



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

**PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DE TRÊS PROTEASES
PRESENTES NAS PEÇONHAS DE *Bothrops alternatus* E *Bothrops moojeni*:
Balt-F1, Balt-F2 e Bmoo-F**



MON
515.00:598.126
C837P
TE=MEM

Aluna: Júnia de Oliveira Costa

Orientadora: Dra Maria Inês Homsí Brandeburgo

Co-orientador: Dr. Fábio de Oliveira

SISBI/UFU



1000215769

Uberlândia – MG
Outubro – 2004



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

**PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DE TRÊS PROTEASES
PRESENTES NAS PEÇONHAS DE *Bothrops alternatus* E *Bothrops moojeni*:
Balt-F1, Balt-F2 e Bmoo-F**

Aluna: Júnia de Oliveira Costa

Orientadora: Dra Maria Inês Homsí Brandeburgo

Co-orientador: Dr. Fábio de Oliveira

Uberlândia – MG
Outubro – 2004



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

**PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DE TRÊS PROTEASES
PRESENTES NAS PEÇONHAS DE *Bothrops alternatus* E *Bothrops moojeni*:
Balt-F1, Balt-F2 e Bmoo-F**

Aluna: Júnia de Oliveira Costa

Orientadora: Dra Maria Inês Homsí Brandeburgo

Co-orientador: Dr. Fábio de Oliveira

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Uberlândia
como parte dos requisitos para
obtenção do Título de Mestre em
Genética e Bioquímica (Área
Bioquímica)

Uberlândia – MG
Outubro – 2004



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

**PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DE TRÊS PROTEASES
PRESENTES NAS PEÇONHAS DE *Bothrops alternatus* E *Bothrops moojeni*:
Balt-F1, Balt-F2 e Bmoo-F**

Aluna: Júnia de Oliveira Costa

COMISSÃO EXAMINADORA

Presidente: Dra. Maria Inês Homs Brandeburgo (Orientadora)

Examinadores:

Dr. Fábio de Oliveira (Titular)

Dr. José Roberto Giglio (Titular)

Dra. Amélia Hamaguchi (Suplente)

Dra. Suely Vilela (Suplente)

Data da Defesa: 25/10/2004

As sugestões da Comissão Examinadora e as Normas PGGB para o formato da Dissertação foram contempladas

Maria Inês Brandeburgo
(Orientadora)

Uberlândia, 01/11/2004

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho ao meu mestre FÁBIO DE OLIVEIRA, sempre amigo e companheiro e que esteve por perto nos momentos mais importantes da minha vida. São 5 anos de convivência diária e quanto mais o tempo se passa, mais admiração sinto por você.

Fábio, uma pessoa que consegue cativar as pessoas à sua volta sem fazer esforço, simplesmente sendo ele próprio: leal, fraterno e compreensivo. Poderia escrever uma dissertação para falar das suas qualidades.....

Aprendi com você a ser uma pessoa melhor. Você é um exemplo de sabedoria, dedicação e perseverança. Sempre levarei comigo seus ensinamentos e, sobretudo, o seu modelo de vida.

Você sem dúvida nenhuma é e sempre será o meu exemplo do sucesso!

CONTE SEMPRE COMIGO, AMIGÃO!!!!

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a DEUS, por me conceder muitas bênçãos e por me conduzir sempre no caminho certo. Muito obrigada.

À Prof^a Maria Inês Homsí Brandeburgo, pela atenção e incentivo durante nossos trabalhos e, principalmente, por complementar a minha formação acadêmica.

À Prof^a Amélia Hamaguchi, pela contribuição científica dada em todos estes anos de convivência.

Ao Malcon, chefe do Instituto de Genética e Bioquímica, pelo apoio e pelas brincadeiras, particularmente, “ a dança da *Drosóphila*”.

Ao COMPANHEIRÍSSIMO Giban (Gilvan) pela amizade e paciência que sempre demonstrou por mim.

Aos meus amigos pesquisadores do Laboratório de Biofísica: Fernanda, companheira e “arrumadeira” de bancada. Fer, se não dermos certo como cientistas, tenho certeza que emprego de faxineira não vai faltar... À Dri (Adriana) e à Lara, pelo apoio experimental e pelos longos papos durante a hora do almoço. À “Furinho”, Liliane, Nô e Cris, pelas trocas de experiência. À Elaine, que se tornou uma nova amiga e aos ex- biofísicos, mas que não se tornaram ex-amigos: Alexandre e Isabela.

À Marília, pela amizade e dedicação durante a realização dos experimentos.

Aos colegas do Laboratório de Química de Proteínas e Produtos Naturais.

Ao Gerson, secretário do Instituto de Genética e Bioquímica, por toda a atenção dirigida a mim.

À Tianinha e à dona Nenzinha, pela ajuda indispensável no dia-a-dia.

Ao Cleuber, por tudo que já fez por mim e pelos momentos de descontração que tivemos.

À Marlene, pelo excelente convívio e por se mostrar sempre prestativa em todas as ocasiões.

A todos os professores do Instituto de Genética e Bioquímica, em especial ao Foued, Miltinho, Nilson e Dr. Kerr, pela troca de experiências e contribuição na minha formação enquanto docente e pesquisadora.

Ao professor Galo, pelo espaço cedido no Instituto de Ciências Biomédicas.

À Aline, do Laboratório de Fisiologia.

À Bete, secretária da Área de Ciências Fisiológicas e, sobretudo, uma grande amiga.

Aos funcionários Helinho, Reis, Meire e seu Antônio, do Instituto de Ciências Biomédicas.

Aos guardas da UFU, por me acompanharem durante noites e madrugadas até em casa, sempre proporcionando segurança.

À CAPES pelo indispensável apoio financeiro.

À minha mãezinha querida, que sempre me apoiou em todas as situações do cotidiano, sejam elas profissionais ou pessoais. Amo muito você...

À toda a minha família, em especial às minhas avós Aurora e Aparecida.

Ao Michel, pelo carinho e compreensão durante nosso longo tempo de namoro.

LISTA DE ABREVIATURAS

- AMBIC** – Bicarbonato de amônio
- Balt-F1** – Fibrinogenase 1 de *Bothrops alternatus*
- Balt-F2** - Fibrinogenase 2 de *Bothrops alternatus*
- Bis acrilamida** – N, N' metileno-bis-acrilamida
- Bmoo-F** – Fibrinogenase de *Bothrops moojeni*
- DFP** - Diisopropilfluorofosfato
- EDTA** – Ácido etilenodiaminotetracético
- MM** – Massa molecular
- PAGE** – Eletroforese em gel de poliacrilamida
- PB** – Peçonha bruta
- PLA2** – Fosfolipase A2
- PMSF** – Fenilmetilsulfonil fluoreto
- rpm** – Rotações por minuto
- SDS** – Dodecil sulfato de sódio
- TEMED** – N, N, N', N' – tetrametiletlenodiamino
- Tris** – Tris (hidroximetil) aminometano

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

INTRODUÇÃO GERAL

Figura 1: Hidrólise do fibrinogênio por enzimas coagulantes da classe venombin AB, com a liberação de ambos os fibrinopeptídeos (A e B) e a conseqüente formação do polímero de fibrina..... 09

CAPÍTULO 1

Figura 1: Fracionamento da peçonha bruta de *Bothrops alternatus* em coluna de DEAE Sephacel.....27

Tabela 1: Recuperação protéica da enzima Balt-F1 purificada da peçonha bruta de *Bothrops alternatus*.....28

Figura 2: Eletroforese em gel de poliacrilamida a 14 % com agentes desnaturantes para a estimativa da massa molecular da enzima Balt-F1.....29

Figura 3: Curva padrão para a determinação da massa molecular da enzima Balt-F1.....29

Figura 4: Eletroforese em gel de poliacrilamida a 14 % com agentes desnaturantes dos produtos de hidrólise do fibrinogênio bovino, resultantes da ação da enzima Balt-F1.....31

Figura 5: Eletroforese em gel de poliacrilamida a 14 % com agentes desnaturantes dos produtos de digestão do fibrinogênio bovino pela enzima Balt-F1 pré-incubada em vários pHs e em diferentes temperaturas.....32

Figura 6: Eletroforese em gel de poliacrilamida a 14 % com agentes desnaturantes dos produtos de digestão do fibrinogênio bovino pela enzima Balt-F1 pré-incubada com inibidores de proteases.....33

CAPÍTULO 2

Figura 1: Purificação da Balt-F2 da peçonha de *Bothrops alternatus*.....48

Figura 2: Purificação da Bmoo-F da peçonha de *Bothrops moojeni*.....49

Figura 3: Análise em SDS-PAGE das enzimas purificadas.....50

Figura 4: Curva padrão para a determinação da massa molecular das enzimas Balt-F2 e Bmoo-F.....	51
Figura 5: Proteólise do fibrinogênio bovino pela Balt-F2 e pela Bmoo-F.....	52
Figura 6 – Proteólise do fibrinogênio bovino pela Balt-F2 e pela Bmoo-F pré-incubadas com inibidores de proteases.....	53
Tabela 1: Efeito dos inibidores da atividade proteolítica sobre a azocaseína induzida pela enzima Bmoo-F.....	53
Figura 7. Eletroforese em gel de poliacrilamida a 14 % com agentes desnaturantes dos produtos de digestão do fibrinogênio bovino pela enzima Bmoo-F pré-incubada em vários pHs e em diferentes temperaturas.....	54

SUMÁRIO

<u>1. RESUMO GERAL</u>	1
<u>2. INTRODUÇÃO GERAL</u>	3
<u>3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</u>	11
<u>4. CAPÍTULO 1</u>	
Purificação de uma enzima fibrinogenolítica da peçonha da serpente <i>Bothrops alternatus</i>	19
Abstract.....	20
Resumo.....	21
1.Introdução	22
2.Material e Métodos	23
2.1 Obtenção da peçonha bruta de <i>Bothrops alternatus</i>	23
2.2 Cromatografia, eletroforese.....	23
2.3. Padrões para determinação da massa molecular.....	23
2.4 Atividades enzimáticas.....	23
2.5 Fracionamento da peçonha bruta de <i>Bothrops alternatus</i>	23
2.6. Determinação quantitativa de proteínas.....	24
2.7. Eletroforese em gel de poliacrilamida com agentes desnaturantes para a estimativa da Massa Molecular.....	24
2.8. Teste de degradação do fibrinogênio bovino.....	24
2.9 Efeito de agentes inibidores sobre a atividade fibrinogenolítica.....	25
2.10 Efeitos do pH e temperatura sobre a atividade fibrinogenolítica.....	25
2.11 Atividade coagulante sobre o plasma bovino.....	25
2.12 Atividade hemorrágica.....	25
2.13 Atividade desfibrinogenante.....	25
2.14 Atividade fosfolipásica A2 (PLA2).....	26
3.Resultados e Discussão	27
3.1 Fracionamento da peçonha bruta de <i>Bothrops alternatus</i>	27

3.2. Eletroforese em gel de poliacrilamida com agentes desnaturantes para a estimativa da Massa Molecular.....	28
3.3 Teste de degradação do fibrinogênio bovino.....	30
3.4 Efeitos do pH e temperatura sobre a atividade fibrinogenolítica.....	31
3.5 Efeito de agentes inibidores sobre a atividade fibrinogenolítica.....	32
4. Conclusão.....	34
5. Referências bibliográficas.....	35

5. CAPÍTULO 2

Purificação e caracterização parcial de duas proteases isoladas das peçonhas de <i>Bothrops alternatus</i> e <i>Bothrops moojeni</i>.....	39
Abstract.....	40
Resumo.....	41
1. Introdução.....	42
2. Material e Métodos.....	43
2.1 Material.....	43
2.2 Purificação da Balt-F2.....	43
2.3 Purificação da Bmoo-F.....	43
2.4 Determinação do peso molecular.....	44
2.5 Determinação quantitativa de proteínas.....	44
2.6 Atividade fibrinogenolítica.....	44
2.7 Atividade desfibrinogenante.....	44
2.8 Inibidores enzimáticos.....	45
2.9. Efeitos do pH e temperatura sobre a atividade fibrinogenolítica.....	45
2.10 Atividade coagulante sobre o plasma bovino.....	45
2.11 Atividade hemorrágica.....	45
2.12 Atividade fosfolipásica A2 (PLA2).....	46
2.13. Atividade azocaseinolítica.....	46
2.14 Efeito dos inibidores da atividade proteolítica sobre a azocaseína induzida pela enzima Bmoo-F.....	46
3. Resultados.....	47
3.1 Purificação da Balt-F2.....	47
3.2 Purificação da Bmoo-F.....	47

3.3 Eletroforese em gel de poliacrilamida com agentes desnaturantes para a estimativa da Massa Molecular.....	50
3.4 Atividade fibrinogenolítica de Balt-F2 e Bmoo-F.....	51
3.5 Efeito dos inibidores sobre a atividade de Balt-F2 e Bmoo-F.....	52
3.6 Atividade desfibrinogenante de Balt-F2 e Bmoo-F.....	54
3.7. Efeitos do pH e temperatura sobre a atividade fibrinogenolítica da Bmoo-F.....	54
4. Discussão.....	55
5. Conclusão.....	58
6. Referências bibliográficas.....	59
<u>6. CONCLUSÃO GERAL.....</u>	64
<u>7. ANEXOS.....</u>	66

7.1 O trabalho intitulado "Purificação de uma enzima fibrinogenolítica da peçonha da serpente *Bothrops alternatus*", autoria de Júnia de Oliveira Costa; Cristiani Baldo; Amélia Hamaguchi; Maria Inês Homsí Brandeburgo; Fábio de Oliveira, foi aceito para publicação na Revista Bioscience Journal, v. 19, n. 3, Sept./Dec. 2003, pgs. 147-153.

1. RESUMO GERAL

Este trabalho descreve a purificação e a caracterização bioquímica parcial de duas proteases das peçonhas de *Bothrops alternatus* (Balt-F1 e Balt-F2) e uma de *Bothrops moojeni* (Bmoo-F). As enzimas foram purificadas em colunas cromatográficas contendo as resinas DEAE Sephacel, Sephadex G-75 e Heparina-Agarose. O peso molecular aparente analisado em SDS-PAGE sob condições redutoras, mostrou bandas homogêneas de 26.200, 29.900 e 24.800, respectivamente. Todas as enzimas hidrolisaram as cadeias A- α e B- β do fibrinogênio bovino. A Balt-F1 não apresentou atividades coagulante e desfibrinogenante. As enzimas Balt-F2 e Bmoo-F, quando injetadas i.p. tornaram o sangue de camundongos incoagulável. A inibição da atividade proteolítica sobre o fibrinogênio bovino das enzimas Balt-F1, Balt-F2 e Bmoo-F por agentes quelantes de íons metálicos, permite classificá-las como metaloproteases.

2. INTRODUÇÃO GERAL

O sistema responsável pela produção da peçonha de serpentes é composta por glândulas exócrinas modificadas que produzem a substância tóxica.

As peçonhas ofídicas, especialmente do gênero *Bothrops*, caracterizada atualmente como a de maior importância médica no Brasil, tem sido extensamente estudada nos últimos anos (PERALES e DOMONT, 2003).

O gênero *Bothrops* compreende cerca de 19 espécies, distribuídas por todo o território nacional e são responsáveis pela maioria dos acidentes na cidade de Uberlândia e região, causando várias complicações para a população local (NISHIOKA e SILVEIRA, 1992).

Entre 1984 e 1991, a maioria dos acidentes ofídicos confirmados e registrados pelo Hospital das Clínicas de Uberlândia (UFU), foi por *Bothrops moojeni* (NISHIOKA e SILVEIRA, 1992). O segundo e terceiro lugar foram ocupados pelas espécies *Bothrops neuwiedi* e *Bothrops alternatus*, respectivamente.

As serpentes *Bothrops alternatus* são geralmente encontradas em vegetação rasteira, perto de rios e lagos ou em plantações, ao passo que as *Bothrops moojeni* vivem em áreas mais secas. A distribuição geográfica de ambas as espécies se estende aos estados do Paraná, Mato Grosso do Sul, São Paulo e Minas Gerais, especialmente a região do Triângulo Mineiro.

As peçonhas de serpentes possuem diversos componentes tóxicos que mostram características clínicas que requerem tratamentos alternativos. As anti-peçonhas ofídicas específicas representam os antídotos mais eficazes para neutralizar os efeitos dos envenenamentos e são produzidas e utilizadas no tratamento há décadas (LALLOO e THEAKSTON, 2003).

O quadro clínico observado no envenenamento botrópico pode ser didaticamente dividido em sistêmico e local (MANUAL DE DIAGNÓSTICO E TRATAMENTO DE ACIDENTES POR ANIMAIS PEÇONHENTOS, 1999). As manifestações sistêmicas são caracterizadas principalmente por distúrbios na hemostasia, caracterizados por deficiência na coagulação, alteração na agregação plaquetária e depleção de fibrinogênio (HATI et al., 1999). A seqüência destes eventos culmina em sangramentos de ferimentos cutâneos pré-existentes e hemorragias à distância, como por exemplo a gengivorragia. Ainda em nível sistêmico, também se observa sudorese, hipotensão arterial e hipotermia

(CARDOSO, 1997). As manifestações locais são caracterizadas por dor e edema persistentes no local da picada, de intensidade variável e, em geral, de instalação precoce e caráter progressivo. Equimoses (manchas roxas que resultam do extravasamento de sangue no tecido celular) e hemorragias no ponto da picada são freqüentes e bolhas podem aparecer na evolução do quadro clínico, acompanhado ou não de necrose (CARDOSO, 1997). A associação entre equimose e necrose pode ser atribuída aos componentes hemorrágicos da peçonha (RIBEIRO et al., 2001)

Nos casos mais graves, o dano tecidual pode resultar em sérias seqüelas, tais como a perda funcional ou permanente do tecido ou do membro afetado. A magnitude dos efeitos locais em envenenamentos botrópicos depende basicamente da quantidade de peçonha inoculada, do tempo entre a picada e o início da soroterapia, do peso e idade do paciente, da região anatômica onde ocorreu a picada e do eventual uso de torniquete (FRANÇA, 1997).

Animais peçonhentos desenvolveram poderosas peçonhas, arsenais químicos com substâncias capazes de atordoar, paralisar ou matar outros organismos (MCCORMIC e MEINWALD, 1993).

{ Peçonhas de serpentes são ricas em compostos farmacológicos ativos que apresentam um largo espectro de atividades biológicas (BAILEY et al., 2001). Essas peçonhas são usualmente compostas de uma mistura complexa de proteínas, enzimas, peptídeos e componentes inorgânicos. O estudo de peçonhas das serpentes apresentam informações importantes em sistemas biológicos e em introspecções a cerca de problemas médicos (BAILEY et al., 2001; BALSINDE, et al., 1999; MARSH, 2001). }

{ Estas peçonhas, particularmente as pertencentes às famílias Crotalidae e Viperidae, contêm uma larga variedade de proteases que afetam diferentes etapas da cascata de coagulação sangüínea. Peçonhas de serpentes da família Viperidae são compostas de enzimas proteolíticas que apresentam atividades coagulante e anticoagulante (ESTEVAO-COSTA et al., 2000). }

Este aparente paradoxo em que a peçonha desencadeia incoagulabilidade *in vivo* e coagulação do plasma *in vitro*, tem sido atribuído à presença de enzimas coagulantes (Thrombin-like) presentes em peçonhas de serpentes (STOCKER, 1990b).

Um grupo importante de enzimas proteolíticas encontradas nas peçonhas botrópicas é formado pelas **metaloproteases**. As metaloproteases compreendem uma série de enzimas dependentes de zinco com variada massa molecular que são responsáveis pelo efeito hemorrágico característico destes envenenamentos (BJARNASON e FOX, 1994). As metaloproteases de peçonha de serpentes (SVMP) também são classicamente conhecidas como toxinas hemorrágicas, embora existam exceções com relação à sua atividade hemorrágica. A estrutura das metaloproteases contém, além do domínio catalítico, um domínio disintegrina e um domínio rico em cisteína. A atividade hemorrágica das diferentes metaloproteases é variável, dependendo de sua estrutura.

O cátion sódio é o íon mais abundante em peçonhas de serpentes, embora sua função ainda não seja totalmente conhecida. Os íons zinco e cálcio estão presentes em muitas metaloproteases de peçonhas ofídicas. Os carboidratos estão principalmente presentes na forma de glicoproteínas (TU, 1982).

Com base em seus domínios estruturais, as metaloproteases de peçonha podem ser classificadas em 4 classes distintas (HITE et al., 1994):

- **PI:** Metaloproteases que possuem somente o domínio catalítico;
- **PII:** Metaloproteases que possuem o domínio catalítico seguido por um domínio disintegrina;
- **PIII:** Metaloproteases formadas pelo domínio catalítico, domínio disintegrina e o domínio rico em cisteína;
- **PIV:** Compreende um grupo de enzimas que possuem, além dos três domínios descritos na classe PIII, um polipeptídeo tipo lectina, ligado por uma ponte dissulfeto à cadeia polipeptídica da metaloprotease.

A Basparina A, isolada da peçonha de *Bothrops asper*, é uma metaloprotease da classe P-III que induz trombose e desfibrinogenação (LORÍA et al., 2003). Da mesma forma, a jararagina, isolada da peçonha de *Bothrops jararaca*, também é uma SVMP da classe P-III (PAINE et al., 1992).

Em contraste, BaP1 é uma metaloprotease da classe P-I, a qual consiste de um único domínio metaloprotease (GUTIÉRREZ et al., 1995, WATANABE et al., 2003).

Outras toxinas presentes no veneno botrópico também estão envolvidas na atividade hemorrágica por agirem sobre fatores da coagulação e induzirem a

transformação direta (componentes tipo-trombina) ou indireta (componentes pró-coagulantes) do fibrinogênio plasmático em fibrina (KAMIGUTI e SANOMARTINS, 1995).

A coagulação sistêmica e coagulopatia estão associadas com envenenamento por serpentes da família Viperidae. Muitas metaloproteases dessas peçonhas são importantes toxinas hemorrágicas (BJARNASON e FOX, 1994) e outras contribuem para distúrbios da coagulação, ativando os fatores II e X (MARKLAND, 1998), degradando o fibrinogênio e o fator de von Willebrand (KAMIGUTI et al., 1996a) e inibindo a agregação plaquetária dependente de colágeno (KAMIGUTI et al., 1996b; JIA et al., 1997 e ESTÊVAO-COSTA et al., 2000).

As **serinoproteases** presentes na peçonha botrópica são caracterizadas principalmente como proteases com atividade tipo trombina (KAMIGUTI e SANOMARTINS, 1995).

O mecanismo de coagulação sangüínea consiste em reações distintas envolvendo a conversão de fatores inativos em serino proteases ativas. Durante o último estágio do processo de coagulação, a trombina promove a conversão do último estágio do processo de coagulação, a trombina promove a conversão do fibrinogênio em coágulo de fibrina e a estabilização desse polímero, devido à ativação do fator XIII da cascata de coagulação. A liberação dos fibrinopeptídeos A (FPA) e B (FPB) requer a hidrólise das ligações Arg16---Gly e Arg15---Gly na região amino-terminal das cadeias A e B do fibrinogênio, respectivamente (BAILEY e BETTELHEIM, 1955).

Algumas enzimas coagulantes ("Thrombin-like") de peçonhas de serpentes exibem um mecanismo de ação semelhante à trombina. Baseado na velocidade de liberação dos fibrinopeptídeos A e B do fibrinogênio, tais enzimas são organizadas em três grupos (MARKLAND, 1998). O primeiro libera preferencialmente o fibrinopeptídeo A (grupo venombin A) e este inclui Ancrod, isolado de *Agkistrodon rhodostoma* (NOLAN et al., 1976), Batroxobina de *Bothrops atrox* (STOCKER e BARLOW, 1976), uma thrombin-like análoga à giroxina, purificada da peçonha de *Lachesis muta muta* (DA SILVA et al., 1989, SILVEIRA et al., 1989 e MAGALHAES et al., 1993) e Crotalase, isolada de *Crotalus adamanteus* (MARKLAND e DAMUS, 1971). Essas enzimas não ativam

o fator XIII ou outros fatores da coagulação e não causam agregação plaquetária (HUTTON e WARRELL, 1993 e MARSH, 1994).

Algumas dessas thrombin-like, particularmente do grupo venombin A, tem potencial uso clínico para o tratamento de doenças humanas, como agentes desfibrinogénantes e são largamente usadas em laboratórios na detecção de fibrinogênio em amostras de sangue heparinizado. Essas enzimas têm sido purificadas de diferentes espécies de serpentes (STOCKER, 1990b). O segundo grupo (classe venombin AB) de enzimas coagulantes, que liberam ambos os fibrinopeptídeos A e B e ativam o fator XVIII, é representado pela enzima da peçonha de *Bitis gabonica* (*Gaboon viper*) (GAFFNEY et al., 1973). A figura 1 mostra o mecanismo de ação das enzimas coagulantes da classe venombin AB.

A terceira classe de enzimas coagulantes (venombin B), que libera preferencialmente o fibrinopeptídeo B, é representado por uma enzima da peçonha *Agkistrodon contortrix contortrix* (HERZIG et al., 1970).

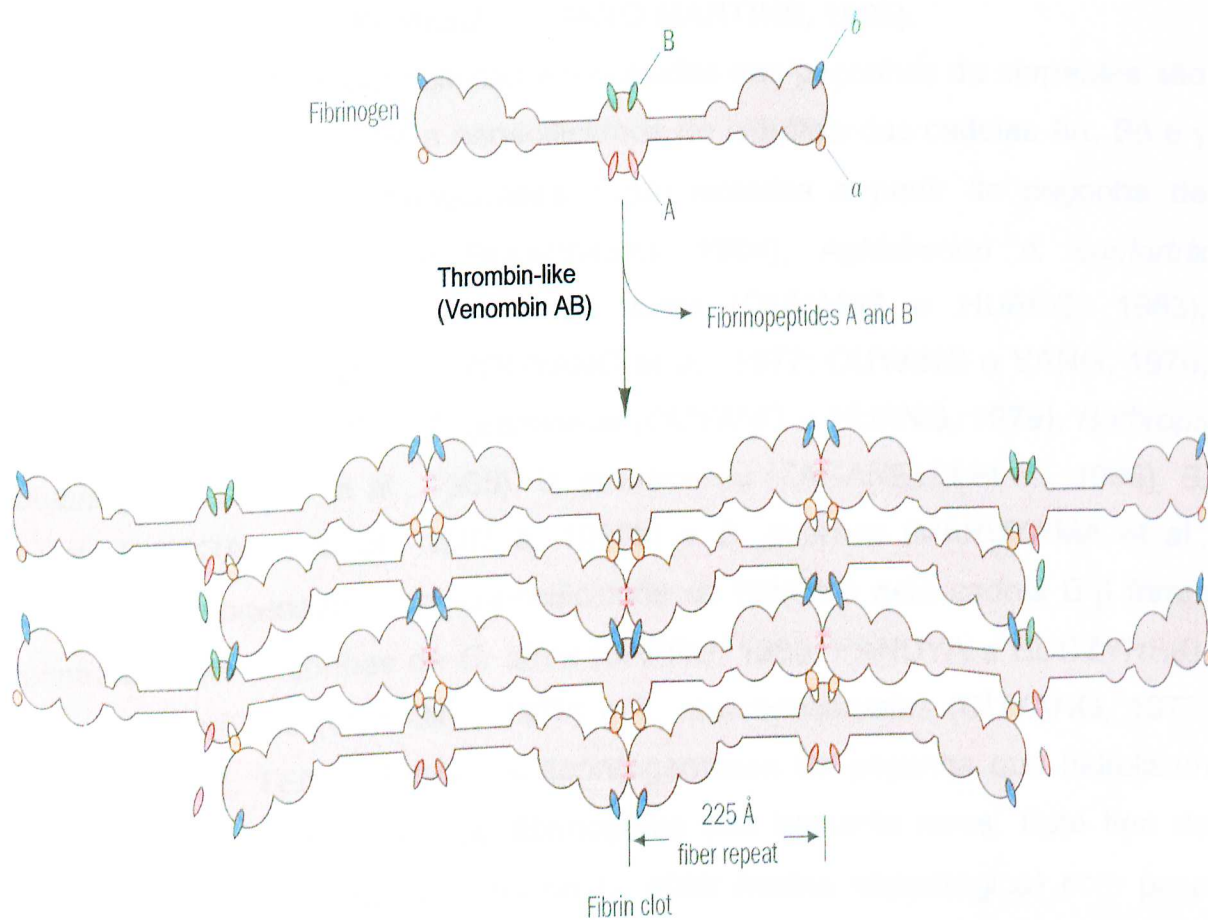


Figura 1: Hidrólise do fibrinogênio por enzimas coagulantes da classe venombin AB, com a liberação de ambos os fibrinopeptídeos (A e B) e a conseqüente formação do polímero de fibrina.

Há ainda na peçonha, componentes com ação fibrinolítica/fibrinogenolítica direta (MARUYAMA et al., 1992) e proteínas que podem alterar a função plaquetária, inibindo ou ativando-a, contribuindo desta forma para que o quadro hemorrágico se agrave (KAMIGUTI e SANO-MARTINS, 1995).

As enzimas fibrinogenolíticas encontradas nas peçonhas de serpentes são classificadas de acordo com a especificidade de hidrólise das cadeias $A\alpha$, $B\beta$ e γ do fibrinogênio. As α fibrinogenases foram isoladas a partir da peçonha 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), *B. jararacussu* (ZAGANELLI et al., 1996), *B. moojeni* (SERRANO et al., 1993 a, 1993b) e *B. jararaca* (MARUYAMA et al., 1992). As fibrinogenases com especificidade de hidrólise pela cadeia $B\beta$ foram encontradas nas peçonhas de *C. atrox* (SAPRU, 1983; PANDYA e BUDZYNSKI, 1984), *T. gramineus* (OUYANG, 1979) e *T. mucrosquamatus* (OUYANG, 1977; OUYANG, 1976; TENG, 1985). As fibrin(ogen)ases de peçonha que hidrolisam preferencialmente a cadeia γ do fibrinogênio são bastante raras. Este tipo de protease foi purificada da peçonha de *C. atrox* (toxina hemorrágica) com peso molecular de 64.000 (NIKAI et al., 1984).

Algumas enzimas fibrinogenolíticas, incluindo metaloproteases e enzimas coagulantes, estão sendo estudadas para uma possível aplicação clínica no tratamento de doenças trombóticas vasculares (MARKLAND, 1998).

Ancrod e Batroxobina têm sido usadas em combinação com componentes trombolíticos, como agentes desfibrinogenantes em algumas condições clínicas em modelos caninos de trombose arterial (CERCEK et al., 1987; TOMARU et al., 1988). A Batroxobina ativada previne a reoclusão coronária arterial, enquanto Ancrod eleva o efeito de agentes trombolíticos em modelos de trombose arterial da carótida, provavelmente pela depleção do fibrinogênio e prevenindo a propagação do trombo existente.

Este trabalho descreve a purificação e a caracterização bioquímica de duas proteases da peçonha de *Bothrops alternatus* (Balt-F1 e Balt-F2) e uma de *Bothrops moojeni* (Bmoo-F).

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ASSAKURA, M. T.; REICHL, A. P.; ASPERTI, M. C. A.; MANDELBAUM, F. R. Isolation of the major proteolytic enzyme from the venom of the snake *Bothrops moojeni* (Caissaca). **Toxicon**, v. 23, p. 691-706, 1985.
- BAILEY, K. and BETTELHEIM, F. R. The clotting of fibrinogen I. The liberation of peptide material. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 18, p. 495-503, 1955.
- BAILEY, P.; WILCE, J. Venom as a source of useful biologically active molecules. **Emerg. Med. (Fremantle)**, v. 13, p. 28-36, 2001.
- BALSINDE, J., BALBOA, M. A., INSEL, P. A. and DENNIS, E. A. Regulation and inhibition of phospholipase A2. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, v. 39, p. 175-189, 1999.
- BJARNASON, J.B.; FOX, J.W. Hemorrhagic metalloproteinases from snake venoms, **Pharmacol. Ther.**, v. 62, p. 352-372, 1994.
- CARDOSO, J.L.C. Ofídios – *Bothrops* (jararaca, cruzeira). In: Nicolela A; Barros E; Torres JB *et al.* eds. **Acidentes com Animais Peçonhentos - Consulta Rápida - Porto Alegre - Ministério da Saúde**, 1997.
- CERCEK, A. S. LEW , H. HOD , J. YANO , B. LEWIS , K. N. N. REDDY and W. GANZ. Ancrod enhances the thrombolytic effect of streptokinase and urokinase • **Thrombosis Research**, v. 47, p. 417-426, 1987.
- DA SILVA, N. J.; AIRD, S. D.; SEEBART, C. and I. I. A gyroxin analog from the venom of the bushmaster (*Lachesis muta muta*) **Toxicon**, v. 27, p. 763-771, 1989.
- ESTÊVÃO-COSTA, M. I.; DINIZ, C. R.; MAGALHÃES, A.; MARKLAND, F. S.; SANCHEZ, E. F. Action of metalloproteinases mutalysin I and II on several components of the hemostatic and fibrinolytic systems. **Thromb Res.** V. 99, n. 4, p. 363-376, 2000.

- FRANÇA, F.O.S. **Associação da venenemia e da gravidade em acidentes botrópicos, no momento da admissão no Hospital Vital Brasil do Instituto Butantan/SP, com variáveis epidemiológicas, clínicas e laboratoriais.** São Paulo, 1997. Tese (Doutorado) -Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
- GAFFNEY, P and BRASHER, M. ANCROD AND ITS ACTIVITIES CORRESPONDENCE. **The Lancet**, v. 302, p. 1502-1503 ,1973.
- GUTIÉRREZ, J. M. et al. Skeletal muscle necrosis and regeneration after injection of BaH1, a hemorrhagic metalloproteinase isolated from the venom of the snake *Bothrops asper* (Terciopelo). **Experimental and Molecular Pathology**, v. 62, n. 1, p. 28-41, San Diego. Feb. 1995.
- HATI, R.; MITRA, P.; SARKER, S.; BHATTACHARYYA, K.K. Snake venom hemorrhagins. **Crit. Rev. Toxicol.**, v. 29, p. 1-19, 1999.
- HERZIG, R. H.; RATNOFF, O. D.; SHAINOFF, J. R. Studies on a procoagulant fraction of southern copperhead snake venom: the preferential release of fibrinopeptide B. **J. Lab. Clin. Med.**, v. 76, p. 451, 1970.
- HITE, L.A.; JIA, L.G.; BJARNASON, J.B; FOX, J.W. cDNA sequences for four snake venom metalloproteinases: structure, classification, and their relationship to mammalian reproductive proteins. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 308, p. 182-191, 1994.
- HUTTON, R. A., WARREL, D. A. Action of snake venom components on the haemostatic system. **Blood. Rev.**, v. 7, p. 176-189, 1993.
- JIA, L.G., WANG X.M., J.D. SHANNON, J.B. BJARNASON & J.W. FOX. Function of disintegrin-like/cys-teine-rich domain of atrolysin A: inhibition of platelet aggregation by recombinant protein and peptide antagonists. **J. Biol. Chem.**, v. 272: 13094-13102, 1997.

KAMIGUTI, A. S.; SANO-MARTINS, I. S. South American snake venoms affecting haemostasis. *J. Toxicol. Toxin Rev*, v. 14, p. 359 – 374, 1995.

KAMIGUTI, A. S.; HAY, C. R. M.; THEAKSTON, R. D. G and ZUZEL, M. Disruption of haemostasis by jararhagin, a haemorrhagic metalloproteinase from *Bothrops jararaca* venom. *Toxicon*, v. 34, p. 731-732, 1996a.

KAMIGUTI, A.S.; HAY, C.R.M.; ZUZEL, M. Inhibition of collagen-induced platelet aggregation as the result of cleavage of $\alpha_2\beta_1$ -integrin by the snake venom metalloproteinase Jararhagin. *Biochem. J.*, v. 320, p. 635-641, 1996b.

LALLOO, D.G., THEAKSTON, R.D. Snake antivenoms. *J. Toxicol. Clin. Toxicol.*, v. 41, p. 277–290; p. 317–327, 2003.

LORÍA, G. D.; RUCAVADO, A.; KAMIGUTI, A. S.; THEAKSTON, R. D. G.; FOX, J. W.; ALAPE, A. and GUTIÉRREZ, J. M. Characterization of 'basparin A,' a prothrombin-activating metalloproteinase, from the venom of the snake *Bothrops asper* that inhibits platelet aggregation and induces defibrination and thrombosis. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 418, p. 13-24, 2003.

MAGALHAES, A.; FONSECA, B. C. B.; DINIZ, C. R.; GILROY, J. and RICHARDSON, M. The complete amino acid sequence of a thrombin-like enzyme/gyroxin analogue from venom of the bushmaster snake (*Lachesis muta muta*). *FEBS Letters*, v. 329, p.116-120, 1993.

MARKLAND, F. S. and DAMUS, P. S. Purification and properties of a thrombin-like enzyme from the venom of *Crotalus adamanteus* (Eastern diamondback rattlesnake). *J Biol Chem*, v. 246, p. 6460-6473, 1971.

MARKLAND, F. S.; REDDY, K. N. N.; GUAN, A. L. 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. 1988.

- MARKLAND, F.S. 1998. Snake venoms and the hemostatic system. **Toxicon**, v. 36, p. 1749-1800, 1998.
- MARSH, NA: Snake venoms affecting the haemostatic mechanism - a consideration of their mechanisms, practical applications and biological significance. **Blood Coagul Fibrinolysis**; v. 5, p.:399-410, 1994.
- MARSH, NA. Diagnostic uses of snake venom. **Haemostasis**, v. 31, p. 211-217, 2001.
- MARUYAMA, M.; SUGIKI, M.; YOSHIDA, E.; MIHARA, H.; NAKAJIMA, N. Purification and characterization of two fibrinolytic enzymes from *Bothrops jararaca* (jararaca) venom. **Toxicon**, v. 30, p. 853-864, 1992.
- MCCORMICK, K. D.; MEINWALD, J. Neurotoxic acylpolyamines from spider venoms. **J. Chem. Ecology**, v. 19, p. 2411-2451, 1993.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. Fundação Nacional de Saúde. **Manual de Diagnóstico e Tratamento de Acidentes por Animais Peçonhentos**. Brasília, 58p, 1999.
- NIKAI, T.; MORI, N.; KISHIDA, M.; SUGIHARA, H.; TU, A. T. Isolation and biochemical characterization of hemorrhagic toxin from the venom of *Crotalus atrox*. **Arch. Biochem. Biophys**, p. 231-309, 1984.
- NISHIOKA S. A e SILVEIRA P. V. P. A clinical and epidemiologic study of 292 cases of lance-headed viper bite in a Brazilian teaching hospital. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 47, p. 805-810, 1992.
- NOLAN, C.; HALL, L. S. and BARLOW, G. H. Ancrod, the coagulating enzyme from Malayan pit viper (*Agkistrodon rhodostoma*) venom. **Methods in Enzymology**, v. 45, p. 205-213, 1976.

OUYANG, C. and FUN-YUN YANG, F-Y. The effects of the purified thrombin-like enzyme and anticoagulant principle of *Trimeresurus gramineus* venom on blood coagulation *in vivo*. **Toxicon**, v. 14, p. 197-201, 1976.

OUYANG, C; TENG, C. M. CHEN, Y. Physicochemical properties of α - and β -fibrinogenases of *Trimeresurus mucrosquamatus* venom. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 481, p. 622-630, 1977.

OUYANG, C.; HUANG, T. F. α and β -Fibrinogenases from *Trimeresurus gramineus* snake venom. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Enzymology**, v. 571, p. 270-283, 1979.

OUYANG, C.; HUANG, T. F. A potent platelet aggregation inducer from *Trimeresurus gramineus* snake venom. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, v. 761, p. 126-134, 1983.

PAINE, M. J. I.; DESMOND, H. P., THEAKSTON, R. D. G. and CRAMPTON, J. M. **J. Biol. Chem.**, v. 267, p. 22869-22876, 1992.

PANDYA, B. V.; BUDZYNSKI, A. Z. Anticoagulant proteases from Western diamondback rattlesnake (*Crotalus atrox*) venom. **Biochem.** v. 23, p. 460-470, 1984.

PERALES, J.; DOMONT, G.; LIZANO, S. Natural phospholipase A2 myotoxin inhibitor proteins from snakes, mammals and plants. **Toxicon**, v. 42, p. 963-977, 2003.

RIBEIRO, L. A.; JORGE, M. T.; LEBRÃO, M. L. Prognostic factors for local necrosis in *Bothrops jararaca* (Brazilian pit viper) bites. **Transactions of the royal society of tropical medicine and hygiene**, v. 95, p. 630-634, 2001.

SAPRU, Z. Z.; ANTHONY T. TU, A. T. and GRAHAM S. BAILEY, G. S. Purification and characterization of a fibrinogenase from the venom of Western

Diamondback rattlesnake (*Crotalus atrox*). **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)** - Protein Structure and Molecular Enzymology, v. 747, p. 225-231, 1983.

SERRANO, S. M. T.; MATOS, N. F. C.; MANDELBAUM, F. R.; SAMPAIO, C. A. M. Basic proteinases from *Bpithrops moojeni* (caissaca) venom. I Isolation and activity of two serine proteinases MSPI and MSPII on synthetic substrates and on platelet aggregation. **Toxicon**, v. 31, p. 471-481, 1993a.

SERRANO, S. M. T.; SAMPAIO, C. A. M.; MANDELBAUM, F. R. Basic proteinases from *Bpithrops moojeni* (caissaca) venom. II Isolation of the metalloproteinase MPB. Comparison of the proteolytic activity on natural substrates by MPB, MSPI and MSPII. **Toxicon**, v. 31, p. 483-492, 1993b.

SILVEIRA, A. M. V.; MAGALHÃES, A.; DINIZ, C. R. and OLIVEIRA, E. B. Purification and properties of the thrombin-like enzyme from the venom of *Lachesis muta mvta*. **International Journal of Biochemistry**, v. 21, p. 863-871, 1989.

STOCKER, K. F.; BARLOW, G. H. The coagulant enzyme from *Bothrops atrox* venom (Batroxobin). **Methods in Enzymology**, v. 45, p. 214-223, 1976.

STOCKER K. Snake venom protein affecting hemostasis and fibrinolysis. In **Medical Use of Snake Venom Proteins**, ed. K. F. Stocker, pp. 97-160. CRC press, Boca Raton, 1990b.

TENG, C. M.; YUNN-HWA, M. A. and OUYANG, C. Action mechanism of the platelet aggregation inducer and inhibitor from *Echis carinatus* snake venom. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)** - General Subjects, v. 841, p. 8-14, 1985.

TOMARU, T. ; UCHIDA, Y.; NAKAMURA, F.; SONOKI, H. and SUGIMOTO, T. Fiberoptic angioscopy of cardiac chambers, valves, and great vessels using a

- guiding balloon catheter in dogs. **American Heart Journal**, v. 115, p. 1297-1302, 1988.
- TU, A. T. Chemistry of rattlesnake venoms. In: **Rattlesnake venoms, their actions and treatment**. New York, Marcel Dekker. 1982.
- WATANABE, L., SHANNON, J.D., VALENTE, R. H., RUCAVADO, A., ALAPEGIRON, A., KAMIGUTI, A.S., THEAKSTON, R.D.G, FOX, J.W., GUTIÉRREZ, J.M., ARNI, R.K. Amino acid sequence and crystal structure of BaP1, a metalloproteinase from *Bothrops asper* snake venom that exerts multiple tissue-damaging activities. *Protein Science*. , v.12, p. 2273 - 2281, 2003.
- ZAGANELLI, G. L.; ZAGANELLI, M. G. M.; DINIZ, C. R., LIMA, M. E. Purification and characterization of a fibrinogen-clotting enzyme from the venom of jararacuçu (*Bothrops jararacussu*). **Toxicon**, v. 34, p. 807-819, 1996.

4. CAPÍTULO 1

PURIFICAÇÃO DE UMA ENZIMA FIBRINOGENOLÍTICA DA
PEÇONHA DA SERPENTE *Bothrops alternatus*

ABSTRACT: This work describes the purification of a fibrinogenolytic enzyme from *Bothrops alternatus* snake venom. The enzyme, named Balt-F1, was purified using a single step chromatography on DEAE Sephacel. Balt-F1 was shown to be homogeneous with molecular weight of about 26,200 and 21,200, in the presence and absence of β -mercaptoethanol, as demonstrated by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. Balt-F1 represents about 2.2 % of the total venom protein and it is devoid of hemorrhagic, phospholipase A2, blood-clotting and defibrinating activities and shows a high proteolytic activity towards A- α and B- β chains of bovine fibrinogen. The inhibition of the fibrinogenolytic activity of Balt-F1 by chelant compounds such as EDTA and 1,10-phenantroline supports its classification as a metalloproteinase.

RESUMO: Este trabalho descreve a purificação de uma enzima fibrinogenolítica da peçonha de *Bothrops alternatus*. A enzima, denominada Balt-F1, foi purificada utilizando um simples passo de cromatografia em coluna de DEAE Sephacel. A análise por eletroforese em gel de poliacrilamida com agentes desnaturantes (SDS-PAGE) mostra que essa enzima apresenta uma banda homogênea com peso molecular aparente de 26.200 e 21.200, na presença e na ausência do agente redutor β -mercaptoetanol, respectivamente. A enzima Balt-F1 representa cerca de 2,2 % da peçonha total e é desprovida de atividades hemorrágica, fosfolipásica A2, coagulante e desfibrinogenante e possui atividade proteolítica sobre as cadeias A- α e B- β do fibrinogênio bovino. A inibição da atividade fibrinogenolítica da enzima Balt-F1 por agentes quelantes de íons metálicos como EDTA e 1,10-fenantrolina permite classificá-la como metaloprotease.

1. INTRODUÇÃO

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

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

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

A complexa lesão causada por essa peçonha se deve à somatória dos efeitos isolados dos diferentes componentes, com ações biológicas distintas ou com ação sinérgica. Os principais constituintes das peçonhas relacionados com os efeitos locais são as proteases, fosfolipases e miotoxinas.

Neste trabalho descrevemos a purificação de uma enzima fibrinogenolítica presente na peçonha de *Bothrops alternatus*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Obtenção da peçonha bruta de *Bothrops alternatus*

A peçonha bruta de *B. alternatus* foi gentilmente doada pela Prof^a. Dra. Vera Lúcia de Campos Brites, do Instituto de Biologia da Universidade Federal de Uberlândia (INBIO - UFU). A peçonha foi dessecada a vácuo e armazenada a -20 °C até o momento do uso.

2.2 Cromatografia, eletroforese

A resina DEAE Sephacel e os reagentes: acrilamida, bis-acrilamida, N, N, N', N' - tetrametiletileno-diamino (TEMED), dodecil sulfato de sódio (SDS), azul brilhante de coomassie, ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), soroalbumina bovina, azul de bromofenol, β -mercaptoetanol e persulfato de amônio foram adquiridos da Amersham Pharmacia Biotech.

2.3. Padrões para determinação do peso molecular

O padrão de peso molecular LMW: fosforilase b (97.000), albumina bovina (66.000), ovoalbumina (45.000), anidrase carbônica bovina (30.000), inibidor de tripsina (20.100), α -lactoalbumina (14.400), foi obtido da Sigma Chem. Co.

2.4 Atividades enzimáticas

O fibrinogênio e o plasma bovinos foram obtidos da Sigma Chem. Co e pelo Hospital Veterinário da UFU, respectivamente.

Os animais experimentais (camundongos albinos da raça Swiss) foram gentilmente doados pelo Instituto Vallée e pela Pentapharm do Brasil, os quais foram mantidos no Laboratório de Experimentação Animal (LEA) da Universidade Federal de Uberlândia (UFU).

Todos os demais reagentes utilizados eram de grau analítico

2.5 Fracionamento da peçonha bruta de *Bothrops alternatus*

Cerca de 200 mg da peçonha bruta dessecada de *Bothrops alternatus* foram dispersos em 2,0 ml de tampão bicarbonato de amônio 0,05 M pH 7,8,

centrifugados a 10.000 x g por 10 min em temperatura ambiente e aplicados a uma coluna de DEAE Sephacel (1,5 X 15 cm). As amostras foram eluídas com um gradiente convexo de concentração de bicarbonato de amônio (0,05 - 1,0 M) pH 7,8, utilizando uma câmara de mistura com um volume de 150 ml. As frações, contendo 3,0 ml cada, foram coletadas num fluxo de 20 ml/hora, por um coletor de frações Gilson. A absorbância de cada fração foi acompanhada em 280 nm, num espectrofotômetro Spekol UV/VIS (Zeiss).

2.6. 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 curva padrão foi construída utilizando-se soroalbumina bovina, que apresenta um coeficiente de extinção $\epsilon^{1,0\text{mg/mL}}$ em 278 nm de 0,666 (DOTY e GEIDUSCHC, 1953).

2.7. Eletroforese em gel de poliacrilamida com agentes desnaturantes para a estimativa da Massa Molecular

A determinação da massa molecular aparente das amostras foi realizada por eletroforese em gel de poliacrilamida a 14 %, com agentes desnaturantes, conforme a técnica descrita por LAEMMLI (1970). Foi utilizado um gel de empilhamento a 5 % em pH 6,8 contendo 0,125 M de Tris-HCl e 0,1 % de SDS e um gel de separação a 14 % em pH 8,8 e 0,1 % de SDS, mantendo a relação acrilamida:bis-acrilamida de 30:0,8 (m/m).

2.8. Teste de degradação do fibrinogênio bovino

A atividade fibrinogenolítica foi realizada segundo EDGAR e PRENTICE (1973), com algumas modificações. Em 50 μl de uma solução de fibrinogênio bovino (1,5 mg/ml salina) foram adicionados 5 μg da enzima Balt-F1 e a solução incubada por até 60 minutos a 37 °C. A amostra foi diluída 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 % (m/v) e azul de bromofenol a 0,05 %. Em seguida as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida a 14% com SDS como agente desnaturante.

2.9 Efeito de agentes inibidores sobre a atividade fibrinogenolítica

A influência de agentes inibidores de proteases foi testada quando a enzima Balt-F1 foi pré-incubada por 30 minutos com EDTA 10 mM, 1,10 fenantrolina 10 mM, PMSF 10 mM, aprotinina 10 mM e β -mercaptoetanol 10 mM.

2.10. Efeitos do pH e temperatura sobre a atividade fibrinogenolítica

Cerca de 5 μ g da enzima Balt-F1 dissolvidos em um volume final de 50 μ L de salina, foram pré-incubados por 30 minutos em diferentes pHs (3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 e 11) em temperatura ambiente ou em diferentes temperaturas (30, 40, 50, 60, 70 e 80 °C) por 15 minutos e em pH 8. Em seguida as amostras foram colocadas em banho de gelo e a atividade fibrinogenolítica foi determinada como descrito no item 2.8.

2.11 Atividade coagulante sobre o plasma bovino

Amostras de sangue foram coletadas em 3,8 % de citrato de sódio (9:1, v/v) e centrifugadas a 2500 g a 4°C por 15 min para obtenção do plasma pobre em plaquetas. A atividade coagulante foi determinada pela adição de 5 μ g da enzima a 200 μ L de plasma bovino a 37 °C e o tempo de coagulação determinado.

2.12 Atividade hemorrágica

A atividade hemorrágica foi realizada segundo a técnica descrita por NIKAI et al. (1984), com algumas modificações. As amostras com cerca de 50 μ g de proteínas foram injetadas num volume de 0,1 mL de salina por via subcutânea no dorso de camundongos machos de 20 g. Após 5 horas, os animais foram sacrificados, as peles removidas e foi observada a presença ou a ausência de halos hemorrágicos na face interna da pele.

2.13 Atividade desfibrinogenante

A atividade desfibrinogenante foi ensaiada conforme o método descrito por GENE et al. (1989), com algumas modificações. Inicialmente, 5 μ g da enzima dissolvida em 200 μ L de salina foram injetadas i. p. em quatro camundongos da raça swiss (18 - 20 g). Animais controle receberam 200 μ L de salina. Após uma

hora, os animais foram sacrificados com éter e a punção cardíaca realizada. O sangue total foi colocado em tubos e guardado a 25-30 °C e o tempo de coagulação determinado.

2.14 Atividade fosfolipásica A2 (PLA2)

A atividade fosfolipásica foi realizada segundo o método descrito por DE HASS et al. (1968). Como substrato, foi utilizada uma emulsão aquosa de gema de ovo (uma gema para 50 mL de solução) em presença de desoxicolato de sódio e íons Ca^{++} . Para o ensaio, 10 mL da emulsão acima foram diluídos para 30 mL, sendo a concentração final de desoxicolato de sódio e CaCl_2 $2,7 \times 10^{-3}$ M e $6,0 \times 10^{-3}$ 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 utilizadas amostras contendo 20 µg de proteínas.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Fracionamento da peçonha bruta de *Bothrops alternatus*

O fracionamento da peçonha bruta de *Bothrops alternatus* foi realizado em gel de DEAE Sephacel num gradiente convexo de concentração em tampão bicarbonato de amônio 0,05 M a 1,0 M em pH 7,8. O perfil cromatográfico está mostrado na figura 1. A peçonha total foi resolvida em seis frações principais designadas de D1 a D6. Todas essas frações foram capazes de hidrolisar o fibrinogênio bovino (atividade fibrinogenolítica), em maior ou menor intensidade, com a fração D3 apresentando a maior atividade dentre todas as frações.

A análise por eletroforese em gel de poliacrilamida com agentes desnaturantes (SDS-PAGE) da fração D3 (tubo a tubo) mostrou que os tubos 51 a 54 eram constituídos por banda única (resultado não mostrado). Esse material, denominado de Balt-F1 (Fibrinogenase 1 de *Bothrops alternatus*), foi reunido, liofilizado e armazenado a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. A recuperação protéica para a Balt-F1 mostrou que essa enzima representa cerca de 2,2 % da peçonha bruta de *Bothrops alternatus* (tabela 1).

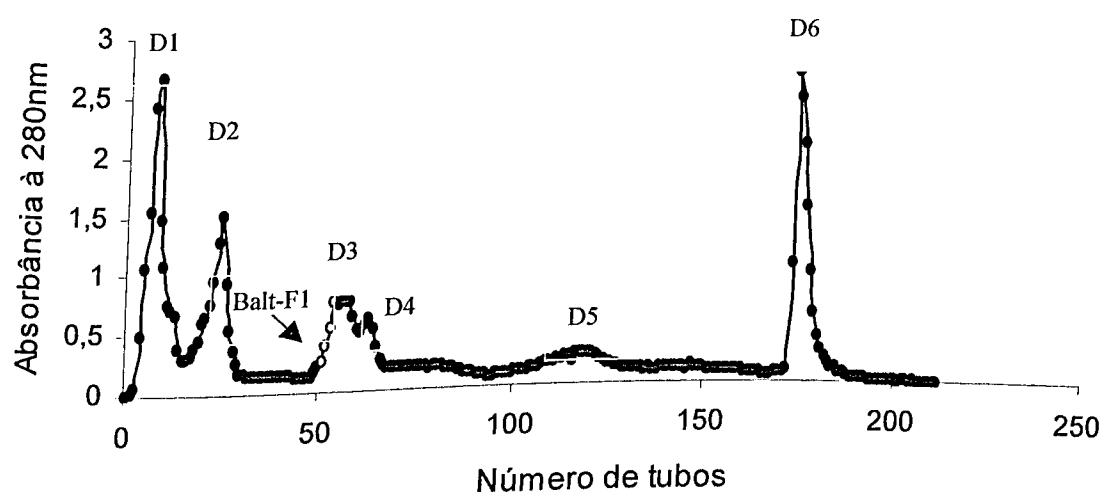


Figura 1. Fracionamento de 200 mg da peçonha bruta de *Bothrops alternatus* em coluna de DEAE Sephacel (1,5 X 15 cm), equilibrada com tampão bicarbonato de amônio 0,05M, pH 7,8. As amostras foram eluídas num gradiente convexo de concentração (0,05 – 1,0 M) do mesmo tampão, num fluxo de 20 ml/h à temperatura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

Tabela 1. Recuperação protéica da enzima Balt-F1 purificada da peçonha bruta de *Bothrops alternatus*.

Amostra	Volume (ml)	A _{280 nm}	U A _{280 nm} Total	Recuperação (%)*
PB**	1,96	1,55	182,3	100,00
D1	23,0	1,28	29,44	16,15
D2	34,5	0,83	28,65	15,71
Balt-FI	11,5	0,35	04,02	2,20
D3	11,0	0,71	07,81	4,28
D4	17,0	0,45	07,65	4,20
D5	24,5	0,42	10,29	5,64
D6	21,0	1,50	31,50	17,28

* A Recuperação protéica foi realizada pela absorvância total de cada fração a 280 nm

* PB - Peçonha bruta de *Bothrops alternatus* 60 vezes diluída.

3.2 Eletroforese em gel de poliacrilamida com agentes desnaturantes para a estimativa da Massa Molecular

Quando analisada em SDS-PAGE a 14 %, a enzima Balt-F1 apresentou cadeia única e massa molecular aparente de 26.2 kDa, na presença do agente redutor β -mercaptoetanol e 21.2 kDa na ausência desse agente redutor (figura 2). Essa diferença pode ser explicada pelo fato de a migração da molécula na eletroforese ser dependente do seu tamanho molecular. Considerando que na presença de β -mercaptoetanol a proteína sofre uma desnaturação mais efetiva devido ao rompimento das pontes dissulfetos, ela poderá aumentar o seu tamanho aparente e diminuir sua migração em relação à proteína sem β -mercaptoetanol. A curva de calibração para a estimativa das massas moleculares está mostrada na figura 3.

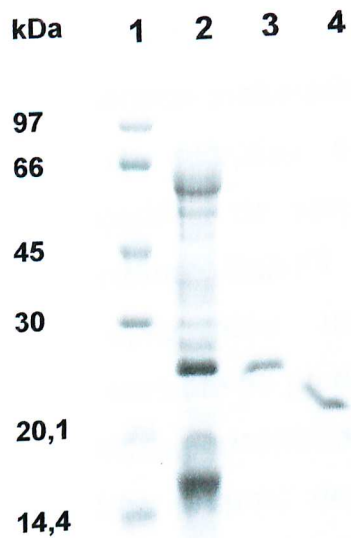


Figura 2. Eletroforese em gel de poliacrilamida a 14 % com agentes desnaturantes para a estimativa da massa molecular da enzima Balt-F1.

Linha 1- Padrão de massa molecular: fosforilase b (97.000), albumina bovina (66.000), ovoalbumina (45.000), anidrase carbônica (30.000), inibidor de tripsina (20.100) e α -lactoalbumina (14.400); **2** - peçonha bruta de *Bothrops alternatus* reduzida; **3** - Balt-F1 reduzida; **4**- Balt-F1 não reduzida.

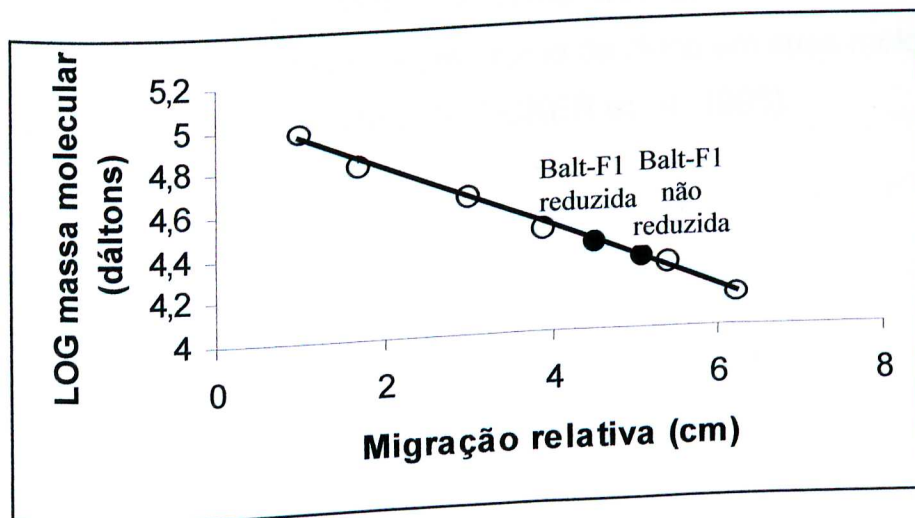


Figura 3: Curva padrão para a determinação da massa molecular da enzima BaltF.

○ **Padrões:** fosforilase b (97.000), albumina bovina (66.000), ovoalbumina (45.000), anidrase carbônica (30.000), inibidor de tripsina (20.100) e α -lactoalbumina (14.400);
● **Balt-F1 (com e sem β -mercaptoetanol)**

3.3 Teste de degradação sobre o fibrinogênio bovino

Os testes de degradação das cadeias do fibrinogênio bovino mostraram que a enzima Balt-F1 degrada a cadeia A- α mais rapidamente que a cadeia B- β , enquanto que a cadeia γ permanece inalterada, mesmo depois de 60 minutos (figura 4). Esse mecanismo de hidrólise é comum para a maioria das fibrinogenases isoladas de peçonhas de serpentes (OLIVEIRA et al., 1999; XIUXIA et al., 2001). A enzima Balt-F1 apresentou elevada atividade fibrinogenolítica, mas não apresentou nenhuma atividade coagulante, fosfolipásica A2 ou hemorrágica com até 50 μ g de proteína.

As enzimas fibrinogenolíticas, encontradas nas peçonhas de serpentes, podem ser classificadas em três grupos, dependendo da especificidade de hidrólise das cadeias do fibrinogênio. O primeiro grupo são aquelas com preferência de hidrólise pela cadeia A- α (LEONARDI et al., 2002; ESTÊVÃO-COSTA et al., 2000), o segundo pela cadeia B- β (GUO et al., 2001; SAMEL et al., 2002) e o terceiro pela cadeia γ do fibrinogênio (NIKAI et al., 1984). Nossos resultados sugerem que a Balt-F1 pertence à classe α -fibrinogenases.

Muitas das enzimas fibrinogenolíticas de peçonha foram caracterizadas como metaloproteases dependentes de zinco. Membros desta família são assim chamados em virtude de apresentarem átomo de zinco em suas moléculas, o qual é essencial para sua ação catalítica (STOCKER et al., 1995).



Figura 4: Eletroforese em gel de poliacrilamida a 14% com agentes desnaturantes dos produtos de hidrólise do fibrinogênio bovino, resultantes da ação da enzima Balt-F1. 1- fibrinogênio bovino, controle; 2 a 7- fibrinogênio incubado com Balt-F1 em pH 8.0 por 2, 5, 10, 15, 30 e 60 minutos, respectivamente.

3.4 . Efeitos do pH e temperatura sobre a atividade fibrinogenolítica

Estudos de estabilidade enzimática mostraram que a enzima Balt-F1 apresenta atividade máxima numa larga faixa de pH alcalino (figura 5A), mas não é ativa em elevadas temperaturas. Quando aquecida acima de 60 °C, durante 15 minutos, a enzima perde completamente sua atividade fibrinogenolítica (figura 5B).

Quanto à estabilidade enzimática, a enzima Balt-F1 apresenta um comportamento semelhante a várias outras proteases de peçonha de serpentes já purificadas e descritas na literatura (SELISTRE; GÍGLIO, 1987; KOSUKI et al., 1986; SHIEH et al., 1985).

proteína madura. Dentro da classe P-I, essas enzimas pertenceriam ao subgrupo P-IB, junto com as metaloproteases Htc e Ht-d de *Crotalus atrox* (BJARNASON; FOX, 1994), protease A de *Bothrops moojeni* (ASSAKURA et al., 1985), LHF-II de *Lachesis muta* (SANCHES et al., 1991), BaPI de *B. asper* (GUTIÉRREZ et al., 1995) e Neuwidase de *Bothrops neuwiedi* (RODRIGUES et al., 2001). Todas essas enzimas possuem somente o domínio protease e apresentam atividade hemorrágica fraca ou ausente.



Figura 6. Eletroforese em gel de poliacrilamida a 14 % com agentes desnaturantes dos produtos de digestão do fibrinogênio bovino pela enzima Balt-F1 pré-incubada com inibidores de proteases. Linha 1- fibrinogênio bovino controle, sem Balt-F1; linha 2- fibrinogênio incubado com Balt-F1 por 60 minutos em pH 8,0; linhas 3 a 7- fibrinogênio incubado com a Balt-F1 pré-tratada com PMSF 10 mM, aprotinina 10 mM, EDTA 10 mM, β -mercaptoetanol 10 mM e 1,10 fenantrolina 10 mM, respectivamente. Para cada ensaio, 5 μ g da enzima Balt-F1 foram pré-incubados por 30 minutos com cada inibidor, como indicado acima, e depois adicionados à solução de fibrinogênio e deixados reagir em pH 8,0 durante 60 minutos.

As enzimas fibrinogenolíticas de peçonhas de serpentes, têm sido muito usadas para o tratamento e prevenção de disfunções cardiovasculares. Essas enzimas levam à rápida diminuição do fibrinogênio *in vivo*, causando um efeito anticoagulante e a diminuição da viscosidade do sangue. Vários estudos revelaram que essas enzimas induzem trombólise de forma consistente, eficaz e segura (WILLIS; TU., 1989; GASMI et al., 1997).

Estudos adicionais serão necessários para melhor caracterizar a enzima Balt-F1 e verificar sua possível aplicação terapêutica em doenças cardiovasculares.

4. CONCLUSÃO

Os procedimentos cromatográficos utilizados neste trabalho permitiram purificar uma α -fibrinogenase presente na peçonha de *Bothrops alternatus*. A enzima, denominada Balt-F1, é uma metaloprotease de cadeia simples e apresenta massa molecular aparente de 26.200 e 21.200, sob condições redutoras e não redutoras, respectivamente.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ASSAKURA, M. T.; REICHL, A. P.; ASPERTI, M. C. A.; MANDELBAUM, F. R. Isolation of the major proteolytic enzyme from the venom of the snake *Bothrops moojeni* (Caissaca). *Toxicon*, v. 23, n. 4, p. 691-706, 1985.
- BJARNASON, K. B.; FOX, J. W. Hemorrhagic metalloproteinases from snake venoms. *Pharmac. Ther.*, v. 62, n. 3, p. 325-372, 1994.
- DE HAAS, G. H.; POSTEMA, N. M.; NIEUWENHUIZEN, W.; VANDEENEN, L. L. M. Purification and properties of phospholipase a from porcine pancreas. *Biochem. Biophys. Acta*, v. 159, p. 103, 1968.
- DOTY, P.; GEIDUSCHEC, E. P. In: *The proteins*. I-A. (NEURATH, H.; BAILEY, K. Eds), 1953.
- EDGAR, W.; PRENTICE, C. R. M. The proteolytic action of ancrod on human fibrinogen and its polypeptide chains. *Thromb. Res.*, v. 2, p. 85, 1973.
- ESTÊVÃO-COSTA, M. I.; DINIZ, C. R.; MAGALHÃES, A.; MARKLAND, F. S.; SANCHEZ, E. F. Action of metalloproteinases mutalysin I and II on several components of the hemostatic and fibrinolytic systems. *Thromb Res*. V. 99, n. 4, p. 363-376, 2000.
- GASMI, A.; CHABCHOUB, A.; GUERMAZI, S.; KAROUI, H.; ELAYEB, M.; DELLAGI, K. Further characterization and thrombolytic activity in a rat model of a fibrinogenase from *Vipera lebetina* venom. *Thromb. Res*, v 86, n. 3, p. 233-242, 1997.
- GUO, Y. W.; CHANG, T. Y.; LIN, K. T.; LIU, H. W.; SHIH, K. C.; CHENG, S. H. Cloning and functional expression of the mucrosobin protein, a beta-fibrinogenase of *Trimeresurus mucrosquamatus* (Taiwan Habu). *Protein Expr. Purif.* v. 23, n. 3, p. 483-90, 2001.

- GUTIÉRREZ, J. M.; ROMERO, M.; DIAZ, C.; BORKOW, G.; OVADIA, M. Isolation and characterization of a metalloproteinase with hemorrhagic activity from the venom of the snake *Bothrops asper* (Terciopelo). **Toxicon**, v. 33, n. 1, p. 19-29, 1995.
- ITZHAKI, R. F.; GILL, D. M. A micro- biuret method for estimating proteins. **Anal. Biochem.**, v. 9, p. 401-410, 1964.
- KOSUKI, T.; ARIGA, Y.; NAKAMURA, M.; KINJO, K. Purification and some chemical properties of thrombin-like enzyme from *Trimeresurus flavoviridis* venom. **Thromb Haemost.**, v. 55, n. 1, p. 24-30, 1986.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage t4. **Nature**, v. 227, n. 259, p. 680-689, 1970
- LEONARDI, A.; GUBENSEK, F.; KRIZAJ, I. Purification and characterisation of two hemorrhagic metalloproteinases from the venom of the long-nosed viper, *Vipera ammodytes ammodytes* **Toxicon**. v. 40, n. 1, p.55-62, 2002.
- MEBS, D.; OWNBY, C. L. Myotoxic components of snake venoms: their biochemical and biological activities. **Pharm. Ther.**, v. 48, n. 2, p. 223-236, 1990.
- MESQUITA, D. O. **Biometria, folidose e ecologia da população de *Bothrops alternatus* Duméril, Bibron e Duméril, 1854 (Serpentes: Crotalinae) da zona geográfica do Triângulo Mineiro e Alto Paranaíba - MG. Uberlândia, 1997. 49f. Monografia (Ciências Biológicas) - Curso de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Uberlândia.**
- NIKAI, T.; MORI, N.; KISHIDA, M.; *et al.* Isolation and biochemical characterization of hemorrhagic toxin from the venom of *Crotalus atrox*. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 231, n. 3, p. 309-311, 1984.

OLIVEIRA, R. B. Fatores epidemiológicos e clínicos associados à incoagulabilidade sanguínea no envenenamento por serpentes do gênero *Bothrops*. Uberlândia, 1999. 95f. Dissertação (Mestrado em Clínica Médica) - Curso de Pós-Graduação em Clínica Médica, Universidade Federal de Uberlândia.

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

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

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

SANCHEZ, E. F.; DINIZ, C. R.; RICHARDSON, M. The complete amino acid sequence of the haemorrhagic factor LHFII, A metalloproteinase isolated from the venom of the bushmaster snake (*Lachesis muta muta*) *FEBS Lett*, v. 282, n. 1, p. 178, 1991.

SELISTRE, H. S.; GIGLIO, J. R. Isolation and characterization of the thrombin-like enzyme from the venom of the snake *Bothrops insularis* (jararaca ilhoa). *Toxicon*, v. 25, n. 11, p. 1135-1144, 1987.

SHIEH, T. C.; TANAKA, S.; KIHARA, H.; OHNO, M.; MAKISUMI, S. Purification and characterization of a coagulant enzyme from *Trimeresurus flavoviridis* venom. *J Biochem*, v. 98, n. 3, p. 713-721, 1985.

STOCKER, W.; GRAMS, F.; BAUMANN, U.; REINEMER, P.; GOMIS-RUTH, F.-X.; MCKAY, D. B.; BODE, W. The metzincins-topological and sequential relations between the astacins, adamalysins, serralysins, and matrixins (collagenases) define a superfamily of zinc-peptidases. **Protein Science**, v. 4, n. 5, p. 823-840, 1995.

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

WILLIS, T. W.; TU, A. T. Purification and biochemical characterization of atroxase, a nonhemorrhagic fibrinolytic protease from western diamondback rattlesnake venom. **Biochemistry**, v. 27, n. 13, p. 4769-4777, 1989.

5. CAPÍTULO 2

PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DE DUAS
PROTEASES ISOLADAS DAS PEÇONHAS DE *Bothrops*
alternatus e *Bothrops moojeni*

ABSTRACT: Two fibrinogenolytic enzymes, Balt-F2 and Bmoo-F, were purified from *Bothrops alternatus* and *Bothrops moojeni* snakes venoms by DEAE Sephacel, Sephadex G-75 and Heparin-Agarose column chromatography. The purified Balt-F2 and Bmoo-F ran as single protein bands on analytical polyacrylamide gel electrophoresis and had mol. wts of 29,900 and 24,800, respectively, by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. Both enzymes are proteolytically active against bovine fibrinogen as substrate. When fibrinogen and each enzyme were incubated at 37 °C, at a ratio of 1:100 by weight, Bmoo-F first cleaved the A α -chain then the B β -chain. The action of Balt-F2 was similar, but slower. None of the proteases degraded the γ -chain of fibrinogen. The fibrinogenolytic activity of the enzymes was inhibited by chelant compounds, suggesting that both enzymes are metalloproteases. Bmoo-F still was inhibited by PMSF and β -mercaptoethanol. Since the both enzymes were found to cause defibrinogenation when administered i. p. on mice, it is expected that it may be of medical interest as a therapeutic agent in the treatment and prevention of arterial thrombosis.

RESUMO: As enzimas fibrinogenolíticas, Balt-F2 e Bmoo-F, foram purificadas das peçonhas das serpentes *Bothrops alternatus* e *Bothrops moojeni*, respectivamente, em colunas cromatográficas de DEAE Sephacel, Sephadex G-75 e Heparina-Agarose. A análise por eletroforese em gel de poliacrilamida com agentes desnaturantes (SDS-PAGE) mostra que estas enzimas apresentam uma banda homogênea com massa molecular aparente de 29.9 e 24.8 kDa, respectivamente. As proteases foram capazes de hidrolisar as cadeias A α e B β , mas não mostraram nenhum efeito sobre a cadeia γ do fibrinogênio bovino. A atividade fibrinogenolítica das enzimas foram inibidas por agentes quelantes, classificando-as como metaloproteases. Bmoo-F foi inibida ainda por PMSF e β -mercaptoetanol. Quando administradas intraperitonealmente em camundongos, as enzimas purificadas tornaram o sangue desses animais incoagulável, podendo assim, despertar o interesse para o desenvolvimento de agentes terapêuticos no tratamento e prevenção de trombose arterial.

1. INTRODUÇÃO

As peçonhas botrópicas contêm diferentes proteínas que afetam o mecanismo hemostático. Algumas proteínas agem como pro e outras como anticoagulantes (TAKEYA et al., 1992; LEE et al., 1995). Outras afetam a função plaquetária (MARRAKCHI et al., 1995, 1997; FUJIMURA et al., 1996) enquanto algumas produzem vasodilatação (SANDRA et al., 1999). De acordo com suas interações com inibidores de proteases, os componentes pro e anticoagulante de peçonhas de serpentes podem ser classificados em serino ou metaloproteases. As metaloproteases fibrinogenolíticas degradam preferencialmente a cadeia A α do fibrinogênio, seguida da degradação da cadeia B β . As enzimas que degradam a cadeia B β sem causar fibrinólise, pertencem à classe das serinoproteases (MARKLAND, 1998). Algumas metaloproteases possuem atividades fibrinogenolítica ou fibrinolítica e são denominadas fibrinogenases. Essas enzimas têm sido classificadas como α , β ou γ -fibrinogenases (OUYANG E HUANG, 1979; MORAN E GEREN, 1981; PANDYA E BUDZYNSKI, 1984) de acordo com a preferência de clivagem das cadeias polipeptídicas do fibrinogênio.

As proteases com propriedades fibrinogenolíticas e anticoagulantes podem apresentar-se como uma ferramenta em potencial para o desenvolvimento de drogas no tratamento ou prevenção de várias doenças trombóticas.

Este trabalho descreve a purificação de duas enzimas proteolíticas, uma da peçonha de *Bothrops alternatus* e outra de *Bothrops moojeni* e mostra algumas caracterizações bioquímicas, incluindo as atividades fibrinogenolítica e desfibrinogenante.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Material

As peçonha brutas de *B. alternatus* e *B. moojeni* foram obtidas da Pentapharm do Brasil, que mantém um serpentário em Uberlândia. O fibrinogênio bovino, leupeptina, aprotinina, fenilmetilsulfonil fluoreto (PMSF), etilenodiaminotetracético (EDTA) e β -mercaptoetanol foram obtidos da Sigma (USA). As resinas DEAE Sephacel, Sephadex G-75 e Heparina-Agarose foram obtidas da Amersham Pharmacia Ltda. Os outros reagentes utilizados eram de grau analítico.

2.2 Purificação da Balt-F2

A peçonha bruta de *B. alternatus* (200 mg) foi dispersa em tampão bicarbonato de amônio 50 mM (pH 7,8) e centrifugada a 10.000 g por 10 min. O sobrenadante foi cromatografado em coluna de DEAE Sephacel (1,7 x 15 cm), previamente equilibrada com tampão bicarbonato de amônio, 50 mM, pH 7,8 e eluída em gradiente convexo de concentração (50 mM – 1.0 M) do mesmo tampão.

Frações de 3,0 mL / tubo foram coletadas, a absorbância foi lida a $\lambda = 280$ nm e o pico D6 foi reunido, liofilizado, dissolvido em tampão bicarbonato de amônio, 50 mM, pH 7,8 e aplicado à uma coluna de Sephadex G-75 (2 x 100 cm), previamente equilibrada com o mesmo tampão. A fração fibrinogenolítica (pico D6G2) foi liofilizada e aplicada à uma coluna de Heparina Agarose (1,7 x 15 cm), previamente equilibrada com Tris-HCl 10 mM, pH 7, contendo CaCl_2 5 mM e eluída com Tris-HCl 10 mM, pH 7,0, contendo NaCl 1 M. As amostras foram eluídas num fluxo de 40 mL/h e frações de 2,0 mL foram coletadas.

2.3 Purificação da Bmoo-F

A peçonha bruta de *B. moojeni* (200 mg) foi fracionada em coluna de DEAE Sephacel (1,7 x 15 cm). A fração fibrinogenolítica (pico M2) foi reunida, liofilizada, dissolvida em tampão bicarbonato de amônio, 50 mM, pH 7,8 e aplicada à uma coluna de Sephadex G-75 (2 x 100 cm), previamente equilibrada com o mesmo tampão.

Os dois passos cromatográficos (DEAE Sephacel e Sephadex G-75) seguiram as mesmas condições citadas anteriormente.

2.4 Determinação do peso molecular

Os pesos moleculares de Balt-F2 e Bmoo-F foram determinados por eletroforese em gel de poliacrilamida a 14 % em condições desnaturantes de acordo com o método de LAEMMLI (1970). A eletroforese foi conduzida a 20 mA/gel em tampão Tris-glicina, pH 8,3, contendo 0,01 % de SDS. O padrão de peso molecular utilizado foi: fosforilase b (97.000), soroalbumina bovina (66.000), ovoalbumina (45.000), gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (36.000), anidrase carbônica (30.000), tripsinogênio (24.000), inibidor de tripsina (20.100) e α -lactoalbumina (14.400). Os géis foram corados com 0,2 % (m/v) de Azul Brilhante de Coomassie R-250, contendo ácido acético, metanol e água (1 : 5 : 5).

2.5 Determinação quantitativa de proteínas

A concentração protéica foi determinada pelo método de ITZHAKI e GILL (1964). A curva padrão foi construída utilizando-se soroalbumina bovina, que apresenta um coeficiente de extinção $\epsilon^{1,0\text{mg/mL}}$ em 278 nm de 0,666 (DOTY e GEIDUSCHC, 1953).

2.6 Atividade fibrinogenolítica

A atividade foi realizada segundo EDGAR e PRENTICE (1973), com algumas modificações. O fibrinogênio bovino (5 μg) e as enzimas foram misturadas na proporção de 1:100 (m/m) e a mistura foi incubada a 37 °C por diferentes intervalos de tempo (0 - 90 min). A reação foi interrompida pela adição de tampão da amostra (Tris HCl 0,06 M, pH 6,8, contendo glicerol a 10 % (v/v), β -mercaptoetanol a 10 % (v/v), SDS a 2 % (m/v) e azul de bromofenol a 0,05 %). Os produtos de degradação foram analisados em SDS-PAGE a 14 %.

2.7 Atividade desfibrinogenante

A atividade desfibrinogenante foi ensaiada conforme o método descrito por GENE et al. (1989), com algumas modificações. Inicialmente, 5 μg de cada enzima dissolvida em 200 μL de salina foram injetadas i. p. em quatro

camundongos da raça swiss (18 - 20 g). Animais controle receberam 200 μ L de salina. Após uma hora, os animais foram sacrificados com éter e a punção cardíaca realizada. O sangue total foi colocado em tubos e guardado a 25-30 °C e o tempo de coagulação determinado.

2.8 Inibidores enzimáticos

A inibição da atividade fibrinogenolítica foi determinada pela incubação de 5 μ g de cada enzima em 200 μ L de Tris-HCl, 50 mM, pH 7,8, por 15 min a temperatura ambiente (25°C), contendo os seguintes inibidores: EDTA 10 mM, EGTA 10 mM, PMSF 10 mM, aprotinina 10 mM, 1,10-fenantrolina 10 mM, β -mercaptoetanol 10 mM e leupeptina 1 mM. A atividade proteolítica sobre o fibrinogênio foi determinada como descrita anteriormente.

2.9. Efeitos do pH e temperatura sobre a atividade fibrinogenolítica

Cerca de 5 μ g da enzima Bmoo-F dissolvidos em um volume final de 50 μ L de salina, foram pré-incubados por 30 minutos em diferentes pHs (3, 4, 5, 6, 7, 9, 10 e 11) em temperatura ambiente ou em diferentes temperaturas (30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 e 100 °C) por 15 minutos e em pH 8. Em seguida as amostras foram colocadas em banho de gelo e a atividade fibrinogenolítica foi determinada como descrito no item 2.6.

2.10 Atividade coagulante sobre o plasma bovino

Amostras de sangue foram coletadas em 3,8 % de citrato de sódio (9:1, v/v) e centrifugadas a 2500 g a 4°C por 15 min para obtenção do plasma pobre em plaquetas. A atividade coagulante foi determinada pela adição de 5 μ g de cada enzima a 200 μ L de plasma bovino a 37 °C e o tempo de coagulação determinado.

2.11 Atividade hemorrágica

A atividade hemorrágica foi realizada segundo a técnica descrita por NIKAI et al. (1984), com algumas modificações. As amostras com cerca de 50 μ g de proteínas foram injetadas num volume de 0,1 mL de salina por via subcutânea no dorso de camundongos machos de 20 g. Após 5 horas, os animais foram

sacrificados, as peles removidas e foi observada a presença ou a ausência de halos hemorrágicos na face interna da pele.

2.12 Atividade fosfolipásica A2 (PLA2)

A atividade fosfolipásica foi realizada segundo o método descrito por DE HASS et al. (1968). Como substrato, foi utilizada uma emulsão aquosa de gema de ovo (uma gema para 50 mL de solução) em presença de desoxicolato de sódio e íons Ca^{++} . Para o ensaio, 10 mL da emulsão acima foram diluídos para 30 mL, sendo a concentração final de desoxicolato de sódio e CaCl_2 $2,7 \times 10^{-3}$ M e $6,0 \times 10^{-3}$ 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 utilizadas amostras contendo 20 µg de proteínas.

2.13. Atividade azocaseinolítica

Em 1 mL de solução de azocaseína (1 mg/mL de tampão Tris-HCl 0,2 M, pH 8,8, contendo CaCl_2 4 mM), foram adicionados 20 µg de Bmoo-F e a solução incubada por 60 minutos a 37 °C. A reação foi interrompida pela adição de TCA (ácido tricloroacético) a 5 %. Após 20 minutos, as amostras foram centrifugadas a 10.000 g por 10 minutos. A absorbância do sobrenadante foi acompanhada a 366 nm.

2.14 Efeito dos inibidores da atividade proteolítica sobre a azocaseína induzida pela enzima Bmoo-F

Cerca de 20 µg da enzima Bmoo-F dissolvidos em um volume final de 50 µL de tampão Tris-HCl 0,2 M, pH 8,8, contendo CaCl_2 4 mM, foram pré-incubados em diferentes temperaturas (30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 e 100 °C) e com inibidores de proteases (PMSF 10 mM, EDTA 10 mM, EGTA 10 mM, β-mercaptoetanol 10 mM e leupeptina 1 mM) por 15 minutos. Em seguida as amostras foram colocadas em banho de gelo e a atividade azocaseinolítica determinada.

3. RESULTADOS

3.1 Purificação da Balt-F2

A peçonha de *B. alternatus* foi inicialmente fracionada em coluna de DEAE Sephacel. O procedimento cromatográfico está mostrado na figura 1. Foram obtidas seis frações principais denominadas de D1 a D6 (figura 1A). A fração D6 foi, posteriormente, purificada em Sephadex G-75 (figura 1B). A fração D6G2, obtida desta filtração, foi aplicada em coluna de Heparina-Agarose (figura. 1C). A fração não adsorvida (denominada Balt-F2) apresentou atividades fibrinogenolítica e desfibrinogenante. Esta fração não apresentou atividades coagulante, hemorrágica e PLA2.

3.2 Purificação da Bmoo-F

Inicialmente, a peçonha de *Bothrops moojeni* foi fracionada em coluna de DEAE Sephacel. A figura 2 mostra o perfil cromatográfico. Desse fracionamento resultaram seis frações denominadas de M1 a M6 (figura 2A). A fração M2 foi, posteriormente, purificada em Sephadex G-75 (figura 2B). A fração M2G1 (denominada Bmoo-F) apresentou atividades fibrinogenolítica e desfibrinogenante, porém, não apresentou atividades coagulante, hemorrágica e fosfolipásica A2.

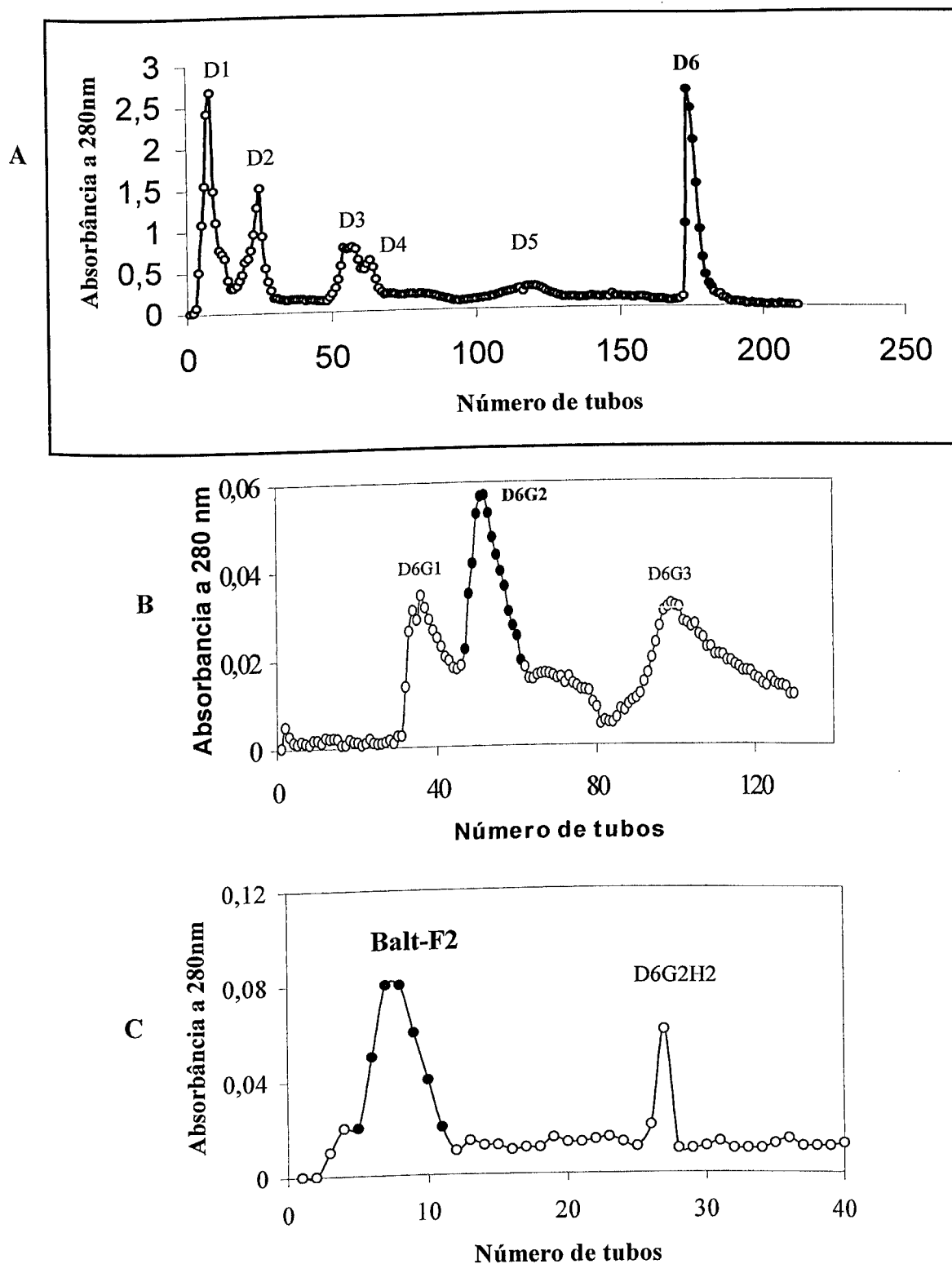


Figura 1. Purificação da Balt-F2 da peçonha de *Bothrops alternatus* **(A)** Separação em DEAE Sephacel: a peçonha bruta (200 mg) foi aplicada à coluna (1,7 x 15 cm) e a eluição foi conduzida a um fluxo de 20 mL/h com gradiente convexo de concentração (50 mM a 1,0 M) em tampão bicarbonato de amônio, pH 7,8. **(B)** Separação em Sephadex G-75: a fração ativa (D6) foi aplicada a uma coluna (2,0 x 100 cm), eluída em tampão bicarbonato de amônio, 50 mM, pH 7,8, em um fluxo de 20 mL/h. **(C)** Separação em Heparina-Agarose: a fração D6G2 foi aplicada em uma coluna de Heparina-agarose (1,7 x 15 cm) e eluída em um fluxo de 40 mL/h com tampão Tris-HCl, 10 mM, contendo 1,0 M de NaCl em pH 7,0. O gradiente de concentração foi estabelecido a partir do início da cromatografia.

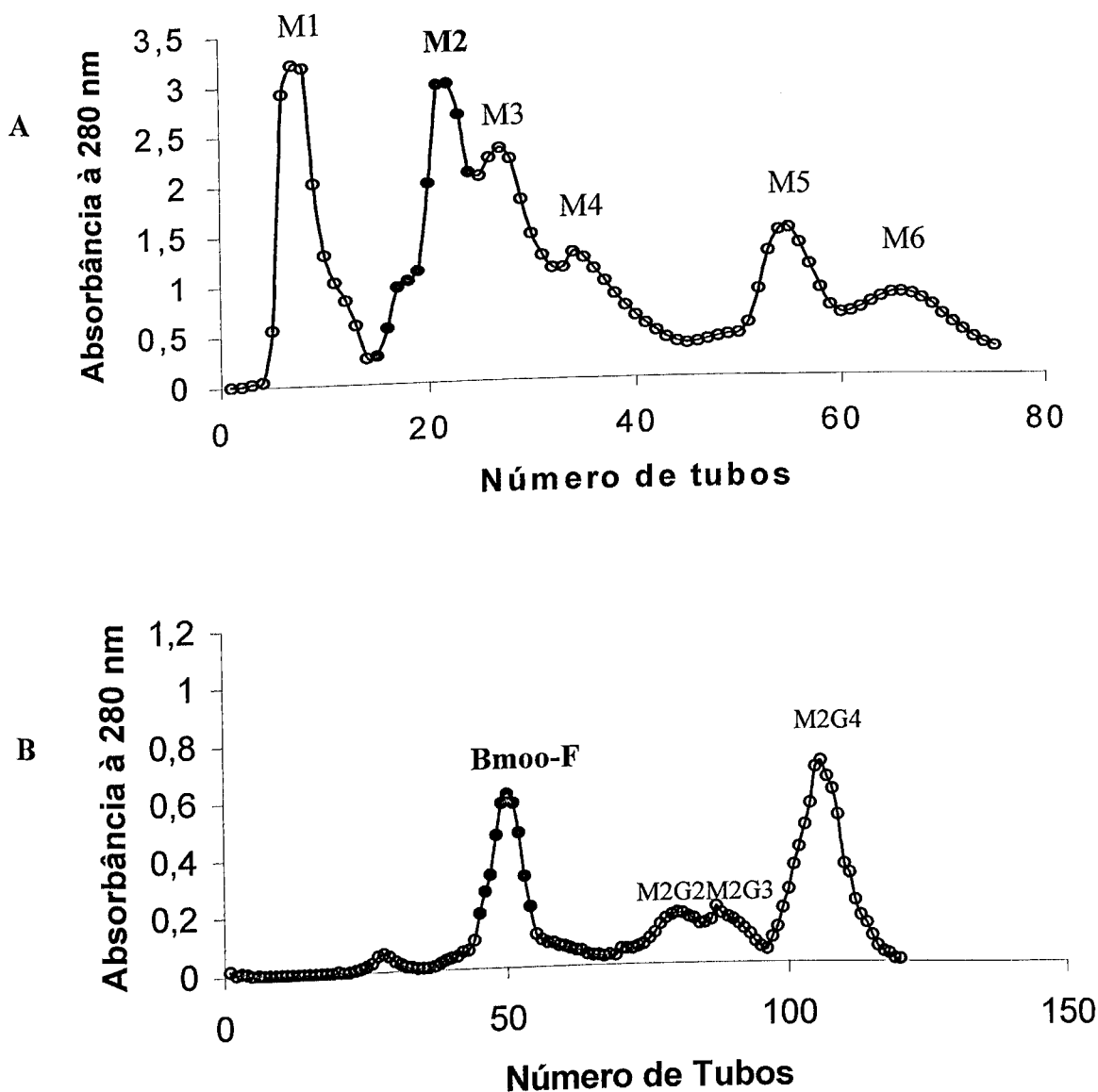


Figura 2. Purificação da Bmoo-F da peçonha de *Bothrops moojeni* **(A)** Separação em DEAE Sephacel: a peçonha bruta (200 mg) foi aplicada à coluna (1,7 x 15 cm) e a eluição foi conduzida a um fluxo de 20 mL/h com gradiente convexo de concentração (50 mM a 1,0 M) em tampão bicarbonato de amônio, pH 7,8. **(B)** Separação em Sephadex G-75: a fração ativa (M2) foi aplicada a uma coluna (2,0 x 100 cm), eluída em tampão bicarbonato de amônio, 50 mM, pH 7,8, em um fluxo de 20 mL/h. O gradiente de concentração foi estabelecido a partir do início da cromatografia.

3.3 Eletroforese em gel de poliacrilamida com agentes desnaturantes para a estimativa da Massa Molecular

A eletroforese em gel de poliacrilamida a 14 % com agentes desnaturantes foi realizada para estimar a massa molecular das enzimas Balt-F2 e Bmoo-F (figura 3A e 3B, respectivamente). A massa molecular aproximada das enzimas (29.900 e 24.800) foi obtido pela curva padrão traçada, considerando-se a mobilidade eletroforética em função do logaritmo das massas moleculares das proteínas padrões, conforme mostra a figura 4A e 4B, respectivamente).

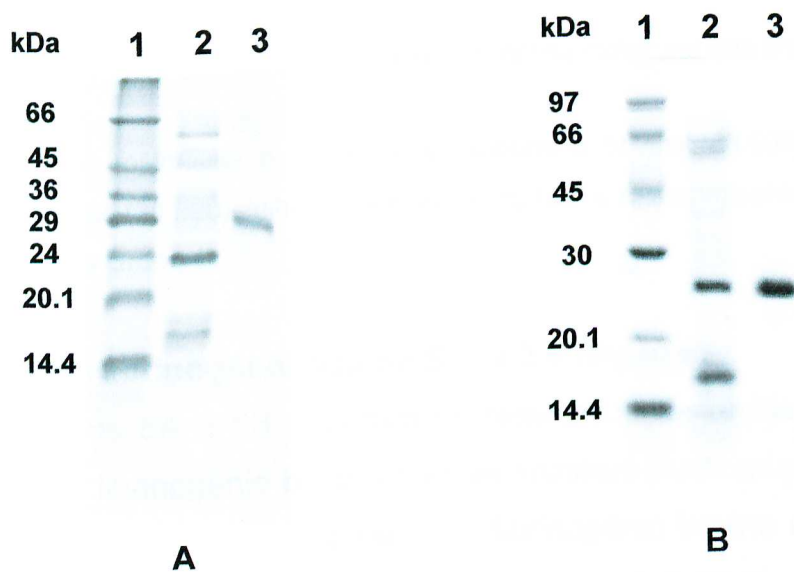


Figura 3 – Análise em SDS-PAGE das enzimas purificadas. As enzimas purificadas foram submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida a 14 %, contendo dodecil sulfato de sódio como agente desnaturante. **(A)**: Linha 1, padrão de peso molecular: soroalbumina bovina (66.000), ovoalbumina (45.000), gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase (36.000), anidrase carbônica (29.000), tripsinogênio (24.000), inibidor de tripsina (20.100) e α -lactoalbumina (14.400); 2 – Peçonha bruta de *Bothrops alternatus* reduzida; 3 – Balt-F2 reduzida. **(B)**: Linha 1: padrão de peso molecular: fosforilase b (97.000), soroalbumina bovina (66.000), ovoalbumina (45.000), anidrase carbônica (30.000), inibidor de tripsina (20.100) e α -lactoalbumina (14.400); 2 - Peçonha bruta de *Bothrops moojeni* reduzida; 3- Bmoo-F reduzida. A eletroforese foi conduzida a 20 mA/gel em tampão Tris-glicina pH 8,3, contendo 0,01% de SDS. O gel foi corado com Azul Brilhante de Coomassie R-250 e descorado com ácido acético: metanol: água (1:5:5, v/v).

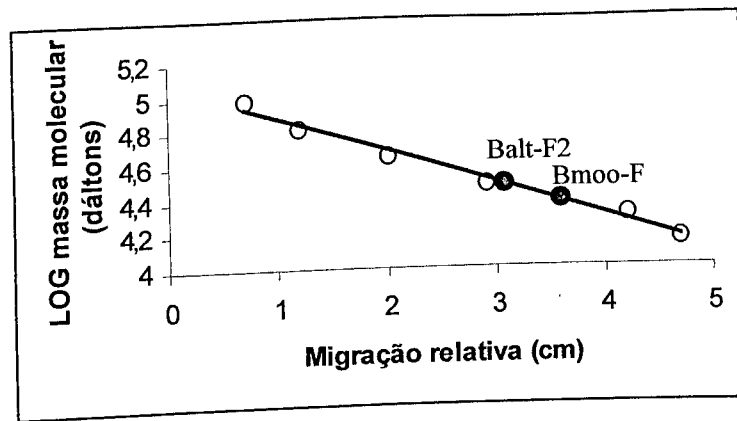


Figura 4: Curva padrão para a determinação da massa molecular das enzimas Balt-F2 e Bmoo-F

- **Padrões:** fosforilase b (97.000), soroalbumina bovina (66.000), ovoalbumina (45.000), anidrase carbônico (30.000), inibidor de tripsina (20.100) e α -lactoalbumina (14.400)
- **Balt-F2 e Bmoo-F**

3.4 Atividade fibrinogenolítica da Balt-F2 e Bmoo-F

As figuras 5A e 5B mostram os resultados da análise em SDS-PAGE da incubação do fibrinogênio bovino com as enzimas purificadas. Como mostrado na linha controle (Fig. 5A e B - linha 1), o fibrinogênio bovino reduzido foi separado nas cadeias $A\alpha$, $B\beta$ e γ . Quando incubado com Balt-F2 (fig. 5A), a cadeia $A\alpha$ do fibrinogênio começou a desaparecer após 15 min e desapareceu totalmente com 45 min de incubação. A cadeia $B\beta$ começou a desaparecer no mesmo tempo, mas com uma velocidade menor que a cadeia $A\alpha$ e desapareceu completamente com 90 min de incubação. Quando incubado com Bmoo-F (Fig. 5B), as cadeias $A\alpha$ e $B\beta$ desapareceram completamente com 30 min de incubação.

Ambas enzimas apresentaram pouco ou nenhum efeito sobre a cadeia γ do fibrinogênio.

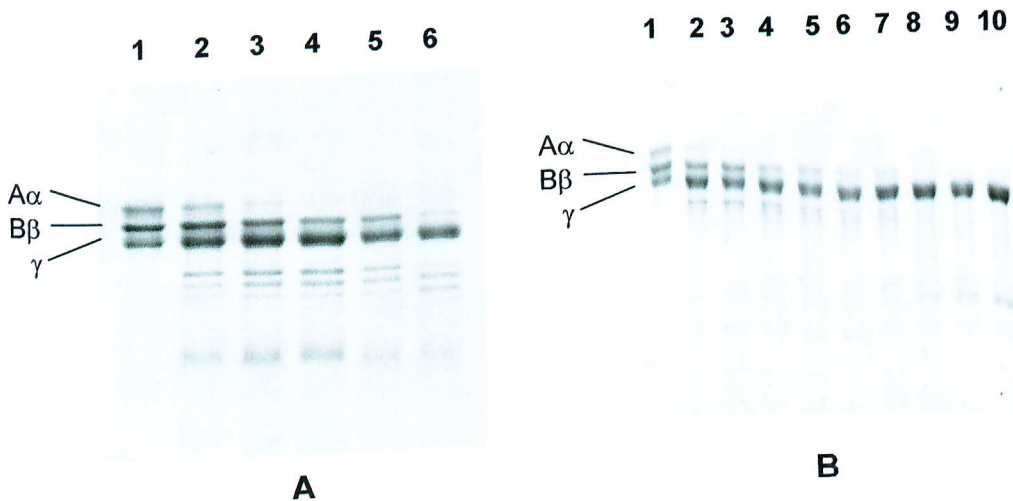


Figura 5 – Proteólise do fibrinogênio bovino pelas enzimas Balt-F2 e Bmoo-F: **(A)** Linha 1 – fibrinogênio controle incubado sem enzima por 60 min; 2, 3, 4, 5 e 6 - fibrinogênio incubado com Balt-F2 por 15, 30, 45, 60 e 90 min, respectivamente. **(B)** Linha 1 – fibrinogênio controle incubado sem enzima por 60 min; 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 10- fibrinogênio incubado com Bmoo-F por 2, 4, 6, 8, 10, 15, 30, 45, 60 min, respectivamente.

3.5 Efeito dos inibidores sobre a atividade de Balt-F2 e Bmoo-F

As figuras 6A e 6B mostram os efeitos dos vários inibidores sobre a atividade fibrinogenolítica de Balt-F2 e Bmoo-F. A atividade fibrinogenolítica de ambas enzimas depende da presença de íon metal, desde que a pré-incubação com quelantes de íons metálicos inibiu completamente a atividade proteolítica. Inibidores de cisteíno e serino proteases – β -mercaptoetanol, PMSF e aprotinina, respectivamente, apresentaram pouco ou nenhum efeito sobre a atividade fibrinogenolítica de Balt-F2, embora os dois primeiros tenham desencadeado inibição completa da Bmoo-F.

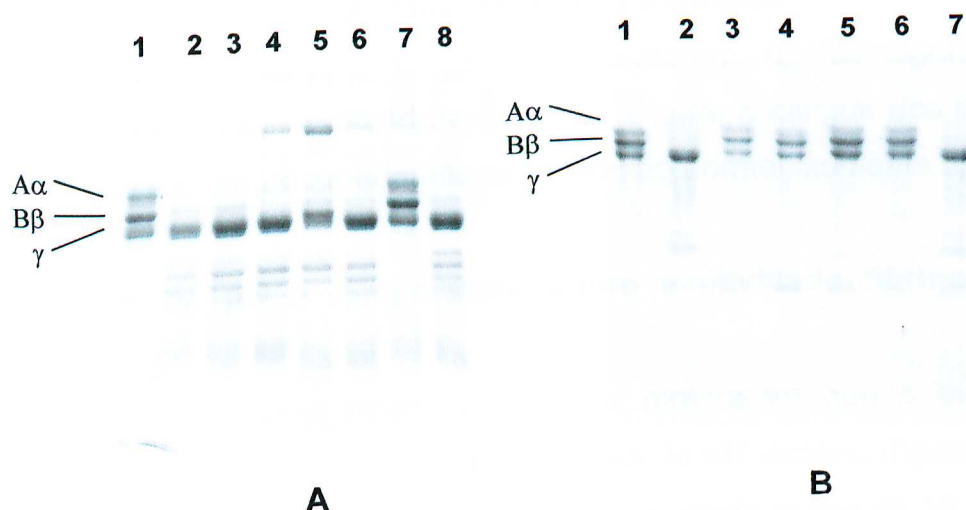


Figura 6 – Proteólise do fibrinogênio bovino pelas enzimas Balt-F2 e Bmoo-F. **(A)**: Linha 1 – fibrinogênio controle incubado sem enzima por 60 min; 2 – fibrinogênio controle incubado com enzima por 60 min; 3, 4, 5, 6, 7 e 8 – fibrinogênio após incubação com Balt-F2 + PMSF, aprotinina, EDTA, β -mercaptoetanol, 1,10-fenantrolina e leupeptina, respectivamente. **(B)**: Linha 1 – fibrinogênio controle incubado sem enzima por 60 min; 2 – fibrinogênio controle incubado com enzima por 60 min; 3, 4, 5, 6 e 7 – fibrinogênio após incubação com Bmoo-F + PMSF, EDTA, EGTA, β -mercaptoetanol e leupeptina, respectivamente.

Tabela 1. Efeito dos inibidores da atividade proteolítica sobre a azocaseína induzida pela enzima Bmoo-F

Enzima	Inibidor	Concentração	Recuperação da atividade azocaseinolítica (%)
Bmoo-F			100,00
	EDTA	10 mM	9,6
	EGTA	10 mM	10,67
	PMSF	10 mM	20,27
	Leupeptina	1 mM	63,2
	β -mercaptoetanol	10 mM	25,87

* O controle foi realizado com a enzima Bmoo-F incubada com azocaseína na ausência de inibidores. Estes resultados se referem à média de 3 ensaios. Cada ensaio foi realizado com 20 μ g da enzima Bmoo-F.

3.6 Atividade desfibrinogenante de Balt-F2 e Bmoo-F

As enzimas Balt-F2 e Bmoo-F causaram desfibrinogenação quando administradas i. p. em camundongos. Após 1 hora, o sangue dos animais estava incoagulável e o tempo de coagulação voltou ao normal, somente após 24 horas.

3.7. Efeitos do pH e temperatura sobre a atividade fibrinogenolítica da Bmoo-F

Estudos de estabilidade enzimática mostraram que a enzima Bmoo-F apresenta atividade máxima numa larga faixa de pH alcalino (figura 7A), mas não é ativa em elevadas temperaturas. Quando aquecida acima de 50 °C, durante 15 minutos, a enzima perde completamente sua atividade fibrinogenolítica (figura 7B).

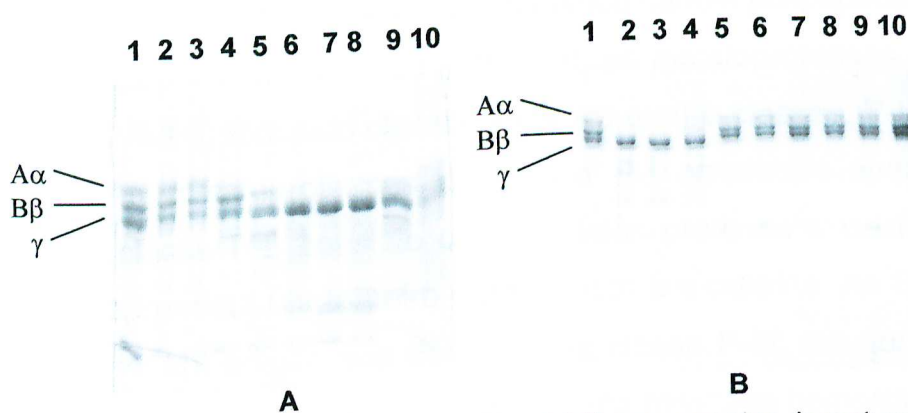


Figura 7. Eletroforese em gel de poliacrilamida a 14 % com agentes desnaturantes. **(A)** Produtos de digestão do fibrinogênio bovino pela enzima Bmoo-F pré-incubada em vários pHs. Linha 1- de digestão do fibrinogênio bovino pela enzima Bmoo-F pré-incubada em vários pHs; linhas 2 a 10- fibrinogênio acrescido de Bmoo-F pré-fibrinogênio bovino controle sem Bmoo-F; linhas 2 a 10- fibrinogênio acrescido de Bmoo-F pré-incubada em pHs 3 a 11, por 60 min., respectivamente. **(B)** Produtos de digestão do fibrinogênio incubada em pHs 3 a 11, por 60 min., respectivamente. Linha 1: fibrinogênio bovino controle sem Bmoo-F; linha 2- fibrinogênio controle incubado com Bmoo-F por 60 min; linhas 3 a 10 sem Bmoo-F; linha 2- fibrinogênio controle incubado com Bmoo-F por 60 min; linhas 3 a 10 sem Bmoo-F; fibrinogênio incubado por 15 min com Bmoo-F aquecida por 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 e 100 °C, respectivamente.

4. DISCUSSÃO

A principal característica das peçonhas de *B. alternatus* e *B. moojeni* é a sua alta atividade proteolítica, responsável pelos efeitos locais e sistêmicos observados durante o envenenamento por estas serpentes. Neste trabalho, Balt-F2 e Bmoo-F, duas proteases ativas sobre o fibrinogênio, foram purificadas por cromatografia em DEAE Sephacel, Sephadex G-75 e Heparina-Agarose (figuras 1 e 2, respectivamente). Ambas enzimas eram desprovidas de atividades hemorrágica, coagulante e fosfolipásica A2 e apresentaram atividades fibrinogenolítica e desfibrinogenante.

As preparações finais de Balt-F2 e Bmoo-F foram analisadas por SDS-PAGE sob condições redutoras (figura 3A e B). Em ambos os casos, as duas enzimas isoladas mostraram banda única com pesos moleculares de 29.900 e 24.800, respectivamente (figura 4A e B). Estas observações indicam que as enzimas isoladas são compostas de uma única cadeia polipeptídica (figura 3).

Com base em seu domínio estrutural, as metaloproteases de peçonhas de serpentes (SVMPs) têm sido classificadas em quatro classes, P-I a P-IV (HITE, et al., 1994). As metaloproteases da classe P-I consistem apenas do domínio protease, a classe P-II consiste dos domínios protease e desintegrina-like e a classe P-III apresenta um terceiro domínio rico em cisteína. As SVMPs da classe P-IV possuem, em adição aos domínios da classe P-III, um domínio lectina-like. As proteínas da sub-classe P-1A possuem alta atividade hemorrágica, enquanto a sub-classe P-1B apresenta pouca ou nenhuma atividade e incluem a Neuwidase da peçonha de *Bothrops neuwiedi* (RODRIGUES et al., 2001), MOO3 de *Bothrops moojeni* (OLIVEIRA et al., 1999) e Adamalysin II da peçonha de *Crotalus adamanteus* (GOMIS, 1993). Nossos resultados sugerem que Balt-F2 e Bmoo-F pertencem à classe PI-B. As SVMPs PI-B podem também apresentar atividade fibrinogenolítica com especificidade de hidrólise para a cadeia A α do fibrinogênio sem apresentar atividade arginina esterásica.

A atividade fibrinogenolítica das duas enzimas foi analisada em SDS-PAGE, a qual mostrou que ambas as enzimas são capazes de degradar as cadeias do fibrinogênio, com Bmoo-F sendo mais ativa que Balt-F2. Estas, hidrolisam preferencialmente a cadeia A α do fibrinogênio, seguida da cadeia B β . No entanto,

os produtos de degradação do fibrinogênio, revelaram que o padrão de clivagem de Balt-F2 difere de Bmoo-F.

Com base na hidrólise preferencial das cadeias do fibrinogênio, as fibrinogenases de peçonhas podem ser classificadas em α , β ou γ -fibrinogenases. Nossos resultados sugerem que Balt-F2 e Bmoo-F pertencem à família das α -fibrinogenases.

Balt-F2 e Bmoo-F não degradaram a cadeia gama do fibrinogênio, o que é comum para a maioria das proteases de peçonhas de serpentes (figura 5A e B). Esse padrão de hidrólise é similar para muitas fibrinogenases já isoladas.

Com relação aos inibidores de proteases, a aprotinina é conhecida por inativar a tripsina, kallicreína, quimotripsina e plasmina (TRAUTSCHOLD, 1967). No entanto, esta não mostrou efeito sobre a atividade fibrinogenolítica de Balt-F2 (figura 6A). O PMSF apresentou pouco ou nenhum efeito sobre a atividade de Balt-F2, mas inibiu completamente a atividade fibrinogenolítica da Bmoo-F (figura 6A e B, respectivamente). A atividade fibrinogenolítica das duas proteínas foi inibida por agentes quelantes como a 1,10-fenantrolina, EDTA e EGTA, respectivamente (figura 6A e B).

A 1,10-fenantrolina é altamente específica para íons Zn^{2+} . O Ca^{2+} forma um fraco complexo com a 1,10-fenantrolina, enquanto o Zn^{2+} forma complexos estáveis com a mesma. Embora a reatividade específica do íon Zn^{2+} com 1,10-fenantrolina tenha inativado a Balt-F2, é interessante notar que o EDTA não inibiu sua atividade proteolítica (Fig. 5A – linha 5). O EDTA também mostra preferência de afinidade por Zn^{2+} quando comparada ao Ca^{2+} . Estes resultados indicam que Balt-F2 e Bmoo-F pertencem à família das metaloproteases, mas são susceptíveis a diferentes inibidores.

A análise quantitativa da recuperação da atividade azocaseinolítica da enzima Bmoo-F, confirmou que a leupeptina apresentou um efeito de inibição menor quando comparado aos demais inibidores (tabela 1).

A atividade proteolítica sobre a azocaseína mostrou que a enzima Bmoo-F perde a atividade quando aquecida acima de 50 °C (resultado não mostrado). Quanto à estabilidade enzimática, a enzima Bmoo-F (figura 7A e B) apresenta um comportamento semelhante a várias outras proteases de peçonha de serpentes já

purificadas e descritas na literatura (SELISTRE; GÍGLIO, 1987; KOSUKI et al., 1986; SHIEH et al., 1985).

Várias proteases de peçonhas de serpentes apresentam um potencial para o uso clínico no tratamento de doenças humanas, as quais são utilizadas como agentes desfibrinogénantes e largamente usadas em laboratório para detecção de fibrinogênio em amostras de sangue heparinizado (BELL, 1997). Estas enzimas têm sido purificadas de peçonhas de diferentes espécies de serpentes (STOCKER, 1990a,b).

Balt-F2 e Bmoo-F induziram desfibrinogénção quando administradas i.p. em camundongos. Ambas enzimas agem como agentes desfibrinogénantes, removendo o fibrinogênio do sangue. Depois de alguns minutos da administração de ambas enzimas, ocorre a depleção do fibrinogênio plasmático e, em 1 hora, os níveis de fibrinogênio tornam-se muito reduzidos, permanecendo assim, por mais de 24 horas.

Algumas enzimas fibrin(ogen)olíticas causam desfibrinogénção quando administradas intravenosamente, reduzindo a viscosidade do sangue (LATTALLO, 1983; STOCKER e MEIER 1988; CHANG e HUANG, 1995) e aumentando o fluxo sanguíneo (BARRIE e SCHENK, 1976).

Algumas dessas proteases de peçonhas de serpentes têm sido usadas como agentes desfibrinogénantes em várias condições clínicas, incluindo trombose venosa, infarto do miocárdio, embolia pulmonar, doença vascular periférica, angina peitoral e em rejeição de transplante renal (GENE et al., 1989; ESCHENFELDER, 1996; BELL, 1997). Dessa forma, essas enzimas têm sido de grande interesse para a clínica médica, principalmente, pelo alto grau de pureza e por serem desprovidas de outros efeitos farmacológicos.

5. CONCLUSÃO

Duas proteases, Balt-F2 e Bmoo-F, foram purificadas da peçonha de *Bothrops alternatus* e *Bothrops moojeni*, respectivamente. Ambas foram classificadas como α -fibrinogenases e apresentam propriedades anticoagulantes *in vivo*. Posteriormente, estudos de estrutura e função dessas enzimas serão interessantes e, provavelmente, ajudarão no desenvolvimento de agentes terapêuticos relacionados à desordens trombóticas.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BARRIE, W. W; SCHENK, W. G. Improvement in blood flow through a critical arterial stenosis by defibrination with ancrod. **Jr Arch Surg**, v. 111, p. 561-563, 1976.
- BELL, W. R. Defibrinogenating enzymes, fibrinogen, *Calloselasma rhodostoma*, *crotalus adamanteus*, *Bothrops atrox moojeni*, defibrinogenation. **Defibrinogenating Enzymes Drugs**, v. 54, p. 18-31, 1997.
- CHANG, M-C AND HUANG, T-F. Characterization of a thrombin-like enzyme, grambin, from the venom of *Trimeresurus gramineus* and its in vivo antithrombotic effect. **Toxicon**, v. 33, p. 1087-1098, 1995.
- DE HAAS, G. H.; POSTEMA, N. M.; NIEUWENHUIZEN, W.; VANDEENEN, L. L. M. Purification and properties of phospholipase a from porcine pancreas. **Biochem. Biophys. Acta**, v. 159, p. 103, 1968.
- DOTY, P.; GEIDUSCHEC, E. P. In: **The proteins**. I-A. (NEURATH, H.; BAILEY, K. Eds), 1953.
- EDGAR, W.; PRENTICE, C. R. M. The proteolytic action of ancrod on human fibrinogen and its polypeptide chains. **Thromb. Res.**, v. 2, p. 85, 1973.
- ESCHENFELDER, V. Ancrod as na antithrombotic and thrombolytic agent. In: **Advances in anticoagulant and antithrombotic and thrombolytic therapeutics**, ed. G. Zavoico: pp. 6.8.1- 21. IBC Biomedical Library Series, Southborough. 1996.
- FUJIMURA, Y.; TITANI, K.; HOLLAND, L. Z.; RUSSELL, S.R.; ROBERTS, J.R.; ELDER, J.H.; RUGGERI, Z. M.; ZIMMERMAN, T. S. Von Willebrand factor. A reduced and alkylated 52/48-kDa fragment beginning at amino acid residue 449

contains the domain interacting with platelet glycoprotein Ib. **J. Biol. Chem.**, v. 261, p. 381-385, 1996.

GENE, J. A.; ROY, A.; ROJAS, G.; GUTIÉRREZ, J. M.; CERDAS, L. Comparative study on coagulant, defibrinating, fibrinolytic and fibrinogenolytic activities of Costa Rica crotaline snake venoms and their neutralization by a polyvalent antivenom. **Toxicon**, v. 27, p. 841-848, 1989.

GOMIS-RUTH, F. X. , KRESS L. F.; BODE, W. First structure of a snake venom metalloproteinase: a prototype for matrix metalloproteinases/collagenases. **EMBO J.**, v. 12, p. 4151-4157, 1993.

HITE L. A., JIA L. G., BJARNASON J. B. AND FOX J. W. cDNA Sequences for Four Snake Venom Metalloproteinases: Structure, Classification, and Their Relationship to Mammalian Reproductive Proteins. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 308, p. 182-191, 1994.

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

KOSUKI, T.; ARIGA, Y.; NAKAMURA, M.; KINJO, K. Purification and some chemical properties of thrombin-like enzyme from *Trimeresurus flavoviridis* venom. **Thromb Haemost.**, v. 55, n. 1, p. 24-30, 1986.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins, during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.

LATALLO, Z. S. Retrospective study on complications and adverse effects on treatment with thrombin-like enzymes a multicentre trial. **Thromb. Haemost.**, v. 50, p. 604-609, 1983.

- LEE, W. H.; ZHANG, Y.; WANG, W. Y.; XIONG, Y. L. AND GAO, R. Isolation and properties of a blood coagulation factor X activator from the venom of king cobra (*Ophiophagus hannah*). **Toxicon**, v. 33, p. 1263-1276, 1995.
- MARKLAND, F. S. Snake venoms and the hemostatic system. **Toxicon**, v. 36, p. 1749-1800, 1998.
- MARRAKCHI, N.; BARBOUCHE, R.; ZINGALI, R.; KAROUI, H.; BOM, C. AND EL AYEB, M. Cerastocytin, a new thrombin-like platelet activator from the venom of the Tunisian viper *Cerastes cerastes*. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, v. 1244, p.147-156, 1995.
- MARRAKCHI, N.; BARBOUCHE, R.; BOM, C. AND EL AYEB, M. Cerastatin, a new potent inhibitor of platelet aggregation from the venom of the Tunisian viper, *Cerastes cerastes*. **Toxicon**, v. 35, p. 125-135, 1997.
- MORAN, J. B. AND GEREN, C. R. Characterization of a fibrinogenase from northern copperhead (*Agkistrodon contortrix mokasen*) venom. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Enzymology**, v. 659, p. 161-168, 1981.
- OLIVEIRA, F.; RODRIGUES, V. M.; BORGES, M. H. *et al.* Purification and partial characterization of new proteolytic enzyme from the venom of *Bothrops moojeni* (Caissaca). **Biochem. and Molec. Biology Int.**, v. 47, p. 1069-1077, 1999.
- OUYANG, C. AND HUANG, T. α - and β -fibrinogenases from *Trimeresurus gramineus* snake venom. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Enzymology**, v. 571, p. 270-283, 1979.
- PANDYA, B. V.; BUDZYNSKI, A. Z. Anticoagulant proteases from Western diamondback rattlesnake (*Crotalus atrox*) venom. **Biochem.**, v. 23, p. 460-470, 1984.

RODRIGUES, V. M.; SOARES, A. M.; ANDRIÃO-ESCARSO, S. H.; FRANCESCHI, A. M.; RUCAVADO, A.; GUTIÉRREZ, J. M.; AND GIGLIO, J. R. Pathological alterations induced by neuwiedase, a metalloproteinase isolated from *Bothrops neuwiedi* snake venom. **Biochimie**, v. 83, p. 471-479, 2001.

SANDRA H. P. FARSKY, LUÍS ROBERTO C. GONÇALVES and YARA CURY. Characterization of local tissue damage evoked by *Bothrops jararaca* venom in the rat connective tissue microcirculation: an intravital microscopic study. **Toxicon**, v. 37, p. 1079-1083, 1999.

SELISTRE, H. S.; GIGLIO, J. R. Isolation and characterization of the thrombin-like enzyme from the venom of the snake *Bothrops insularis* (jararaca ilhoa). **Toxicon**, v. 25, n. 11, p. 1135-1144, 1987.

SHIEH, T. C.; TANAKA, S.; KIHARA, H.; OHNO, M.; MAKISUMI, S. Purification and characterization of a coagulant enzyme from *Trimeresurus flavoviridis* venom. **J Biochem**, v. 98, n. 3, p. 713-721, 1985.

STOCKER, K. F. AND MEIER, K. Thrombin-like snake venom enzymes. In *Hemostasis and Animal Venoms*, eds H. Pirkle and F. S. Markland, pp. 67-84. Marcel Dekker, New York, 1988.

STOCKER, K. Composition of snake venoms. In *Medical Use of Snake Venom Proteins*, ed. K. F. Stocker, pp. 33-56. CRC press, Boca Raton, 1990a.

STOCKER, K. Snake venom protein affecting hemostasis and fibrinolysis. In *Medical Use of Snake Venom Proteins*, ed. K. F. Stocker, pp. 97-160. CRC press, Boca Raton, 1990b.

TAKEYA, H.; NISHIDA, S.; MIYATA, T.; KAWADA, S.; SAISAKA, Y.; MORITA, T.; IWANAGA, S. Coagulation factor X activating enzyme from Russell's viper venom

(RWV-X). A novel metalloproteinase with desintegrin (platelet aggregation inhibitor)-like and C-type lectin-like domains. **J. Biol. Chem.**, v. 267, p. 14109-14117, 1992.

TRAUTSCHOLD, I.; WERLE, E.; ZICKGRAF-RÜDEL, G. Purified inhibitor of trypsin, chymotrypsin, plasmin and especially kallikrein. For in vitro inhibition of fibrinolytic activity in blood samples. **Biochem. Pharmacol.**, v. 16, 59-72, 1967.

6. CONCLUSÃO GERAL

Neste trabalho, purificamos e caracterizamos parcialmente três enzimas fibrinogenolíticas: duas da peçonha de *B. alternatus* (Balt-F1 e Balt-F2) e uma da peçonha de *B. moojeni* (Bmoo-F). Todas as enzimas foram classificadas como α fibrinogenases e parecem pertencer à família das metaloproteases. As enzimas Balt-F2 e Bmoo-F são de especial interesse, pois apresentaram propriedades anticoagulantes. Dessa forma, estudos complementares podem propiciar o desenvolvimento de agentes antitrombóticos.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Bioscience Journal

Bloco 2U - sala 24 / Tel. 3218-2546 / Fax 3232-8620

Av. Pará, 1720 - Campus Umuarama / Uberlândia - MG - CEP. 38.400-902

Home page - <http://www.biosciencejournal.ufu.br> - e-mail- biosciencej@ufu.br

INDEXAÇÃO: AGRIS, AGROBASE, CAB ABSTRACTS, LILACS e PERIODICA

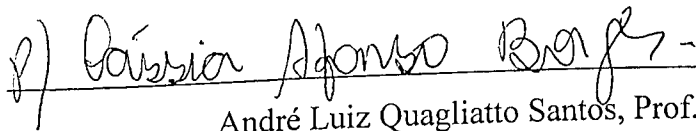
Uberlândia, 23 de julho de 2004

DECLARAÇÃO

Declaramos para os devidos fins que o artigo intitulado: "*Purificação de uma enzima fibrinogenolítica da peçonha da serpente Bothrops alternatus*", autoria de Júnia de Oliveira COSTA; Cristiani BALDO; Amélia HAMAGUCHI; Maria Inês Homsi BRANDEBURGO; Fábio de OLIVEIRA, foi aceito para publicação na Revista Bioscience Journal, v.19, n.3, Sept./Dec. 2003, pgs. 147-153.

Sem mais para o momento, subscrevemo-nos.

Atenciosamente,



André Luiz Quagliatto Santos, Prof. Dr.
Editor

**PURIFICAÇÃO DE UMA ENZIMA FIBRINOGENOLÍTICA DA PEÇONHA DA
SERPENTE *Bothrops alternatus***

PURIFICATION OF A FIBRINOGENOLYTIC ENZYME FROM THE VENOM OF *Bothrops
alternatus*

RESUMO: Este trabalho descreve a purificação de uma enzima fibrinogenolítica da peçonha de *Bothrops alternatus*. A enzima, denominada BaltF, foi purificada utilizando um simples passo de cromatografia em coluna de DEAE Sephacel. A análise por eletroforese em gel de poliacrilamida com agentes desnaturantes (SDS-PAGE) mostra que essa enzima apresenta uma banda homogênea com massa molecular aparente de 25 kDa. A enzima BaltF representa cerca de 2,2 % da peçonha total e apresenta-se com um alto grau de pureza. A enzima é desprovida de atividades hemorrágica, fosfolipásica A2 e coagulante e possui atividade proteolítica sobre as cadeias A- α e B- β do fibrinogênio bovino. A inibição da atividade fibrinogenolítica da enzima BaltF por agentes quelantes de íons metálicos como EDTA e 1,10-fenantrolina permite classificá-la como metaloprotease.

UNITERMOS: *Bothrops alternatus*, metaloprotease, fibrinogenase.

INTRODUÇÃO

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

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

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

A complexa lesão causada por essa peçonha se deve à somatória dos efeitos isolados dos diferentes componentes, com ações biológicas distintas ou com ação sinérgica. Os principais constituintes das peçonhas relacionados com os efeitos locais são as proteases, fosfolipases e miotoxinas.

Neste trabalho descrevemos a purificação de uma enzima fibrinogenolítica presente na peçonha de *Bothrops alternatus*.

MATERIAL E MÉTODOS

A peçonha bruta de *B. alternatus* foi gentilmente doada pela Prof^a. Dra. Vera Lúcia de Campos Brites, do Instituto de Biologia da Universidade Federal de Uberlândia (INBIO - UFU).

A peçonha foi dessecada a vácuo e armazenada a -20 °C até o momento do uso. A resina DEAE Sephacel e os reagentes: acrilamida, bis-acrilamida, fenilmetilsulfonil fluoreto (PMSF), N, N, N', N' - tetrametiletileno-diamino (TEMED), dodecil sulfato de sódio (SDS), azul brilhante de coomassie, ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), soroalbumina bovina, azul de bromofenol, β -mercaptoetanol, persulfato de amônio e os padrões para determinação das massas moleculares: fosforilase b (97.000), albumina bovina (66.000), ovoalbumina (45.000), anidrase carbônica bovina (30.000), inibidor de tripsina (20.100), α -lactoalbumina (14.400), foram adquiridos da Amersham Pharmacia Biotech. Os demais reagentes utilizados eram de grau analítico.

Cerca de 200 mg da peçonha bruta dessecada de *Bothrops alternatus* foram dissolvidos em 2,0 ml de tampão bicarbonato de amônio 0,05 M pH 7,8, centrifugados a 10.000 x g por 10 min em temperatura ambiente e aplicados a uma coluna de DEAE Sephacel (1,5 X 15 cm). As amostras foram eluídas com um gradiente convexo de concentração de bicarbonato de amônio (0,05 - 1,0 M) pH 7,8, utilizando uma câmara de mistura com um volume de 150 ml. As frações, contendo 3,0 ml cada, foram coletadas num fluxo de 20 ml/hora, por um coletor de frações Gilson. A absorbância de cada fração foi acompanhada em 280 nm, num espectrofotômetro Spekol UV/VIS (Zeiss).

As dosagens protéicas, em solução contendo 0,1 a 2,0 mg de proteínas, foram realizadas pelo método do microbiureto, conforme descrito por Itzhaki; Gill (1964). A curva padrão foi construída utilizando-se soroalbumina bovina.

A determinação da massa molecular aparente das amostras foi realizada por eletroforese em gel de poliacrilamida a 14%, com agentes desnaturantes, conforme a técnica descrita por Laemmli (1970). Foi utilizado um gel de empilhamento a 5 % em pH 6,8 contendo 0,125 M de Tris-HCl e 0,1 % de SDS e um gel de separação a 14 % em pH 8,8 e 0,1 % de SDS, mantendo a relação acrilamida:bis-acrilamida de 30:0,8 (m/m).

A atividade fibrinogenolítica foi realizada segundo Oliveira *et al.* (1999). Em 50 µl de uma solução de fibrinogênio bovino (1,5 mg/ml salina) foram adicionados 5 µg da enzima BaltF e a solução incubada por até 60 minutos a 37 °C. A amostra foi dissolvida 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 % (m/v) e azul de bromofenol a 0,05 %. Em seguida as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida a 14% com SDS como agente desnaturante.

A influência de agentes inibidores de proteases foi verificada quando a enzima BaltF foi pré-incubada por 30 minutos com EDTA 10 mM, 1,10 fenantrolina 10 mM, PMSF 10 mM, aprotinina 10 mM e β-mercaptoetanol 10 mM.

Cerca de 5 µg da enzima BaltF dissolvidos em um volume final de 50 µL de salina, foram pré-incubados por 30 minutos em diferentes pHs (3, 4, 5, 6, 7, 9, 10 e 11) e temperatura ambiente ou em diferentes temperaturas (30, 40, 50, 60, 70 e 80 °C) por 15 minutos e em pH 8. Em seguida as amostras foram colocadas em banho de gelo e a atividade fibrinogenolítica foi determinada como descrito acima.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O fracionamento da peçonha bruta de *Bothrops alternatus* foi realizado em gel de DEAE Sephacel num gradiente convexo de concentração em tampão bicarbonato de amônio 0,05 M a 1,0 M em pH 7,8. O perfil cromatográfico está mostrado na figura 1. A peçonha total foi resolvida em seis frações principais designadas de D1 a D6. Todas essas frações foram capazes de hidrolisar o fibrinogênio bovino (atividade fibrinogenolítica), em maior ou menor intensidade, com a fração D3 apresentando a maior atividade dentre todas as frações.

A análise por eletroforese em gel de poliacrilamida com agentes desnaturantes (SDS-PAGE) da fração D3 (tubo a tubo) mostrou que os tubos 51 a 54 eram constituídos por banda única (resultado não mostrado). Esse material, denominado de BaltF (Fibrinogenase de *Bothrops alternatus*), foi reunido, liofilizado e armazenado a -20 °C. A recuperação protéica para a BaltF mostrou que essa enzima representa cerca de 2,2 % da peçonha bruta de *Bothrops alternatus*.

A enzima BaltF apresentou elevada atividade fibrinogenolítica, mas não apresentou nenhuma atividade coagulante, fosfolipásica A2 ou hemorrágica com até 50 µg de proteína.

Quando analisada em SDS-PAGE a 14 %, a enzima BaltF apresentou cadeia única e massa molecular aparente de 25 kDa, na presença do agente redutor β-mercaptoetanol (figura 2) e 22 kDa na ausência desse agente redutor (resultado não mostrado). Essa diferença pode ser explicada pelo fato de a migração da molécula na eletroforese ser dependente do seu tamanho molecular. Considerando que na presença de β-mercaptoetanol a proteína sofre uma desnaturação mais efetiva devido ao rompimento das pontes dissulfetos, ela poderá aumentar o seu tamanho aparente e diminuir sua migração em relação à proteína sem β-mercaptoetanol.

Estudos de estabilidade enzimática mostraram que a enzima BaltF apresenta atividade máxima numa larga faixa de pH alcalino (figura 3A), mas não é ativa em elevadas temperaturas. Quando aquecida acima de 60 °C, durante 15 minutos, a enzima perde completamente sua atividade fibrinogenolítica (resultado não mostrado).

Quanto à estabilidade enzimática, a enzima BaltF apresenta um comportamento semelhante a várias outras proteases de peçonha de serpentes já purificadas e descritas na literatura (SELISTRE; GÍGLIO, 1987; KOSUKI *et al.*, 1986; SHIEH *et al.*, 1985).

Os testes de degradação das cadeias do fibrinogênio bovino mostraram que a enzima BaltF degrada a cadeia A- α mais rapidamente que a cadeia B- β , enquanto que a cadeia γ permanece inalterada, mesmo depois de 60 minutos. Esse mecanismo de hidrólise é comum para a maioria das fibrinogenases isoladas de peçonhas de serpentes (OLIVEIRA *et al.*, 1999; XIUXIA *et al.*, 2001).

As enzimas fibrinogenolíticas, encontradas nas peçonhas de serpentes, podem ser classificadas em três grupos, dependendo da especificidade de hidrólise das cadeias do fibrinogênio. O primeiro grupo são aquelas com preferência de hidrólise pela cadeia A- α (LEONARDI *et al.*, 2002; ESTÊVÃO-COSTA *et al.*, 2000), o segundo pela cadeia B- β (GUO *et al.*, 2001; SAMEL *et al.*, 2002) e o terceiro pela cadeia γ do fibrinogênio (NIKAI *et al.*, 1984). Nossos resultados sugerem que a BaltF pertence à classe α -fibrinogenases.

Muitas das enzimas fibrinogenolíticas de peçonha foram caracterizadas como metaloproteases dependentes de zinco. Membros desta família são assim chamados em virtude de apresentarem átomo de zinco em suas moléculas, o qual é essencial para sua ação catalítica (STOCKER *et al.*, 1995).

Dentre os inibidores de proteases testados para a enzima BaltF (figura 3B), a 1,10-fenantrolina e o EDTA foram capazes de inibir completamente a atividade dessa enzima. Os demais inibidores (β -mercaptoetanol, PMSF e aprotinina) não apresentaram efeito sobre esta atividade. Esses resultados são concordantes com a literatura e sugerem que a BaltF pertence à família das metaloproteases. (OWNBY *et al.*, 1994).

Bjarnason e Fox (1994) dividiram as metaloproteases em três classes de acordo com suas massas moleculares. A classe P-I corresponde a toxinas pequenas com atividade hemorrágica relativamente fraca e com massas moleculares de 20 - 30 kDa. Essas enzimas possuem três

domínios estruturais: pré e pró-domínio, além do domínio protease ligante de zinco. Na classe P-II estão as toxinas de tamanho médio com massas moleculares de 30 - 60 kDa e na classe P-III as toxinas são altamente hemorrágicas com massas moleculares de 60 - 100 kDa.

Com base na sua massa molecular, a enzima BaltF poderia ser incluída na classe P-I das metaloproteases, possuindo apenas o domínio protease na proteína madura. Dentro da classe P-I, essas enzimas pertenceriam ao subgrupo P-IB, junto com as metaloproteases Htc e Ht-d de *Crotalus atrox* (BJARNASON; FOX, 1994), protease A de *Bothrops moojeni* (ASSAKURA *et al.*, 1985), LHF-II de *Lachesis muta* (SANCHES *et al.*, 1991) e BaPI de *B. asper* (GUTIÉRREZ *et al.*, 1995). Todas essas enzimas possuem somente o domínio protease e exercem fraca atividade hemorrágica.

As enzimas fibrinogenolíticas de peçonhas de serpentes, têm sido muito usadas para o tratamento e prevenção de disfunções cardiovasculares. Essas enzimas levam à rápida diminuição do fibrinogênio *in vivo*, causando um efeito anticoagulante e a diminuição da viscosidade do sangue. Vários estudos revelaram que essas enzimas induzem trombólise de forma consistente, eficaz e segura (WILLIS; TU., 1989; GASMI *et al.*, 1997).

Estudos adicionais serão necessários para melhor caracterizar a enzima BaltF e verificar sua possível aplicação terapêutica em doenças cardiovasculares.

CONCLUSÕES

Os procedimentos cromatográficos utilizados neste trabalho permitiram purificar uma enzima fibrinogenolítica presente na peçonha de *Bothrops alternatus*. A enzima, denominada BaltF, é uma metaloprotease de cadeia simples e apresenta massa molecular aparente de 25 kDa. A enzima foi caracterizada como uma α -fibrinogenase.

ABSTRACT: This work describes the purification of a fibrinogenolytic enzyme from the venom of *Bothrops alternatus*. The enzyme, termed BaltF, was purified using a single step chromatography on DEAE Sephacel. BaltF was shown to be homogeneous with molecular mass of about 25 kDa as demonstrated by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. BaltF represents about 2.2 % of the total venom protein and was purified to a high degree of purity. The enzyme is devoid of hemorrhagic, phospholipase A2 and blood-clotting activities and shows a high proteolytic activity towards A- α and B- β chains of bovine fibrinogen. The inhibition of the fibrinogenolytic activity of BaltF by chelant compounds such as EDTA and 1,10-phenantroline supports its classification as a metalloproteinase.

UNITERMS: *Bothrops alternatus*, metalloproteinase, fibrinogenase.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ASSAKURA, M. T.; REICHL, A. P.; ASPERTI, M. C. A.; MANDELBAUM, F. R. Isolation of the major proteolytic enzyme from the venom of the snake *Bothrops moojeni* (Caissaca). **Toxicon**, v. 23, n. 4, p. 691-706, 1985.
- BJARNASON, K. B.; FOX, J. W. Hemorrhagic metalloproteinases from snake venoms. **Pharmac. Ther.**, v. 62, n. 3, p. 325-372, 1994.
- ESTÊVÃO-COSTA, M. I.; DINIZ, C. R.; MAGALHÃES, A.; MARKLAND, F. S.; SANCHEZ, E. F. Action of metalloproteinases mutalysin I and II on several components of the hemostatic and fibrinolytic systems. **Thromb Res.** V. 99, n. 4, p. 363-376, 2000.
- GASMI, A.; CHABCHOUB, A.; GUERMAZI, S.; KAROUI, H.; ELAYEB, M.; DELLAGI, K. Further characterization and thrombolytic activity in a rat model of a fibrinogenase from *Vipera lebetina* venom. **Thromb. Res.**, v 86, n. 3, p. 233-242, 1997.
- GUO, Y. W.; CHANG, T. Y.; LIN, K. T.; LIU, H. W.; SHIH, K. C.; CHENG, S. H. Cloning and functional expression of the mucrosobin protein, a beta-fibrinogenase of *Trimeresurus mucrosquamatus* (Taiwan Habu). **Protein Expr. Purif.** v. 23, n. 3, p. 483-90, 2001.
- GUTIÉRREZ, J. M.; ROMERO, M.; DIAZ, C.; BORKOW, G.; OVADIA, M. Isolation and characterization of a metalloproteinase with hemorrhagic activity from the venom of the snake *Bothrops asper* (Terciopelo). **Toxicon**, v. 33, n. 1, p. 19-29, 1995.

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

KOSUKI, T.; ARIGA, Y.; NAKAMURA, M.; KINJO, K. Purification and some chemical properties of thrombin-like enzyme from *Trimeresurus flavoviridis* venom. **Thromb Haemost.**, v. 55, n. 1, p. 24-30, 1986.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage t4. **Nature**, v. 227, n. 259, p. 680-689, 1970

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

MEBS, D.; OWNBY, C. L. Myotoxic components of snake venoms: their biochemical and biological activities. **Pharm. Ther.**, v. 48, n. 2, p. 223-236, 1990.

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

NIKAI, T.; MORI, N.; KISHIDA, M.; *et al.* Isolation and biochemical characterization of hemorrhagic toxin from the venom of *Crotalus atrox*. **Arch. Biochem. Biophys**, v. 231, n. 3, p. 309-311, 1984.

OLIVEIRA, R. B. Fatores epidemiológicos e clínicos associados à incoagulabilidade sanguínea no envenenamento por serpentes do gênero *Bothrops*. Uberlândia, 1999. 95f. Dissertação (Mestrado em Clínica Médica) - Curso de Pós-Graduação em Clínica Médica, Universidade Federal de Uberlândia.

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

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

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

SANCHEZ, E. F.; DINIZ, C. R.; RICHARDSON, M. The complete amino acid sequence of the haemorrhagic factor LHFII, A metalloproteinase isolated from the venom of the bushmaster snake (*Lachesis muta muta*) **FEBS Lett**, v. 282, n. 1, p. 178, 1991.

SELISTRE, H. S.; GIGLIO, J. R. Isolation and characterization of the thrombin-like enzyme from the venom of the snake *Bothrops insularis* (jararaca ilhoa). **Toxicon**, v. 25, n. 11, p. 1135-1144, 1987.

SHIEH, T. C.; TANAKA, S.; KIHARA, H.; OHNO, M.; MAKISUMI, S. Purification and characterization of a coagulant enzyme from *Trimeresurus flavoviridis* venom. **J Biochem**, v. 98, n. 3, p. 713-721, 1985.

STOCKER, W.; GRAMS, F.; BAUMANN, U.; REINEMER, P.; GOMIS-RUTH, F.-X.; MCKAY, D. B.; BODE, W. The metzincins-topological and sequential relations between the astacins, adamalysins, serralysins, and matrixins (coltagenases) define a superfamily of zinc-peptidases. **Protein Science**, v. 4, n. 5, p. 823-840, 1995.

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

WILLIS, T. W.; TU, A. T. Purification and biochemical characterization of atroxase, a nonhemorrhagic fibrinolytic protease from western diamondback rattlesnake venom. **Biochemistry**, v. 27, n. 13, p. 4769-4777, 1989.

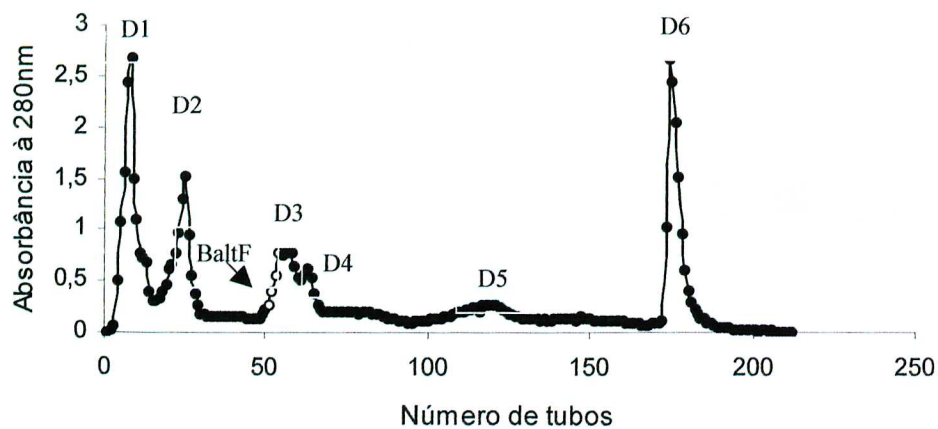


Figura 1. Fracionamento de 200 mg da peçonha bruta de *Bothrops alternatus* em coluna de DEAE Sephacel (1,5 X 15 cm), equilibrada com tampão bicarbonato de amônio 0,05M, pH 7,8. As amostras foram eluídas num gradiente convexo de concentração (0,05 – 1,0 M) do mesmo tampão, num fluxo de 20 ml/h à temperatura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

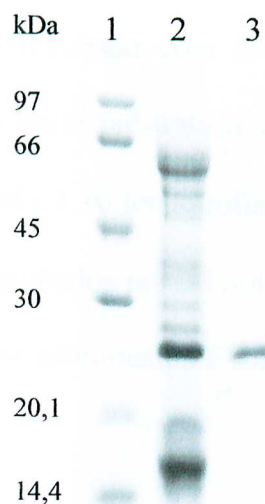


Figura 2. Eletroforese em gel de poliacrilamida a 14 % com agentes desnaturantes para a estimativa da massa molecular da enzima BaltF.

Linha 1- Padrão de massa molecular: fosforilase b (97.000), albumina bovina (66.000), ovoalbumina (45.000), anidrase carbônica (30.000), inibidor de tripsina (20.100) e α -lactoalbumina (14.400); **2** - peçonha bruta de *Bothrops alternatus*; **3** - enzima BaltF.

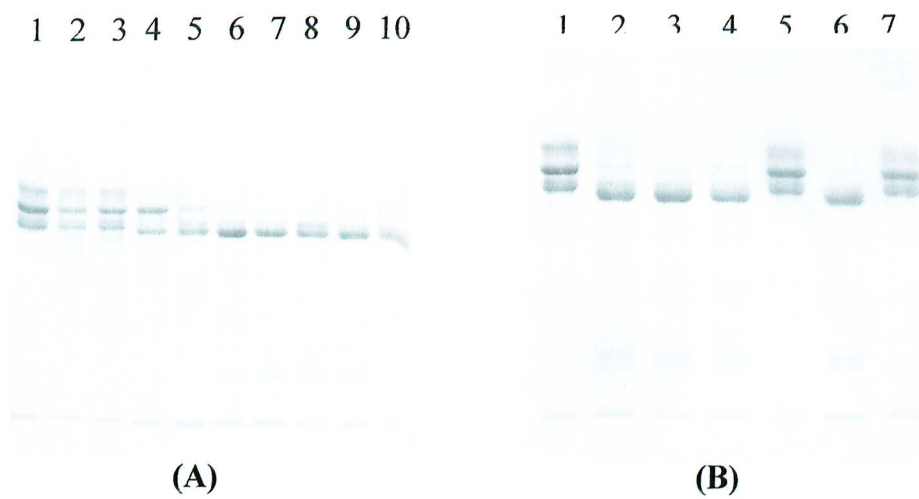


Figura 3. Eletroforese em gel de poliacrilamida a 14 % com agentes desnaturantes. **(A)** Produtos de digestão do fibrinogênio bovino pela enzima BaltF pré-incubada em vários pHs. Linha 1- fibrinogênio bovino controle, sem BaltF; linhas 2 a 10- fibrinogênio acrescido de BaltF pré-incubada em pHs 3 a 11, respectivamente. **(B)** Produtos de digestão do fibrinogênio bovino pela enzima BaltF pré-incubada com inibidores de proteases. Linha 1- fibrinogênio bovino controle, sem BaltF; linha 2- fibrinogênio incubado com BaltF por 60 minutos em pH 8,0; linhas 3 a 7- fibrinogênio incubado com a BaltF pré-tratada com PMSF 10 mM, aprotinina 10 mM, EDTA 10 mM, β-mercaptoetanol 10 mM e 1,10 fenantrolina 10 mM, respectivamente. Para cada ensaio, 5 µg da enzima BaltF foram pré-incubados por 30 minutos em cada pH, ou com inibidores de proteases, como indicado acima, e depois adicionados à solução de fibrinogênio e deixados reagir em pH 8,0 durante 60 minutos.