coagulante, tipo trombina, de peso molecular 37.000, purificada do veneno de *Bothrops moojeni* por STOCKER e BARLOW (1976). Esta enzima tem sido muito usada como agente terapêutico na prevenção e tratamento de desordens trombóticas (BELL, 1988; STOCKER, 1988). A batroxobina é atualmente isolada da peçonha de *Bothrops moojeni* que são criadas e mantidas em cativeiros pela Pentapharm, aqui em Uberlândia.

Um grande número de enzimas “thrombin-like” tem sido isolado a partir de venenos de serpentes tais como *Agkistrodon blomhoffii* (UGAROVA et al., 1985), *Agkistrodon rhodostoma* (NOLAN et a., 1976), *Bothrops asper*

(ARAGÓN e GUBENSEK, 1981), *Bothrops atrox* (STOCKER, 1978), *Bothrops moojeni* (STOCKER, 1978), *Crotalus adamanteus* (MARKLAND e DAMUS, 1971), *Crotalus horridus* (SHU et al., 1983), *Trimeresurus flavoviridis* (SHIEH et al., 1985) e *Bothrops jararaca* (ZANGALLI et al., 1996). Essas enzimas liberam preferencialmente o fibrinopeptídeo A. Por outro lado, as enzimas isoladas de *Agkistrodon halys pallas* (GUAN et al., 1984), *Agkistrodon contortrix contortrix* (SHIMIZU et al., 1987) e *Agkistrodon bilineatus* (KOMORI et al., 1993), liberam preferencialmente o fibrinopeptídeo B. MOO3 é uma enzima purificada do veneno de *Bothrops moojeni* com um peso molecular aparente de 26.600 sob condições redutoras e não redutoras, libera preferencialmente o fibrinopeptídeo A, apresenta somente traços de atividade coagulante sobre o plasma e sobre o fibrinogênio. Esta enzima purificada por nós pode ser diferente da "thrombin-like" que foi previamente purificada por STOCKER e BARLOW (1976), a partir do mesmo veneno, desde que MOO3 apresenta um peso molecular mais baixo, menor atividade específica, diferente pI e ausência de carboidratos neutros. Seu resíduo N-terminal é a alanina ao contrário da valina encontrada nas outras enzimas "thrombin-like".

As enzimas "thrombin-like" purificadas de vários venenos de serpentes são glicoproteínas de cadeia única e massa molecular cerca de 37.000, liberam preferencialmente o fibrinopeptídeo A e não são inibidas pela heparina. Entretanto há muitas diferenças em outras propriedades tais como ponto isoelétrico, fatores ativadores da coagulação sanguínea, atividade coagulante específica e os efeitos de inibidores. Algumas exceções têm sido descritas: a Cerastobina proveniente da *Cerastes vipera* não contém carboidratos, RP 34 proveniente da *Cerastes cerastes*, com duas subunidades de 48.500 Da (LARABA-DJEBARA et al., 1992), a enzima "thrombin-like" oriunda da

*Agkistrodon contortrix contortrix* (HERZIG et al., 1970), *Agkistrodon halys pallas* (GUAN et al., 1984) e *Agkistrodon bilineatus* (KOMORI et al., 1993) as quais liberam preferencialmente o fibrinopeptídeo B, e enzimas purificadas a partir de *Bothrops insularis* (SELISTRE e GIGLIO, 1987), *Crotalus viridis oreganus* (MACKESSY, 1989) e *Agkistrodon bilineatus* (KOMORI et al. 1993) que são inibidas por heparina.

A identificação do resíduo amino-terminal, a focalização isoelétrica e a imunoeletroforese são técnicas muito sensíveis e que servem também para mostrar o grau de pureza de uma enzima. Pela análise do N-terminal, a fração MOO3 apresentou a alanina como o principal resíduo amino-terminal e um contaminante com o resíduo N-terminal valina (resultados não apresentados). A valina é encontrada na maioria das enzimas coagulantes botrópicas do tipo trombina. Interessantemente a histidina foi encontrada como resíduo N-terminal no veneno de *Crotalus atrox* (BJANASON et al. , 1983) e o ácido aspártico no veneno de *Trimeresurus gramineus* (CHANG et al., 1995).

Podemos ,então, considerar 2 situações: Primeiro, os contaminantes seriam os responsáveis pela fraca ação coagulante da fração MOO3, o que reforçaria a presença de enzimas “thrombin-like” entre eles e justificaria a presença de contaminante(s) com a valina como resíduo N-terminal. Segundo, os contaminantes não seriam os responsáveis pela fraca atividade coagulante, atribuindo, dessa forma, a ação coagulante somente à principal proteína dessa fração. Neste caso, poderíamos estar diante de uma nova classe de enzimas coagulantes que atuam sobre o fibrinogênio, que apresenta a alanina como resíduo amino-terminal e não é glicoproteína. São necessários mais estudos para confirmar uma destas hipóteses. Dos critérios de pureza utilizados, com exceção da eletroforese em gel de poliacrilamida sem agentes desnaturantes, que mostrou banda única para a fração MOO3, todos os outros evidenciaram a

presença de pelo menos mais uma proteína na fração MOO3, que apresenta pI, peso molecular e N-terminal diferentes da proteína principal.

A atividade fosfolipásica A2 ficou restrita à fração MOO1 (resultados não apresentados), enquanto que a atividade proteolítica sobre a azocaseína e sobre a azoalbumina foi encontrada nas frações MOO1 e MOO2 (Figura 02). A fração MOO3 apresentou atividades esterásica sobre o TAME, proteolítica sobre a caseína e fibrinogênio. Estudos de especificidade usando substratos cromogênicos mostraram que a enzima purificada não hidrolisa o DL-BAPNA, azocaseína e a azoalbumina.

A fração MOO3 apresentou uma única banda em gel de eletroforese para proteínas básicas (Figura 10). Resultados não apresentados mostraram que mesmo com uma maior concentração de proteína a fração MOO3 apresentou uma única banda uniforme, característica de proteínas que não contem carboidratos. Entretanto, MOO3 não se encontra totalmente pura, visto que pequenos contaminantes são observados por eletroforese em gel de poliacrilamida com agentes desnaturantes (Figura 08) e outras técnicas.

Mas, é interessante ressaltar que mesmo com uma recuperação relativamente baixa (em torno de 66 %), o único passo de purificação utilizado por nós foi bastante satisfatório. A Figura 03 mostra que quase toda a proteína MOO3, presente no veneno total, ficou restrita a essa fração e com um grau de pureza considerável, cerca de 92 % (Figura 04). A fração MOO3 representa 1,35% do veneno total de *Bothrops moojeni* (Tabela 02).

A composição em aminoácidos da fração MOO3 indica que a proteína possui um peso molecular em torno de 26.766, um pouco maior daquele determinado por eletroforese em gel de poliacrilamida (provavelmente devido à presença de pequenos contaminantes), e cerca de 249 resíduos de aminoácidos (tabela 05). Esta proteína é uma enzima de caráter básico e rica em resíduos de

serina e com alto número de resíduos de meia-cistina, o que sugere a presença de pontes dissulfetos intercadeias, tornando-a estável e rígida.

Os resultados apresentados na figura 07 mostram que a caseína é praticamente hidrolisada depois de 24 horas, quando incubada com MOO3.

De acordo com os resultados apresentados no teste de degradação do fibrinogênio pela fração MOO3, a cadeia  $\alpha$  foi hidrolisada mais rapidamente que a cadeia  $\beta$ , enquanto que a cadeia  $\delta$  permaneceu inalterada (Figura. 05). As fibrinogenases de venenos de serpentes podem ser classificadas em 3 grupos, dependendo da especificidade de hidrólise das cadeias do fibrinogênio, conforme foi descrito na introdução deste trabalho. Sugerimos, portanto, que MOO3 seja uma  $\alpha$  fibrinogenase.

As  $\alpha$ -fibrinogenases apresentam atividade hemorrágica sem atividade esterásica sobre o TAME, enquanto que as  $\beta$ -fibrinogenases possuem atividade esterásica sobre o TAME sem atividade hemorrágica. É interessante ressaltar que a fração MOO3 apesar de apresentar atividade esterásica sobre o TAME libera preferencialmente o fibrinopeptídeo A e não apresenta atividade hemorrágica.

As Figuras 05 e 06 mostram os efeitos de agentes inibidores da atividade proteolítica da fração MOO3 sobre o fibrinogênio. Entres esses componentes a leupeptina e o  $\beta$ -mercaptoetanol foram capazes de inibir completamente a atividade da enzima, enquanto que o EDTA inibiu parcialmente. Resultados adicionais (não apresentados) mostraram que MOO3 também é inibida completamente por PMSF e parcialmente por DTT e aprotinina. Esses resultados sugerem que MOO3 pertence à família das serino proteases e que as pontes de dissulfetos são essenciais na manutenção da conformação nativa desta enzima. Esta enzima deve apresentar domínios diferentes, mas próximos, responsáveis por estas atividades, desde que o agente redutor  $\beta$ -



mercaptoetanol inibiu totalmente a atividade proteolítica (Figura 05) e somente parcialmente (cerca de 40%) a atividade coagulante sobre o plasma humano (Tabela 04). A atividade esterolítica sobre o TAME associada com a ausência da atividade amidásica sobre o DL-BAPNA e os efeitos inibitórios do EDTA e leupeptina na atividade coagulante dessa enzima reforçam a sugestão de que se trata de uma serino protease. Além do mais, a inibição parcial pelo EDTA da atividade proteolítica dessa enzima sobre o fibrinogênio sugere que a estrutura do sítio ativo da molécula da enzima difere daquela da trombina.

Duas serino proteinases, MSP1 e MSP2, foram isoladas do veneno de *Bothrops moojeni* (SERRANO et al., 1993a) ambas são glicoproteínas básicas e em eletroforese em gel de poliacrilamida, MSP1 apresenta duas bandas de proteínas correspondente a 34.000 e 32.500. MSP2 se comporta como uma proteína de cadeia simples com um peso molecular de 38.000. Os mesmos autores (1993b) isolaram uma metaloproteinase do mesmo veneno, denominada MPB. Assim como MOO3, a MPB é desprovida de atividade hemorrágica e apresenta somente traços de atividade coagulante. MPB também é uma glicoproteína básica, apresentando em eletroforese em gel de poliacrilamida com agentes desnaturantes duas cadeias de peso molecular de 65.000 e 55.000. Como muitas fibrinogenases de venenos, as três proteinases iniciam a hidrólise do fibrinogênio a partir da cadeia  $\alpha$ , com MPB sendo mais efetivo. MPB, MSP1 e MSP2 também digeriram a cadeia  $\delta$ , o que não é comum para a maioria das proteinases de venenos e que as diferem de MOO3.

PANDYA e BUDZYNSKI (1984) descreveram diferenças na especificidade fibrinogenolítica entre a metalo e serino proteinases do veneno de *Crotalus atrox*. Esses autores mostraram que duas metaloproteinases hidrolisaram todas as cadeias do fibrinogênio, enquanto que duas serino proteases digeriram somente a cadeia  $\beta$ .

Cinco proteinases fibrin(ogen)olíticas PofibC1, C2, C3, H e S foram isoladas do veneno de *Philodryas olfersii* (green snake) por ASSAKURA et al. (1994). Assim como MOO3, PofibC1, C2, C3 e H são metaloproteinases inibidas por EDTA ou 1,10 fenantrolina. Somente PofibH é uma serino protease, inibida por PMSF. Todas as cinco enzimas são inibidas por DTT. PofibC1 e C2 apresentam o mesmo peso molecular de 47.000 e são proteínas ácidas de pI 6,2. PofibC3 é uma proteinase básica de pI 8,5 e peso molecular de 45.000. A proteinase hemorrágica PofibH tem um peso molecular de 58.000 e pI 4,6 e PofibS tem um peso molecular de 36.000 e pI 4,5. As cinco proteinases degradam fibrina e fibrinogênio. PofibC1, C2 e C3 degradam preferencialmente a cadeia  $\alpha$ , enquanto PofibS cliva concomitantemente as cadeias A- $\alpha$  e B- $\beta$  do fibrinogênio. Nenhuma dessas enzimas cliva a cadeia  $\delta$ . Quando correlatadas com o tempo de coagulação da trombina, a enzima mais ativa foi a PofibS, enquanto que PofibH e C1 mostraram apenas traços dessa atividade.

Seis metaloproteinases também foram isoladas do veneno de *Bothrops asper*: três delas, denominadas BaH1, BH2 e BH3 apresentam características diferentes da fração MOO3: são proteínas ácidas de 64.000, 26.000 e 55.000, respectivamente e induzem hemorragia em ratos (BORKOW et al., 1993). Ao contrário, G e I, embora apresentem uma atividade proteolítica muito intensa são desprovidas de atividade hemorrágica. BaP1 é uma enzima de 24.000 ativa na caseína e fibrinogênio; suas atividades hemorrágica e proteolítica são inibidas por agentes quelantes. Essa enzima possui algumas similaridades com a protease A de *moojeni* (ASSAKURA et al., 1985), outra metaloproteinase com baixa atividade hemorrágica.

Tabela 06. Relação de fibrinogenases isoladas do veneno de serpentes do gênero *Bothrops* e *Philodryas*.

ESPÉCIES	TOXINA	P.M.	pl	DEGRADAÇÃO DO FIBRINOGENÍO	INIBIDORES ENZIMÁTICOS
<i>B. asper</i> <sup>1</sup>	BaP1	24.000	> 7.0	A $\alpha$ > B $\beta$	EDTA
<i>B. moojeni</i> <sup>*</sup>	MOO3	26.600	7.8	A $\alpha$ > B $\beta$	<b>DTT, EDTA, leupeptina,</b> Aprotinina, $\beta$ -mercaptoctanol, PMSF
<i>B. moojeni</i> <sup>2</sup>	MSP1	34 e 32.500	> 7.0	A $\alpha$ > B $\beta$ > $\delta$	PMSF
<i>B. moojeni</i> <sup>2</sup>	MSP2	38.000	> 7.0	A $\alpha$ > B $\beta$ > $\delta$	PMSF
<i>B. moojeni</i> <sup>2</sup>	MPB	65 e 55.000	> 7.0	A $\alpha$ > B $\beta$ > $\delta$	DTT, EDTA, 1,10 fenantrolina
<i>B. moojeni</i> <sup>3</sup>	Protese A	22.500	7.7	A $\alpha$ > B $\beta$	EDTA
<i>P. olfersii</i> <sup>4</sup>	PofibC1	47.000	6.2	A $\alpha$ (lenta)	DTT, EDTA, 1,10 fenantrolina
<i>P. olfersii</i> <sup>4</sup>	PofibC2	47.000	6.2	A $\alpha$ (rápida)	DTT, EDTA, 1,10 fenantrolina
<i>P. olfersii</i> <sup>4</sup>	PofiC3	45.000	8.5	A $\alpha$ > B $\beta$	DTT, EDTA, 1,10 fenantrolina
<i>P. olfersii</i> <sup>4</sup>	PofiH	58.000	4.6	A $\alpha$ (rápida)	DTT, EDTA
<i>P. olfersii</i> <sup>4</sup>	PofibS	36.00	4.5	A $\alpha$ = B $\beta$	DTT, PMSF

Referências:; (1) GUTIÉRREZ et al. (1994); (2) SERRANO et al. (1993a, 1993b); (3) ASSAKURA (1985); (4) ASSAKURA et al. (1994),

(\* ) PRESENTE TRABALHO.

Na Tabela06 estão relacionadas várias enzimas encontradas nos venenos de *Bothrops moojeni* e *Philodryas olfersii*. Podemos observar que as toxinas BaP1 e Protease A são as enzimas que apresentam características mais próximas da MOO3. Elas degradam predominantemente a cadeia A- $\alpha$  do fibrinogênio, e por um período longo de incubação, a cadeia B- $\beta$ . A cadeia  $\delta$  permanece inalterada. Este modelo de digestão é similar para muitas fibrinogenases tais como uma purificada de *Bothrops jararaca* (MARUYANA et al., 1992) e *Lachesis muta* (RAN et al., 1988). As demais toxinas apresentadas nesta tabela mostram várias diferenças entre seus pesos moleculares, pontos isoelétricos e especificidade de hidrólise ao substrato, quando comparadas com a MOO3. Isto mostra que há uma grande variedade de enzimas com atividade proteolítica sobre o fibrinogênio presentes nos venenos de serpentes.

## 6 - CONCLUSÃO

Em conclusão, os procedimentos utilizados neste trabalho nos permitiram purificar uma enzima proteolítica presente no veneno de *Bothrops moojeni*. A enzima foi caracterizada como uma serino proteinase devido a sua inibição frente a inibidores específicos de enzimas pertencentes a essa classe . Muitas de suas propriedades são diferentes de um grande número de proteases já isoladas e descritas na literatura.

7 - RESUMO

A ação proteolítica das proteinases do veneno de serpentes têm sido determinada em um grande número de substratos sintéticos e naturais. Uma serino proteinase básica, ativa sobre a caseína e fibrinogênio foi purificada a partir do veneno de *Bothrops moojeni* usando um simples passo de cromatografia em coluna de CM Sepharose fast flow equilibrada com tampão Tris-HCl 0,05 M pH 7,0 em KCl 0,1 M e eluída com gradiente convexo de concentração ( 0,1 M - 0,45 M KCl) do mesmo tampão. A enzima , denominada MOO3, não é hemorrágica e apresenta somente traços de atividade coagulante. Substratos sintéticos ou cromogênicos (DL-BAPNA, azocaseína e azoalbumina) não são hidrolisados pela MOO3. Em gel de eletroforese em poliacrilamida pH 4,3, MOO3 apresentou uma banda única. Em eletroforese em gel de poliacrilamida com agentes desnaturantes, MOO3 se comportou como uma proteína de cadeia simples com um peso molecular aparente de 26.600, na presença e ausência de  $\beta$ -mercaptoetanol. A enzima não contém carboidratos neutros, seu aminoácido N-terminal é a alanina e tem pI 7.8. A composição em aminoácidos mostrou 249 resíduos/mol, um alto conteúdo de aminoácidos hidrofílicos e 14 resíduos de meia-cistina, os quais possibilitam até 7 pontes de dissulfetos. A proteinase cliva a cadeia  $\alpha$  mais rapidamente que a cadeia  $\beta$  do fibrinogênio bovino e não mostrou nenhum efeito sobre a cadeia  $\delta$ . As atividades coagulante e proteolítica foram inibidas quando MOO3 foi tratada com EDTA,  $\beta$ -mercaptoetanol e leupeptina. A atividade esterolítica de MOO3 sobre -N-tosyl-Arginina metil éster (TAME) é de  $29,66 \mu\text{Mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ . A recuperação total em absorbância foi de aproximadamente 66 %, com MOO3 representando 1,42 % (p/p) do veneno bruto inicial.



8 - SUMMARY

Proteolytic action of snake venom proteinases has been determined on a great number of natural and synthetic substrates. A basic serine proteinase active on casein and fibrinogen was purified from *Bothrops moojeni* venom using only one step by chromatography on CM Sepharose fast flow column previously equilibrated with 0.05 M, pH 7.0 Tris-HCl 0.1 M KCl and eluted with a convex concentration gradient (0.1 M - 0.45 M KCl) of the same buffer. The enzyme, named MOO3, is not hemorrhagic and presents only traces of blood-clotting activity. Synthetic chromogenic substrates (azoacasein and azoalbumin) were not hydrolyzed by MOO3. On polyacrylamide gel electrophoresis at pH 4.3, MOO3 presented a single protein band. On sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide electrophoresis MOO3 behaves as a single-chain protein with a mol. wts of 26,600 in the presence and absence of  $\beta$ -mercaptoethanol and pI 7.8. The enzyme does not contain neutral carbohydrates and its N-terminal amino acid is alanine. The amino acid composition showed 249 residues/moles a high contents hydrophilic amino acids and 14 half-cys residues, which should account for 7 disulfide bonds. The proteinase cleaves the A- $\alpha$  chain faster than the B- $\beta$  of bovine fibrinogen and shows no effect on the  $\delta$ -chain. Both coagulant and proteolytic activities were inhibited when the MOO3 was treated with EDTA,  $\beta$ -mercaptoethanol and leupeptin. Specific esterolytic activities of MOO3 on alfa-N-tosyl-L-arginine methyl ester (TAME) are 29.64  $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ . Total absorbance recovery for column was around 66%. MOO3 represented 1.42% (w/w) of the initial desiccated venom.

## 9 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMARAL, C. S. F.; SILVA, O. A.; LOPEZ, M.; PEDROSO, E. R. P. (1980). Afibrinogenemia following snake bite (*Crotalus durissus terrificus*). **Amer. J. Trop. Med. Hyg.**, **29**: p 1453.
- ANDERSON, L. (1972). Isolation of thrombin-like activity from of *Trimeresurus okinavensis*. **Haemostasis**, **1**: p 31.
- ARAGÓN, F.; KOPITAR, M.; BABNIK, J.; GUBENSEK, F. (1978). Some properties of two fibrinolytic enzymes from the venom of *Bothrops asper*. **Period. Biol.**, **80**: p 91.
- ARAGON-ORTIZ, F.; GUBENSEK, F. (1993). A thrombin-like enzyme from bushmaster (*Lachesis muta stenophrys*) venom. **Toxicon**, **31 (11)**: p1435.
- ARAGÓN-ORTIZ, F.; GUSENBEK, F. (1987). Characterization of a metalloproteinase from *Bothrops asper* (terciopelo) snake venom. **Toxicon**, **25**: p 759.
- ASSAKURA, M. T.; REICHL, A. P.; ASPERTI, M. C. A.; MANDELBAUM, F. R. (1985). Isolation of the major proteolytic enzyme from the venom of the snake *Bothrops moojeni* (Caissaca). **Toxicon**, **23**: p 691.
- ASSAKURA, M. T.; REICHL, A. P.; MANDELBAUM, F. R. (1994). Isolation and characterization of five fibrin(ogen)olytic enzymes from the venom of *Philodryas olfersii* (green. snake). **Toxicon**, **32**: p 819.

- BAJWA, S. S.; MARKLAND, F. S.; RUSSELL, F. E. (1980). Fibrinolytic enzymes in western diamondback rattlesnake (*Crotalus atrox*) venom. **Toxicon**, **18**: p 285.
- BELL, W. R. (1988). Clinical trials with ancrod. In: **Hemostasis and animal venoms**, p 541 (Pirkle, H; Markland, F. S., Jr Edds). New York: Marcel Dekker.
- BJARNASON, J. B. and FOX, J. W. (1988). Hemorrhagic toxins from snake venoms. **J. Toxicol. Toxin. Rev.** **7**, **121**: p. 209
- BJARNASON, J. B.; BARISH, A.; DIRENZO, G. S.; CAMPBELL, R.; FOX, J. W. (1983). Kallikrein-like enzymes from *Crotalus atrox* venom. **J. Biol. Chem.**, **258**: p 566.
- BJARNASON, J. B.; FOX, J. W. (1983). Proteolytic specificity and cobalt exchange of hemorrhagic toxin, a zinc protease isolated from the venom of the Western diamondback rattlesnake (*Crotalus atrox*). **Biochem.**, **22**: p 3770.
- BLOMBÄCK, B.; HESSEL, B.; HOGG, D.; THERKILDSEN, L. (1978). A two-step fibrinogen-fibrin transition in blood coagulation. **Nature**, **275**: p 501.
- BLOMBÄCK, B. (1958). Studies on the action of thrombin enzyme on bovine fibrinogen as measured by N-terminal analysis. **Arkiv Kemi**, **12**: p 321.

- BODE, W.; GOMIS-RUTH, F. X.; STOCKER, W. (1993). Astacins, serralytins, snake venom and matrix metalloproteinases exhibit identical zinc-binding environments (HEXXHXXGXXH and met-turn) and topologies and should be grouped into a common family, the "metzincins". **FEBS Lett**, **331**: p 134.
- BONILLA, C. A. (1975). Defibrinating enzyme from Timber rattlesnake (*Crotalus h. horridus*) venom: a potential agent for therapeutic defibrination. I. Purification and properties. **Thromb. Res.**, **6**: p 151.
- BORKOW, G.; GUTIÉRREZ, J. M.; OVADIA, M. (1993). Isolation and characterization of synergistic hemorrhagins from venom of the snake *Bothrops asper*. **Toxicon**, **31**: p 1137.
- CAMPBELL, D. H.; GARVEY, J. S.; CREMER, N. E.; SUSSDORF, D. H. (1970). In: methods in immunology, 260 (DENJAMIN, W. A. Ed.) 2ed., Inc publisher.
- CHANG, M. C.; HUANG, T. F. (1995). Characterization of a thrombin-like enzyme, gramin, from the venom of *Trimeresurus gramineus* and its in vivo antithrombotic effect. **Toxicon**, **33**: p 1087.
- DAOUD, E.; TU, A. T.; EL-ASMAR, M. F. (1986). Isolation and characterization of an anticoagulant proteinase cerastase F-4, from *Cerastes cerastes* (Egyptian Sand Viper) venom. **Thromb. Res.**, **42**: p 52.

- DE HAAS, G. H.; POSTEMA, N. M.; NIEUWENHUIZEN, W.; VAN DEENEN, L. L. M. (1968). Purification and properties of phospholipase A from porcine pancreas. **Biochem. Biophys. Acta**, **159**: p. 103
- DENSON, K. W. E.; RUSSELL, F. E.; ALMAGRO, D.; BISHOP, R. C. (1972). Characterization of the coagulant activity of some snake venoms. **Toxicon**, **10**: p 557.
- DOTY, P.; GEIDUSCHEC, E. P. (1953). In: The proteins. I-A. (NEURATH, H.; BAILEY, K. Eds).
- DRY, J. E.; BLOMBÄCK, B.; KORNALIK, F (1983). The fibrinolytic and procoagulant activity of southern cooperhead venom enzymes. **Thromb. Res**, **30**: p 185.
- DUBOIS, M; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Anal. Chem.**, **28**: p.350
- EDGAR, W.; PRENTICE, C. R. M. (1973). The proteolytic action of ancrod on human fibrinogen and its polypeptide chains. **Thromb. Res.**, **2**: p 85.
- EHRENPREIS, S.; SCHERAGA, H. A. (1957). Observations on analysis for thrombin and the inactivation of fibrin monomer. **J. Biol. Chem.**, **227**: p 1043.

- ERLANGER, B. F.; KOKOWSKY, N.; COHEN, W. (1961). The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. **Arch. Biochem. Biophys.**, 95: p 271.
- EVANS, H. J. (1984). Purification and properties of a fibrinogenase from the venom of *Naja nigricollis*. **Biochim. Biophys. Acta**, 802: p 49.
- EVANS, H. J.; BARRET, A. J. (1988). The action of proteinase F1 from *Naja nigricollis* venom on the A $\alpha$ -chain of human fibrinogen. In: Hemostasis and Animal Venoms, PIRKLE, H.; MARKLAND, F. S. (Eds.), Marcel Dekker, New York.
- FARID, T. M.; TU, A. T. (1989). Characterization of cerastobin, a thrombin-like from venom of *Cerastes vipera* (Sahara Sand Viper). **Biochem.**, 28: p 371.
- GAFFNEY, P. J.; MARSH, N. A.; WHALER, B. C. (1973). A coagulant enzyme from gaboon viper venom: some aspects of its mode action. **Biochem. Soc. Trans.**, 1: p 1208.
- GRAY, W. R. (1972). End group analysis using dansyl chloride. In: methods in Enzymology. 25-B, 121. (HIRS, C. H. and TIMASHEFF, S. N. Eds). New York: Academic Press.
- GUAN, L. F.; CHI, C. W.; YUAN, M. (1984). Study on the thrombin-like enzyme preferentially releasing fibrinopeptide B from the snake venom of *Agkistrodon halys pallas*. **Thromb. Res.**, 35: p 301.



- GUTIÉRREZ, J. M. (1994). Clinical toxicology of snake bite in Central American. In: **Clinical Toxicology of Animal Venoms and Poisons** (Meier, J. and White, J. Eds). Florida: CRC Press (in press).
- HERZIG, R. H.; RATNOFF, O.D.; SHAINOFF, J. R. (1970). Studies on a procoagulant fraction of southern copperhead snake venom: the preferential release of fibrinopeptide B. **J. Lab. Clin. Med.**, 76: p 451.
- HIESTAND, P. C.; HIESTAND, R. R. (1979). *Dispholidus typus* (boomslang) snake venom: Purification and properties of the coagulant principle. **Toxicon**, 17: p 489.
- HITE, L. A.; FOX, J. W.; BJARNASON, J. B. (1992). A new family of proteinases is defined by several snake venom metalloproteinases. **Biol. Chem. Hoppe-Seyler**, 373: p 381.
- HOGUE, A. R. (1965). Preliminary account on neotropical crotalinae (Serpentes-Viperidae). **Mem. Inst. Butantan**, 32: 109.
- HOGUE, A. R.; ROMANO, S. A. (1972). Sinopse das serpentes peçonhentas do Brasil-Serpentes, Elapidae e Viperidae. **Mem. Inst. Butantan**, 36: p 109.
- HUTTON, R. A., WARRELL, D. A. (1993). Action of snake venom components on haemostatic system. **Blood Rev.**, 7: p 176.
- ITZHAKI, R. F.; GILL, D. M. (1964). A micro-biuret method for estimating proteins. **Anal. Biochem.**, 9: p 401.

- IWANGA, S.; SUZUKI, T. (1979). Enzymes in snake venoms. in: Handbook of Experimental Pharmacology, Vol 52, pp 61- 158 (LEE, C. Y., ED.) Berlin: Springer.
- JORGE, M. T.; RIBEIRO, L. A. (1988). Incoagulabilidade sangüínea no acidente crotálico. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, **21**: p 121.
- KAMIGUTI, A. S.; CARDOSO, J. L. C. (1989). Haemostatic changes caused by the venom South American snakes. **Toxicon**, **27**: p 955.
- KAMIGUTI, A. S.; HAY, C. R. M., THEAKSTON, R. D. G.; ZUZEL, M. (1996). Insights into the mechanism of haemorrhage caused by snake venom metalloproteinases. **Toxicon**, **34**: p 627.
- KAMIGUTI, A. S.; SANO-MARTINS (1995). South American snake venoms affecting haemotasis. **J. Toxic-Toxin Rev.**, **14**: p 359.
- KINI, R. M.; EVANS, H. J. (1992). Strutral domains in venom proteins: evidence that metalloproteinases and nonenymatic platelet aggregation inihibitors (desintegrins) from snake venoms are derived by proteolysis from a common precursor. **Toxicon**, **30**: p 265.
- KOMORI, Y.; HAGIHARA, S.; TU, A. T. (1985). Specificity of hemorrhagic proteinase from *Crotalus atrox* (Western diamondback rattlesnake) venom. **Biochim. Biophys. Acta**, **829**: p 127.

- KOMORI, Y.; NIKAI, T.; OHARA, A.; YAGIHASHI, S.; SUGIHARA, H. (1993). Effects of bilineobin, a thrombin-like proteinase from the venom the commom cantil (*Agkistrodon bilineatus*). **Toxicon**, **31**: p 257.
- KOSUGI, T.; ARIGA, Y., NAKAMURA, M., KINJO, K. (1986). Puriification and some chemical properties of thrombin-like enzyme from *Trimesurus flavoviridis* venom. **Thromb. Haemost.**, **55**: p 24.
- LAEMMLI, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage t4. **Nature**, **227**: p. 680
- LAKI, K.; LORAND, L (1948). On the solubility of fibrin clots. **Science**, **108**: p 280.
- LARABA-DJEBARA, F.; MARTIN-EUCLAIRE, M. F.; MARCHOUT, P. (1992). A fibrinogen-clotting serine proteinase from *Ceraste ceraste* (horned viper) venom with arginine-esterase and amidase activities: purification, characterization and kinetic parameter determination. **Toxicon**, **30**: p 1399.
- LOMONTE, B. GUTIERREZ, J. M. G.; FURTADO, M. F., OTERO, R.; ROSSO, J. P.; VARGAS, O., CARMONA, E. ROVIRA, M. E. (1990). Isolation of two myotoxin from *Bothrops moojeni* and *Bothrops atrox* snake venoms. **Toxicon**, **28**: p 1137.

- LOMONTE, B.; GUTIÉRREZ, J. M.; BORKOW, G.; OVADIA, M.; TARKOWSKI, A.; HANSON, . (1994). Activity of hemorrhagic metalloproteinase BaH1 and myotoxin II from *Bothrops asper* snake venom on capillary endothelial cells in vitro. **Toxicon**, **32**: p 505.
- MACKESSY, S. P. (1989). Isolation of a thrombin-like protease from the venom of the Northern Pacific rattlesnake *Crotalus viridis oreganus*. **Toxicon**, **27**: p 61
- MAGALHÃES, A.; de OLIVEIRA, G. J.; DINIZ, C.R. (1981). Purification and characterization of a thrombin-like enzyme from the venom of busmashter snake, *Lachesis muta muta noctivaga*. **Toxicon**, **19**: p 279.
- MAHIR, M. S.; HYND, J. W.; FLUTE, P. T.; DORMANDY, J.A. (1987). Effects of defibrinogenation on the early patency rate of experimental small calibre arterial grafts. **Br. J. Surg.**, **74**: p 508.
- MANDELBAUM, F. R.; ASSAKURA, M. T. (1988). Antigenic relationship of hemorrhagic factor and proteases isolated from the venom of three species of *Bothrops* snakes. **Toxicon**, **26**: p 379.
- MANDELBAUM, F. R.; ASSAKURA, M. T.; REICHL, A. P. (1984). Characterization of two hemorrhagic factor isolated from the venom of *Bothrops neuwiedii* (jararaca pintada). **Toxicon**, **22**: p 193.

- MANDELBAUM, F. R.; REICHEL, A. P. ; ASSAKUARA, M. T. (1982) Isolation and characterization of a proteolytic enzyme from of the snake *Bothrops jararaca* (jararaca). **Toxicon**, **20** (6): p 953.
- MARKLAND, F. S.; DAMUS, P. S. (1971). Purification and properties of a enzyme from the venom of *Crotalus adamanteus*. **J. Biol. Chem.**, **246**: p 6460.
- MARKLAND, F. S.; REDDY, K. N. N.; GUAN, A. L. (1988). Purification and characterization of a direct-acting fibrinogenolytic enzyme from Southern copperhead venom. In: hemostasis and Animal Venoms, PIRKLE, H.; MARKLAND, F. S. (Eds.), Marcel Dekker, New York.
- MARSHAL, L. R.; HERRMANN, R. P. (1983). Coagulant and anticoagulant actions of Australian snake venoms. **Thromb. Haem.**, **50**:p 707.
- MARUYAMA, M., SUGIKI, M., YOSHIDA, E., MIHARA, H.; NAKAJIMA, N. (1992). Purification and characterization of two fibrinolytic enzymes from *Bothrops jararaca* (jararaca) venom. **Toxicon**, **30**: p 853.
- MATRISIAN, L. M. (1992). The matrix-degrading metalloproteinases **BioEssays**, **14**: p 455.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE (1986). Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes ofídicos. **Brasília, Normas e Manuais Técnicos**: p 49.

- MORI, N.; NIKAI, T.; SUGIHARA, H.; TU, A. T. (1987). Biochemical characterization of hemorrhagic toxins with fibrogenase activity isolated from *Crotalus ruber ruber* venom. **Arch. Biochem. Biophys.**, **253**: p. 108.
- MOURA DA SILVA, A. M.; DESMOND, H.; LAING, G.; THEAKSTON, R. D. G. (1991). Isolation and comparison of myotoxins isolated from venoms of different species of Bothrops snakes. **Toxicon**, **29**: p 713.
- NAHAS, L.; DENSON, K. W. E.; MACFARLANE, R. G. (1964). A study of a coagulant action of eight snake venoms. **Thromb. Diath. Haemorrh.**, **12**: p 335.
- NAHAS, L.; KAMIGUTI, A. S.; BARROS, M. A. R. (1979). Thrombin-like and factor X-activator components of Bothrops snake venoms. **Thromb. Haemost.**, **41**: p 314.
- NIKAI, T., KITO, R.; MORI, N., SUGIHARA, H.; TU, A. T. (1983). Isolation and characterization of fibrinase from western diamondback rattlesnake venom and its comparison to the thrombin-like enzyme, crotalase. **Comp. Biochem. Physiol.**, **76B**: p 679.
- NIKAI, T.; MORI, N.; KISHIDA, M.; SUGIHARA, H.; TU, A. T. (1984). Isolation and biochemical characterization of hemorrhagic toxin from the venom of *Crotalus atrox*. **Arch. Biochem. Biophys.**, **321**: p 309.

- NISHIDA, S.; FUJIMURA, Y.; MIURA, S.; OZAKI, Y.; USAMI, Y.; SUZUKI, M.; TITANI, K.; YOSHIDA, E.; SUGIMOTO, M.; YOSHIDA, A.; FUKUI, H. (1994). Purification and characterization of bathroxombin, a fibrinogen-clotting serine protease from the venom of *Bothrops jararaca*. **Biochem.**, **33**: p 1843.
- NISHIOKA, S. A.; SILVEIRA, P. V. P. (1992). A clinical and epidemiologic study of 292 cases lance-headed viper bite in a Brazilian teaching hospital. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, **47**: p 805.
- NOLAN, C.; HALL, L. S.; BARLOW, G. H. (1976). Acrod, the coagulant enzyme from Malayan pit viper (*Agkistrodon rhodostoma*) venom. **Methods Enzymol.**, **45**: p 205.
- OUYANG, C.; HONG, J. S.; TENG, C. M. (1971). Purification and properties of the thrombin-like principle of *Akistrodon acutus* venom and its comparason with bovine thrombin. **Thromb. Diath. Haemorr.**, **26**: p 224.
- OUYANG, C.; HUANG, T. F. (1979).  $\alpha$  AND  $\beta$ -Fibrinogenases from *Trimeresurus gramineus* snake venom. **Biochem. Biophys. Acta**, **481**: p 622.
- OUYANG, C.; HUANG, T. F. (1983). A potent platelet aggregation inducer from *Trimeresurus gramineus* snake venom. **Biochim. Biophys. Acta**, **761**: p 126.

- OUYANG, C.; TENG, C. M., HUANG, T. (1992). Characterization of snake venom components acting on blood coagulation and platelet function. **Toxicon**, **30**: p 945.
- OUYANG, C.; YANG, F. Y. (1974). Purification and properties of the thrombin-like enzyme from *Trimeresurus gramineus* venom. **Biochem. Biophys. Acta**, **351**: p 354.
- OUYANG, C.; YANG, F. Y. (1976). The effects of the purified thrombin-like enzyme and anticoagulant principle of *Trimeresurus gramineus* venom on blood coagulation in vivo. **Toxicon**, **14**: p 196.
- OUYANG, C.; HUANG, T. F. (1979).  $\alpha$ - and  $\beta$ -Fibrinogenases from *Trimeresurus gramineus* snake venom. **Biochim. Biophys. Acta**, **571**: 270.
- OUYANG, C.; TENG, C. M. CHEN, Y. (1977). Physicochemical properties of  $\alpha$ - and  $\beta$ - fibrinogenases of *Trimeresurus mucrosquamatus* venom. **Biochim. Biophys. Acta**, **481**: 622.
- PANDYA, B. V.; BUDZYNSKI, A. Z. (1984). Anticoagulant proteases from Western diamondback rattlesnake (*Crotalus atrox*) venom. **Biochem.**, **23**: 460.
- PIRKLE, H.; STOCKER, K. (1991). Thrombin-like enzymes from snake venoms: an inventory. **Thromb. haemost.**, **65**: p 444.



- PIRKLE, H.; THEODOR, I.; MIRANDA, D.; SIMMONS, G. (1986). Thrombin like enzyme from the venom of *Crotalus atrox*. NH<sub>2</sub>-terminal and active site amino acid sequences. **Thromb. Res.**, **56**: p 159
- RAN, Y. I.; ZHENG, S.; TU, A. T. (1988). Biochemistral characterization of two hemorrhagic proteases from the venom of *Lachesis muta*. **Chem. Rev. Toxic.**, **1**: 337.
- REICHL, A. P., SERRANO, S. M. T.; ASSAKURA, M. T.; MANDELBAUM, F. R. (1989). Isolation and properties of a phospholipase A2 from the venom of the snake *Bothrops moojeni*. **Mem.Inst. Butantan**, **51**; 225.
- REISFELD, R. A.; LEWIS, J.; WILLIAMS, D. A. (1962). Disc electrophoresis of basic proteins and peptides on polyacrilamide gel. **Nature**, **4838**: p. 281
- ROSENFELD, G. (1971). Symptomatology, pathology and treatment of snake bites in South America. In: **Venomous and their venoms 2**, 345-403 (BUCHERL, W and BUCKLEY, E.E, eds). New York: Academic Press
- ROSSI, A.; CHIERICATO, G.; GIGLIO, J. R. (1972). C. R. Aca. Sc. Paris, t. 275, série D. 267.
- SANCHES, E. F.; MAGALHÃES, A.; DINIZ, C. R. (1987). Purification of a hemorrhagic factor (LHF-1) from the venom of the bush master snake, *Lachesis muta muta*. **Toxicon**, **25**: p 611.

- SAPRU, Z. Z., TU, A. T., BAILEY, G. S. (1983). Purification and characterization of fibrinogenase from the venom of western diamondback rattlesnake (*Crotalus atrox*). **Biochim. Biophys. Acta**, 747: p 225.
- SEEGER, W. H., OUYANG, C. (1979). Snake venoms blood coagulation. In: **Snake venoms, Handbook of Experimental Pharmacology**, 52: p 648 (LEE, c. y., Ed.). Berlin:Springer.
- SELISTRE, H. S.; GIGLIO, J. R. (1987). Isolation and characterization of the a thrombin-like enzyme from the venom of the snake *Bothrops insularis* (jararaca ilhoa). **Toxicon**, 25: p. 1135.
- SERRANO, S. M. T.; MATOS, N. F. C.; MANDELBAUM, F. R.; SAMPAIO, C. A. M. (1993a). Basic proteinases from *Bphtrops moojeni* (caissaca) venom. I Isolation and activity of two serine proteinases MSPI and MSPII on synthetic substrates and on platelet aggregation. **Toxicon**, 31: p 471.
- SERRANO, S. M. T.; SAMPAIO, C. A. M; MANDELBAUM, F. R. (1993b). Basic proteinases from *Bphtrops moojeni* (caissaca) venom. II Isolation of the metalloproteinase MPB. Comparison of the proteolytic activity on natural substrates by MPB, MSPI and MSPII. **Toxicon**, 31: p 483.
- SHIEH, T. C.; TANAKA, S.; KIHARA, H.; OHNO, M.; MAKISUMI, S. (1985). Purification and characterization of a coagulant enzyme from *Trimeresurus flavoviridis* venom. **J. Biochem., Tokyo**, 98: p 713.

- SHIMOKAWA, K.; TAKAHASHI, H. (1995). Comparative study of fibrinogen degradation by four arginine ester hydrolases from the venom of *Agkistrodon caliginosus*. **Toxicon**, **33**: p 179.
- SHU, Y. Y.; MORAN, J. B.; GEREN, C. R. (1983). A thrombin-like enzyme from Timber rattlesnake venom. **Biochim. Biophys. Acta**, **748**: p 236.
- SILBERMAN, S.; BERNIK, M. B.; POTTER, E. V.; KWAAN, H. C. (1973). Effect of ancrod (Arvin) in mice: Studies of plasma fibrinogen and fibrinolytic activity. **Br. J. Haemat.**, **24**: p 101.
- SOARES, A. M. (1997). Caracterização bioquímica parcial das miotoxinas básicas do veneno de *Bothrops moojeni*: Sequência Aminotreminal, Cristalografia e Estudo da transição nativo e Desenovelado. **Dissertação de Mestrado, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.**
- SPACKMAN, D. H.; STEIN, W. R.; MOORES, S. (1958). Automatic recording apparatus for use in the chromatography of amino acids. **Anal. Chem**, **30**: p.1190
- STOCKER, K. (1978). Fibrinolytics and antifibrinolytics. In: **Handbook of Experimental Pharmacology**, **46**: p 451 (MARKWARDT, F., Ed). Berlin: Springer.

- STOCKER, K.; BARLOW, G. H. (1976). The coagulant enzyme from *Bothrops atrox* venom (bathroxobin). In: *Methods in Enzymology* 45 B, 214-233. (LORAND, L., Ed.) New York, Academic Press.
- STOCKER, K.; CHIRIST, W.; LELOUP, P. (1974). Characterization of the venoms of various *Bothrops* species by immunoelectrophoresis and reaction with fibrinogen agarose. *Toxicon*, **12**: p 415.
- STOCKER, K.; MEIER, J. (1988). Thrombin-like snake venom enzyme. In: *Hemostasis and animal venoms*, v 7 (Pirkle, H; Markland, F. S., Jr Edds). New York: Marcel Dekker.
- SUZUKI, T.; OSHIMA, G.; IWANGA, S. (1968). Proteinases from the venom of *Agkistrodon halys blomhoffii*. *J. Biochem*, **57**: p 215.
- SUZUKI, T.; TAKAHASHI, H. (1984). Purification of two thrombin-like enzymes from venom *Akistrodon caliginosis* (Kankoku-mamushi). *Toxicon*, **22**: p 29.
- TENG, C. M.; MA, Y. H.; OUYANG, C. (1985). Action mechanism of the platelet aggregation inducer and inhibitor from *Echis carinatus* snake venom. *Biochim. Biophys. Acta*, **841**: p 8
- TENG, C. M.; WANG, J. P.; HUANG, T. F.; LIAN, M. Y. (1989). Effects of venom proteases or peptide chromogenic substrates and bovine prothrombin. *Toxon*, **27 (2)**: p 161

- TU, A. T. (1977). Phospholipase A2. in: **venoms-chemistry and Molecular Biology**. 23. new York: Wiley.
- UGAROVA, T. P.; MELNIK, V. N.; GORNITSKAYA, O. V. (1985). Thrombin-like enzyme from *Agkistrodon blomhoffii* venom. **Chem. Abst.**, 103: p 2657.
- VESTERBEG, O. (1972). Isoelectric focusing of proteins in polyacrylamide gels. **Biochim. Biophys. Acta**, 257: p 11.
- WAGNER, F. W.; PRESCOTT, J. M. (1968). Leucostoma Peptidase A. **Comp. Biochem. Physiol**, 17: p 191.
- WARE, A. G.; SEEGERS, W. H. (1949). Two stage procedure for the quantitative determination of prothrombin concentration. **Am. J. Clin. Pathol**, 19: p 471.
- ZAGANELLI, G. L.; ZAGANELLI, M. G. M.; DINIZ, C. R., LIMA, M. E. (1996). Purification and characterization of a fibrinogen-clotting enzyme from the venom of jararacuçu (*Bothrops jararacussu*). **Toxicon**, 34: p 807.
- ZHIMIZU, A.; JIMENEZ, E. C., TAKAGI, J.; INADA, Y.; SAITO, Y. (1987). Venom from southern copperhead snake (*Agkistrodon contortrix contortrix*). I Characterization of protease that preferentially releases fibrinopeptide B. **Toxicon**, 25: p751.

ZUZUKI, T. TAKAHASHI, H. (1984). Purification of two thrombin-like enzymes from the venom of *Agkistrodon caliginosus* (Kankoku-Mamushi). **Toxicon**, 20: p 29.