

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

Purificação parcial e atividades proteolíticas de uma nova enzima thrombin-like isolada da
peçonha de *Bothrops pauloensis*

Fábio Lucas Silva Costa

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

Uberlândia – MG
Julho – 2005

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

Purificação parcial e atividades proteolíticas de uma nova enzima thrombin-like isolada da
peçonha de *Bothrops pauloensis*

Fábio Lucas Silva Costa

Dr^a. Veridiana de Melo Rodrigues Ávila

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

Uberlândia – MG
Julho – 2005

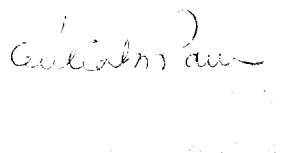
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Purificação parcial e atividades proteolíticas de uma nova enzima thrombin-like isolada da
peçonha de *Bothrops pauloensis*

Fábio Lucas Silva Costa

Dr^a Veridiana de Melo Rodrigues Ávila

Homologado pela coordenação do Curso
de Ciências Biológicas em 27 / 07 / 05



Cecília Lomônaco de Paula
Coordenadora do curso de Ciências Biológicas

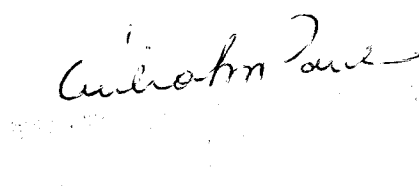
Uberlândia – MG
Julho – 2005

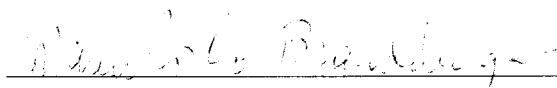
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Purificação parcial e atividades proteolíticas de uma nova enzima thrombin-like isolada da
peçonha de *Bothrops pauloensis*

Fábio Lucas Silva Costa

Aprovado pela Banca Examinadora em: 25/04/05 Nota: 100,0





Prof.^a Dr.^a Maria Inês Homs-Brandeburgo

Prof.^a Dr.^a Vera Lúcia de Campos Brites



Prof.^a Dr.^a Amélia Hamaguchi.

Uberlândia, de de

*Durante todos esses anos do meu viver...
a minha vida foi constituída por várias fases:
umas boas...outras ruins, de muitas preocupações.
São os desafios que a vida nos oferece!*

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho

À minha mãe D. Maria a quem não poderei jamais deixar de agradecer, por ter sido a grande incentivadora de tudo isto.

À minha família e amigos, companheiros constantes de todos os momentos.

Às professoras Maria Inês Homs-Brandeburgo, Amélia Hamaguchi e Veridiana de Melo Rodrigues Ávila pela orientação criteriosa, confiabilidade e pela contribuição na minha formação profissional. Meus agradecimentos e admiração.

AGRADECIMENTOS

À professora Dra Maria Inês Homs-Brandeburgo por ter me dado a oportunidade de trabalhar no laboratório e ter confiado em meu potencial.

À professora Dra Veridiana de Melo Rodrigues Ávila por aceitar a me orientar em uma fase mais ou menos crítica do desenvolvimento deste trabalho. Obrigado por ter acompanhado meu crescimento nestes últimos anos.

À professora Dra Amélia Hamaguchi pela disposição em sempre tirar minhas dúvidas e por me emprestar textos e livros para estudos.

À professora Dra Vera Lúcia de Campos Brites que contribuiu com o enriquecimento deste trabalho.

Aos meus irmãos, especialmente à Fernanda e Fabiana que sempre foram mais presentes na minha vida e me ajudaram muito em tudo que precisei.

À grande amiga Renata, primeiramente por ter colocado este projeto em minhas mãos, pela orientação e mostrar caminhos de crescimento pessoal. Admiro muito a sua maneira carismática de tratar as pessoas, continue assim...Obrigado por tudo.

Ao amigo Luís Henrique pelo excelente convívio e por ter me ajudado nas análises estatísticas deste trabalho.

À minha amiga Marília, que tornou a minha vida no laboratório mais alegre...Obrigado por poder contar com você para lamentar os meus momentos de desânimo e dividir momentos de felicidade que não só este trabalho, mas a vida podia me oferecer.

Ao amigo Danilo pelo incentivo e contribuição indispensável. Muito obrigado pela troca de experiências que colaborou muito para este trabalho.

Aos colegas de laboratório: Luís Fernando, Luís Carlos, Cristiane, Carla, Daiana, Luís Antônio, Carol, Johara, Rodrigo, pelo convívio diário e troca de experiências.

Aos novos amigos do laboratório, Mário e Luciana.

Aos funcionários do Instituto: Marlene, Tianinha, Gerson, Sr. Vilmar, Dona Nenzinha e Cleuber.

Não posso também deixar esquecidas as pessoas que contribuíram de uma maneira ou de outra, para a minha realização como pessoa e amigo, dando-me força e coragem. Aos meus grandes amigos, Letícia do Nascimento, Alexandre, Luísa, Letícia Sueiro; André, Daniele, Marcela, Clarissa, Rita e Renata (Japa Girl) ...a vocês que sem dúvidas fizeram com que eu fosse mais alegre e persistente nos meus objetivos.

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

SUMÁRIO

1-). Introdução	1
2-). Material e Métodos	9
2.1-) Material	9
2.2-) Métodos	10
2.2.1-) Cromatografia de troca iônica da peçonha de <i>Bothrops pauloensis</i> em gel de CM-Sepharose	10
2.2.2-) Cromatografia em gel de afinidade da fração CM4 em Benzamidina Sepharose	10
2.2.3-) Determinação quantitativa de proteínas	11
2.2.4-) Eletroforese em gel de poliacrilamida com agentes desnaturantes	11
2.2.5-) Eletroforese em gel de poliacrilamida sem agentes desnaturantes para proteínas básicas	12
2.2.6-) Ensaio enzimáticos e biológicos	13
2.2.6.1-) Atividade coagulante	13
2.2.6.2-) Atividade fibrinogenolítica	13
2.2.6.3-) Teste de degradação da caseína bovina	14
2.2.6.4-) Atividade esterásica sobre o TAME	15
2.2.6.5-) Ensaio de incoagulabilidade sanguínea	15
2.2.6.6-) Análise estatística	15
3-). Resultados	16
3.1-) Purificação parcial e caracterização bioquímica	16
3.1.1-) Cromatografia de troca iônica da peçonha bruta de <i>Bothrops pauloensis</i> em gel de CM-Sepharose	17

3.1.2-) Cromatografia em gel de afinidade da fração CM4 em Benzamidina Sepharose	18
3.1.3-) Recuperação protéica das frações obtidas nos fracionamentos	19
3.1.4-) Eletroforese em gel de poliacrilamida com agentes desnaturantes	20
3.1.5-) Eletroforese em gel de poliacrilamida sem agentes desnaturantes para proteínas básicas	21
3.2-) Ensaio enzimáticos e biológicos	23
3.2.1-) Atividade coagulante	23
3.2.2-) Atividade fibrinogenolítica	24
3.2.3-) Teste de degradação da caseína bovina	27
3.2.4-) Atividade esterásica sobre o TAME	28
3.2.5-) Ensaio de incoagulabilidade sangüínea	29
4-) Discussão	30
5-) Conclusões	35
6-) Referências Bibliográficas	36

Lista de Abreviaturas

- AMBIC: tampão bicarbonato de amônio
- Bis-Acrilamida: N, N' metileno-bis-acrilamida
- CM: grupo carboximetil
- $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$: sulfato de cobre penta hidratado
- EDTA: ácido etilenodiaminotetracético
- i.p.: intra-peritoneal
- KOH: hidróxido de potássio
- NaCl: cloreto de sódio
- NaOH: hidróxido de sódio
- PAGE: eletroforese em gel de poliacrilamida
- PB: peçonha bruta
- PM: peso molecular
- PMSF: fenilmetilsulfonil fluoreto
- SDS: dodecil sulfato de sódio
- SVSPs: serinoproteases de venenos de serpentes
- TAME: N-p-tolueno-sulfonil arginina metil éster
- TEMED: N, N, N', N'-tetrametil etilenodiamina
- TRIS: tris hidroximetilaminometano

Resumo

Peçonhas de serpentes, particularmente aquelas encontradas no gênero *Bothrops*, são conhecidas por conter muitas enzimas proteolíticas que alteram a coagulação sanguínea, causam hemorragias, fibrinogenólises e necroses. O presente trabalho mostra a purificação parcial de uma enzima proteolítica da peçonha de *Bothrops pauloensis*. A peçonha bruta foi submetida em CM-Sepharose fast flow e foram obtidas cinco frações (CM1-CM5). A fração CM4 foi submetida em Benzamidina Sepharose e resultou em três frações (B1-B3). A fração B3 mostrou uma banda majoritária de 35kDa (estimado por SDS-PAGE) e com caráter básico em condições de PAGE-NATIVA. A atividade coagulante usando 5µg de amostra sobre o plasma bovino foi realizada. A peçonha bruta de *Bothrops pauloensis* induziu a coagulação do plasma em aproximadamente 60s e a fração B3 induziu em 6s. Atividades proteolíticas sobre o fibrinogênio (tempo-dependente e dose-dependente) e a caseína também foram determinadas, quando amostras de 75µL de fibrinogênio bovino ou caseína (1mg/mL PBS) eram incubadas com a fração B3 (5µg). Estas atividades foram analisadas em SDS-PAGE (14%). A fração B3 degradou a cadeia Aα do fibrinogênio bovino mais rapidamente do que a cadeia Bβ. A atividade proteolítica da fração B3 sobre a caseína, mostrou que a enzima não foi capaz de digerir a caseína depois de 30 minutos de incubação. A fração B3 foi analisada sobre o TAME e os resultados mostram que a enzima obteve uma excelente ação sobre este substrato. Os ensaios de incoagulabilidade sanguínea mostram que a fração B3 tornou o sangue dos animais incoagulável. Este estudo mostra que a peçonha de *Bothrops pauloensis* possui uma proeminente enzima proteolítica, a qual induz uma importante alteração hemostática.

Palavras-chave: *Bothrops pauloensis*, peçonha, ‘thrombin-like’, coagulação, proteolítica, serinoproteases.

1-) Introdução

O gênero *Bothrops*, pertencente à família Viperidae, possui algumas das espécies mais importantes do ponto de vista médico, já que por ano são relatados de acordo com dados do Ministério da Saúde, cerca de 18.000 acidentes botrópicos, o que equivale a 90% dos acidentes ofídicos que o Brasil registra. A letalidade aproxima-se de 0,3% nos casos tratados (CARDOSO et al., 2003). Este gênero é formado por serpentes de médio a grande porte e são conhecidas por serem muito ágeis e agressivas. Particularmente, em regiões rurais e tropicais, picadas por elas causam morbidez e mortalidade nas vítimas (CASTRO et al., 2001). Estas serpentes são conhecidas popularmente como jararaca ou jararaca-de-rabo-branco.

O complexo de espécies *Bothrops neuwiedi* está presente numa vasta extensão territorial da América do Sul, atingindo boa parte do Brasil com exceção da Bacia Amazônica.

Bothrops pauloensis foi descrita por Amaral em 1925 como *Bothrops neuwiedi pauloensis*, constituindo uma das doze subespécies de *Bothrops neuwiedi*. Recentemente, com a revisão sistemática do complexo *Bothrops neuwiedi* realizado por Silva (2000) as doze subespécies passaram a ser consideradas sete espécies distintas, proposta esta aceita pela Sociedade Brasileira de Herpetologia (SBH, 2005).

Bothrops pauloensis está listada apenas no Brasil, tendo sido registrada em Minas Gerais, Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul e São Paulo (SILVA, 2000). Ocorre no Cerrado da zona geográfica do Triângulo e Alto Paranaíba, inclusive em áreas alteradas (BRITES et al., 1988), tendo-se durante o verão obtido 53,7 mg de produção máxima de peçonha cristal (BAUAB et al, 1992).

As serpentes peçonhentas, para se defenderem possuem glândulas exócrinas modificadas que sintetizam, armazenam e secretam toxinas, as quais são formadas por complexas misturas de 50-60 proteínas/peptídeos de diferentes estruturas e com uma ampla variedade de atividades biológicas (MATSUI et al., 2000). Na peçonha encontram-se também outros componentes em menor quantidade como cátions metálicos, citratos, carboidratos, nucleosídeos, aminas, aminoácidos e lipídeos (MARKLAND, 1998).

Muitas toxinas de serpentes são enzimas, como as proteases, fosfolipases A₂, fosfodiesterases, 5' -nucleopeptidases, metaloproteinases e serinoproteinases (SVSPs), diversas das quais são particularmente interessantes já que interferem no controle e regulação do sistema hemostático (BRAUD et al., 2000).

As enzimas proteolíticas podem apresentar ação nos constituintes da própria peçonha. De fato, algumas proteínas são derivadas de grandes precursores que são quebrados durante a formação da peçonha. Esta atividade proteolítica endógena aumenta a variabilidade das toxinas fazendo assim com que diferenças individuais em uma mesma espécie de serpente sejam observadas (SOUSA et al., 2000). Em 1996, DALTRY et al. publicaram um interessante trabalho, no qual descreveram que a presença de determinados componentes da peçonha de uma mesma espécie de serpentes depende da variação geográfica em que estão submetidas, em associação com a dieta utilizada por elas.

O envenenamento por serpentes botrópicas é caracterizado primeiramente por edema e dor, que são efeitos locais com mionecroses agravadas por hemorraginas. Em seguida, há infiltração de leucócitos, hemorragia e formação de trombos intravasculares que podem conduzir à destruição severa dos tecidos (ROSENFELD, 1971).

Alterações sistêmicas como hipotensão, incoagulabilidade sanguínea, com intenso consumo de fibrinogênio e distúrbios respiratórios são comuns após o envenenamento botrópico. Ataques cardiovasculares freqüentemente causam a morte da vítima. Em adição a isso, a peçonha pode conter determinados componentes que induzirão mioglobínúria na vítima, além de liberar agentes bioativos como a histamina e bradicinina (ANDRIÃO-ESCARSO et al., 1996).

A principal ação sistêmica após o envenenamento botrópico é o desequilíbrio da hemostasia. Toxinas que alteram o sistema hemostático de mamíferos são conhecidas por apresentarem efeitos procoagulantes ou anticoagulantes (MARKLAND, 1998). Estes componentes interagem com diversas proteínas do sistema de coagulação sanguínea e do sistema fibrinolítico (MATSUI, 2000; MARKLAND, 1998). Geralmente, elas são classificadas em vários grupos tais como: enzimas com atividade coagulante sobre o fibrinogênio, enzimas fibrino(geno)líticas, ativadores de plasminogênio, ativadores de protrombina, ativadores de fator V e X, hemorraginas e inibidores da agregação plaquetária (MARKLAND, 1998). Evidentemente, essas atividades são extremamente complexas e podem, usualmente, ser atribuídas a componentes específicos. No entanto, diferentes toxinas podem atuar sinergicamente para induzir um mesmo efeito e uma dada toxina pode

ter várias atividades (CARDOSO et al., 2003). Estes estudos têm atraído considerável atenção já que são úteis como potentes ferramentas em testes laboratoriais, usos clínicos e como modelos teóricos de hemostasia e trombose.

As principais classes de enzimas proteolíticas encontradas nas peçonhas de serpentes são as metaloproteinases e serinoproteases (SVSPs). As metaloproteinases apresentam massa molecular que varia de 20 a 100kDa e podem apresentar o domínio catalítico associado ou não com a desintegrina ou com domínio rico em cisteína ou ainda com domínio lectina, estas proteases são dependentes de íons metálicos para exercer a sua função biológica, são altamente tóxicas e muitas apresentam ação fibrinogenolítica, sendo de grande interesse clínico no combate à formação de trombos (KAMIGUTI et al., 1996).

As SVSPs pertencem a uma grande família de peptidases (conhecida como Tripsina S1) que possuem estrutura semelhante à tripsina, entretanto apesar da similaridade estrutural com a tripsina elas freqüentemente atuam em substratos macromoleculares específicos (SERRANO et al., 2005). Estas proteases possuem a capacidade de interferir em pontos distintos da coagulação sanguínea causando desordem no sistema hemostático das vítimas (JIN et al., 2004) e são abundantes nas peçonhas de Viperidae e Crotalidae. Geralmente, elas não causam letalidade, mas contribuem para o efeito tóxico quando associado com outras proteínas da peçonha. As SVSPs afetam a cascata de coagulação sanguínea por degradação proteolítica ou seletivamente, por ativação ou inibição específica de fatores coagulantes envolvidos na agregação plaquetária, coagulação e fibrinólise (BRAUD et al.; 2000).

Muitas SVSPs já foram identificadas em peçonhas de serpentes, por exemplo, a enzima chamada balterobina isolada a partir da peçonha de *Bothrops alternatus* (SMOLKA et al., 1997), as elegaxobinas I e II isoladas de *Trimeresurus elegans* (OYAMA et al., 1999; OYAMA et al., 2002), as calobinas I e II isoladas de *Agkistrodon caliginosus* (HAHN et al., 1996; CHO et al., 2000), a jararacussina I isolada de *Bothrops jararacussu* (BORTOLETO et al., 2002) e em 2004 YOU et al. publicaram um trabalho em que caracterizaram funcionalmente a estrutura recombinante de uma SVSPs, isolada da toxina da serpente de *Pichia pastoris*.

Estudos de seqüências de aminoácidos dessa classe de proteases indicam que a maioria delas possuem um domínio catalítico formado por uma tríade de três resíduos: His⁵⁷, Asp¹⁰² e Ser¹⁹⁵, os quais são conservados em posições análogas em relação às serinoproteases de mamíferos (MATSUI et al., 2000; BURKHART et al., 1992).

A quimotripsina uma típica serinoprotease de mamíferos de função digestiva é caracterizada por um mecanismo catalítico comum que inclui uma alta reatividade do resíduo de serina que exerce um papel-crítico na formação de um complexo transiente acil enzimático, o qual é estabilizado pela presença de resíduos de histidina e ácido aspártico dentro do sítio ativo (BARRET et al., 1995 apud SERRANO et al., 2005). A alta reatividade da serina é demonstrada pela habilidade em reagir com diisopropilfosforidrato (DIPF), formando um complexo inativo que é indefinidamente estável; estas reações ocorrem com a maioria das SVSPs. (RODWELL apud HARPER'S et al.; 1996).

Já é bastante conhecido que as SVSPs interferem nas complexas reações do sistema de coagulação sanguínea. Em condições fisiológicas este processo pode ser iniciado por duas vias: intrínseca e extrínseca. Estas vias convergem para a ativação do fator X que culmina na formação do coágulo de fibrina (JOSHEP et al., 2002). Neste processo, a trombina é a enzima chave pois apresenta a capacidade de formação e estabilização de coágulos de fibrina, através da conversão do fibrinogênio, além disto também induz agregação plaquetária e é capaz de ativar os fatores V, VIII, XI e XIII da coagulação sanguínea (TANAKA-AZEVEDO et al., 2004).

O fibrinogênio é uma molécula formada por três unidades globulares, conectadas por dois bastões. Sua massa molecular é de 340kDa e é constituído de três tipos de cadeias: $A\alpha$, $B\beta$, γ . A trombina atua clivando quatro ligações peptídicas arg inina-glicina na região globular central do fibrinogênio para liberar um fibrinopeptídeo A de 18 aminoácidos de cada uma das duas cadeias α e um fibrinopeptídeo B de 20 aminoácidos de cada uma das duas cadeias β , a molécula de fibrinogênio destituída destes fibrinopeptídeos é chamada de monômero de fibrina (WEISEL; 1986 apud STRYER, L.; 1996).

Algumas SVSPs de peçonhas ofídicas são freqüentemente referidas como enzimas thrombin-like por possuírem a habilidade em clivar o fibrinogênio de forma semelhante à trombina, liberando fibrinopeptídeos A, fibrinopeptídeos B ou ambos (BORTOLETO et al., 2002). No entanto essas proteases não apresentam todas as multifunções da trombina, apesar de muitas delas apresentarem o poder de ativar o fator VIII ou induzir a agregação plaquetária como a trombina (MATSUI et al., 2000). Em adição, algumas SVSPs de peçonhas também participam de diversos outros processos biológicos como ativação do plasminogênio, proteína C, fatores V e X e fibrinólises (BORTOLETO et al., 2002).

Embora as thrombin-like sejam capazes de transformar fibrinogênio plasmático em fibrina, estas não ativam o fator XIII da cascata de coagulação, que é responsável pela formação do coágulo denso; assim estas enzimas thrombin-like permitem apenas a formação de um coágulo frouxo, o qual é formado por pequenos polímeros que são rapidamente dispersos e removidos por fibrinólise ou via sistema retículo-endotelial (FURUKAWA et al., 1990 apud CHO et al., 2001).

Baseado na liberação de fibrinopeptídeos A e B do fibrinogênio, estas enzimas thrombin-like são organizadas em três grupos (MARKLAND, 1998).

O primeiro grupo denominado de venombina A atua clivando o fibrinogênio e liberando preferencialmente fibrinopeptídeo A e inclui enzimas coagulantes, com especificidade semelhante à trombina, porém não ativam o fator XIII da coagulação e já foram purificadas e descritas na literatura como a batroxobina isolada de *Bothrops atrox* (STOCKER et al., 1976), a crotalase isolada de *Crotalus adamanteus* (MARKLAND et al., 1971 apud SERRANO et al., 2005) e a ancrod isolada de *Calloselasma rhodostoma* (NOLAN et al., 1976 apud SERRANO et al., 2005).

O segundo grupo de enzimas coagulantes é denominado de venombina B, as quais liberam preferencialmente fibrinopeptídeos B do fibrinogênio e são representadas pelas proteases contortrixobinas isoladas da peçonha de *Agkistrodon contortrix contortrix* (AMICONI et al.; 2000), estas proteases não causam agregação plaquetária e nem ativam o fator XIII da coagulação (MAGALHÃES et al., 2003).

Por fim, o terceiro grupo de enzimas coagulantes são o grupo venombina AB, estas são capazes de liberar ambos os fibrinopeptídeos A e B do fibrinogênio e como a trombina ativam o fator XIII da coagulação e são representadas pelas enzimas gabonase (PIRKLE et al., 1986 apud SERRANO et al., 2005) e bilineobina (KOMORI et al., 1993; NIKAI et al., 1995 apud SERRANO et al., 2005).

As thrombin-like purificadas apresentam comportamento antagônico, pois possuem ação coagulante “*in vitro*” e causam incoagulabilidade “*in vivo*” (MARKLAND, 1998).

Muitas dessas thrombin-like estão sendo usadas na área médica em tratamentos clínicos de distúrbios do sistema de coagulação e de várias doenças tromboticas incluindo trombose das veias de maior calibre, infarto do miocárdio, embolismo pulmonar e isquemia aguda (YOU et al., 2004). Estas enzimas também têm sido muito utilizadas no tratamento e prevenção de disfunções cardiovasculares, já que levam à rápida diminuição do fibrinogênio “*in vivo*”, causando um efeito anticoagulante e por consequência há uma

diminuição da viscosidade do sangue, resultando por fim em melhoras na circulação sanguínea (KOH et al., 2000).

São bastante conhecidas e utilizadas como agentes desfibrinogénantes as enzimas: ancrod, batroxobina e crotalase. Estas três enzimas apresentam atividades coagulantes “*in vitro*”, proteolítica e esterásica, embora o mecanismo básico da ação desfibrinogénante seja um efeito proteolítico sobre o fibrinogénio circulante.

Ancrod e batroxobina têm sido usadas em pacientes com trombose de veias profundas, infarto do miocárdio e trombose arterial periférica. O tratamento é bem tolerado e os efeitos colaterais sérios são raros (SHARP et al., 1968; STOCKER et al., 1976; apud BRAUD et al., 2000).

SOSZKA et al. (1985) relataram que a batroxobina e ancrod atuam principalmente no sistema fibrinolítico por estimulação de células endoteliais vasculares que aumentam seletivamente a secreção de pro-urokinase.

A importância do sistema fibrinolítico na ação dessas enzimas foi demonstrada pelo uso de inibidores da fibrinólise em animais perfundidos com batroxobina e ancrod. Este tratamento conduziu a formação de coágulo “*in vivo*” e morte. O mecanismo de ação desfibrinogénantes das thrombin-like pode ser entendido como descrito por esses autores. A enzima estimula a secreção dos ativadores de plasminogénio, que o convertem em plasmina. A plasmina hidrolisa a cadeia β da fibrina e desfaz o coágulo.

Esses estudos permitem-nos inferir que estas toxinas podem ser utilizadas como ferramentas para a investigação da função plaquetária, como também na elaboração de fármacos, que atuam no equilíbrio hemostático, e agentes desfibrinogénantes terapêuticos (BORTOLETO et al., 2002)

As thrombin-like também são capazes de formar a “cola de fibrina”, que é um efetivo agente hemostático e selante para tecidos defeituosos e têm sido largamente empregado em muitos processos cirúrgicos. Os componentes desta cola são o fibrinogénio, a trombina e íons cálcio e seu mecanismo de ação é imitar o sistema de coagulação para interromper o extravasamento sanguíneo. Em presença de trombina e íons cálcio, moléculas de fibrinogénio são proteolicamente clivadas e convertidas em monômeros de fibrina. Uma vez aplicado no paciente, a cola é aos poucos reabsorvida por fibrinólise (WANG, M-C et al., 1995).

A cola de fibrina pode ser utilizada como agente hemostático em vários procedimentos cirúrgicos, tais como esplenectomia, preservação esplênica, trauma

hepático, cirurgias cardiotorácicas, utilizada também como selante em ruptura de tendões, de nervos, em neurocirurgias, em oftalmologia nas técnicas de microcirurgias, além de muitos outros procedimentos cirúrgicos (KRAM et al., 1990; SILVER et al., 1995).

Sendo assim, temos mais um campo para a aplicação das enzimas coagulantes thrombin-like, além daqueles já existentes como auxiliares nos diagnósticos clínicos ou agentes terapêuticos para provocar a desfibrinação no tratamento das trombozes.

Atualmente, o conhecimento da composição protéica das peçonhas de serpentes, tem assumido uma importância significativa, não apenas no aspecto terapêutico específico ligado a acidentes ofídicos, mas também por seu amplo potencial farmacológico, onde toxinas isoladas têm se revelado como valiosos instrumentos de pesquisa nas diversas áreas do conhecimento.

O conhecimento humano sobre as substâncias integrantes da peçonha de serpentes tem exercido uma importância maior que o entendimento da peçonha como um todo. Para se compreender a extrema complexidade destes venenos é importante extrairmos deles seus diversos constituintes e examinarmos suas propriedades individuais. Uma vez identificados, pode-se investir em pesquisas para combater ou explorar determinados efeitos causados por componentes específicos da peçonha.

Assim, a utilização de enzimas proteolíticas como ferramentas poderosas para a elucidação de mecanismos de ação de fenômenos biológicos é um campo aberto e inesgotável nas investigações científicas.

Em nosso laboratório de pesquisa, muitos trabalhos já foram realizados com toxinas de *Bothrops neuwiedi pauloensis*, atualmente conhecida como *Bothrops pauloensis*. Desta peçonha já foi isolada uma metaloproteinase denominada de neuwiedase (RODRIGUES et al., 2000), a qual foi caracterizada estrutural e funcionalmente. Além disto, com esta mesma protease foram realizados estudos para determinar alterações patológicas que porventura provoca nas vítimas (RODRIGUES et al., 2001) e estudos de neutralização de algumas alterações hematológicas e hemostáticas da neuwiedase por extrato aquoso de *Casearia mariquitensis* (Flacourtiaceae) (IZIDORO et al., 2003).

Dessa mesma peçonha foram isoladas duas miotoxinas Lys-49, Bnsp-6 e Bnsp-7 (RODRIGUES et al., 1998) e também duas fosfolipases A₂ Asp-49 (RODRIGUES et al., 2004).

Portanto, há interesse em conhecer melhor os componentes específicos desta peçonha, pois além desta espécie de serpente ser muito comum na nossa região, esse estudo

permite-nos compreender melhor o fenômeno biológico que estas toxinas provocam no sistema hemostático de mamíferos.

O presente trabalho teve como objetivo purificar parcialmente uma enzima coagulante da peçonha de *Bothrops pauloensis* e caracterizar suas atividades proteolíticas e biológicas.

2-) Material e Métodos

2.1-) Material:

Peçonha bruta (PB) de *Bothrops pauloensis*: foi obtida a partir de extração manual de espécimes adultos mantidos no Setor de Répteis (criadouro conservacionista) da Universidade Federal de Uberlândia e da Pentapharm do Brasil (criadouro comercial).

Plasma bovino: gentilmente doado pelo Hospital Veterinário da Universidade Federal de Uberlândia (UFU).

Resinas: CM-Sepharose e Benzamidina Sepharose (Amersham Biosciences do Brasil Ltda).

Reagentes: Acrilamida, bis-acrilamida, TEMED, SDS, EDTA, azul de bromofenol, Coomassie Brilliant Blue R-250, glicina, soroalbumina bovina, persulfato de amônio, TAME, fibrinogênio bovino, caseína bovina, inibidores enzimáticos como: aprotinina, benzamidina, 1,10-fenantrolina, leupeptina, PMSF e β -mercaptoetanol (Sigma Chem. Co.) e padrão de peso molecular (Amersham Biosciences do Brasil Ltda). Os demais reagentes eram de grau analítico.

Animais experimentais: Foram utilizados camundongos da raça Swiss machos, fornecidos pela Pentapharm do Brasil e mantidos no biotério do Laboratório de Experimental Animal (LEA) da Universidade Federal de Uberlândia.

2.2-) Métodos

2.2.1-) Cromatografia de troca iônica da peçonha de *Bothrops pauloensis* em gel de CM-Sepharose

Cerca de 200 mg da peçonha bruta de *Bothrops pauloensis* foram dissolvidos em 2 mL de tampão bicarbonato de amônio 0,05 M, pH 7,8, centrifugados a 10.000 rpm na centrífuga Sigma Chem. Co., por 10 minutos em temperatura ambiente. O sobrenadante límpido obtido foi aplicado a uma coluna de troca iônica (1,8x34cm) contendo a resina CM-Sepharose, equilibrada com o mesmo tampão.

A amostra foi eluída em temperatura ambiente com um gradiente convexo de concentração de bicarbonato de amônio (0,05 - 0,5 M), pH 7,8, utilizando uma câmara de mistura com um volume de 150mL. Frações de 3,0mL foram coletadas num fluxo de 20mL/hora por um coletor de frações REDIFRAC (Amersham Biosciences do Brasil Ltda). Cada fração coletada foi monitorada por absorbância à 280nm em um espectrofotômetro SPEKOL UV VIS (Zeiss). Em seguida o gráfico foi construído, sendo as amostras protéicas delimitadas, reunidas em “pools”, liofilizadas e armazenadas a -20° C.

2.2.2-) Cromatografia em gel de afinidade da fração CM4 em Benzamidina Sepharose

Cerca de 10mg da fração CM4 obtida da cromatografia de troca iônica em CM-Sepharose foram dissolvidos em 2mL de Tris-HCl 0,05M, pH 7,4. O material foi aplicado a uma coluna de afinidade (4,5x1,0cm) contendo a resina Benzamidina Sepharose, equilibrada com o mesmo tampão.

As amostras foram eluídas em três tampões: tampão Tris-HCl 0,05M, pH 7,4; tampão Tris-HCl 0,05M, pH 7,4 contendo NaCl 0,5M; e por fim, tampão Glicina 0,02M, pH 3,2. Frações de 3mL foram coletadas manualmente. Cada fração coletada foi monitorada por absorbância à 280nm em um espectrofotômetro Spekol UV VIS (Zeiss). Em seguida, o gráfico foi construído, sendo as amostras protéicas delimitadas, reunidas em “pools”, liofilizadas e armazenadas a -20°C.

2.2.3-) Determinação quantitativa de proteínas

Para quantificar as proteínas presentes nas amostras, soluções contendo de 0,1 a 2,0mg de proteínas foram submetidas à dosagem pelo método do Microbiureto, conforme descrito por ITZHAKI e GILL (1964). A curva padrão foi construída utilizando-se a soroalbumina bovina.

O Método do Microbiureto contém duas soluções designadas de R1 (0,21 % de $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ em NaOH a 30,4 %) e R2 (NaOH a 30,4%). Este método permite identificar compostos com mais de duas ligações peptídicas (ou grupos amida) em meio alcalino, devido à formação de prováveis complexos com os íons cúpricos, os quais absorvem luz a 310nm.

As amostras de proteínas foram completadas para o volume de 1mL com água desionizada, aos quais foram acrescidos 500 μL dos reagentes R1 ou R2, em seguida, foi realizada a leitura em espectrofotômetro SPEKOL UV VIS Zeiss a 310 nm, contra um branco sem proteína. Após a dosagem, o material restante foi separado em alíquotas de 100 e 200 μg que posteriormente foram liofilizados e armazenados a -20°C para ensaios.

2.2.4-) Eletroforese em gel de poliacrilamida com agentes desnaturantes

As eletroforeses em gel de poliacrilamida a 14% com agentes desnaturantes (SDS), foram realizadas conforme a técnica descrita por LAEMMLI (1970).

Dois espaçadores em forma de fita foram utilizados para formar entre as placas um espaço retangular de aproximadamente 0,2mm de espessura, as placas de vidro utilizadas na preparação dos géis medem aproximadamente 10cm de largura, 10,5cm de comprimento e 0,1cm de espessura. Com o auxílio de um suporte de montagem, as placas foram imobilizadas verticalmente, formando assim uma câmara que foi preenchida com a solução do gel.

Para o gel de separação foram utilizadas as seguintes soluções com suas respectivas proporções: Tris-HCl 2M pH 8,8 (1500 μL), Acrilamida:Bis 30:0,8 (3600 μL), água (2100 μL), Temed 1% (400 μL) e persulfato de amônio 1% (400 μL). Enquanto que, para o gel de empilhamento foram utilizados: Tris-HCl 2M pH 6,8 (500 μL), Acrilamida:Bis 30:08 (400 μL), água (700 μL), Temed 1% (100 μL) e persulfato de amônio 1% (100 μL).

Terminada a polimerização, a placa foi colocada em uma cuba de acrílico e conectada aos eletrodos. A solução de trizma base 0,025M, glicina 0,192 M e SDS 0,1% pH 8,3 foi utilizada como tampão para o cátodo e a mesma solução para o ânodo.

As amostras contendo 10 μ g de proteínas foram dissolvidas em 100 μ L do tampão STOP (Tris-HCl 0,06M pH 6,8, Azul de Bromofenol 0,001% e Glicerol 10%) e 10 μ L de β -mercaptoetanol. Em seguida, as amostras foram aquecidas por 3 minutos a 100°C e 15 μ L desta solução foram aplicados nos pocinhos do gel. A eletroforese foi conduzida a 20mA de corrente, por aproximadamente 80 minutos, até o indicador azul de bromofenol alcançar o final do gel.

Terminada a migração os géis foram mergulhados em uma solução fixadora: metanol 50% - ácido acético 5%, e em seguida em uma solução corante: 0,2%(m/v) de Coomassie Brilhante Blue R-250 em água e metanol 50% na proporção de 1:1(v/v). O gel foi descorado numa solução descorante formada por etanol a 30%, água e ácido acético a 10%.

2.2.5-) Eletroforese em gel de poliacrilamida sem agentes desnaturantes para proteínas básicas

Esta eletroforese foi realizada de acordo com REISFELD (1962), com modificações. Na preparação dos géis a 10% foram utilizadas as seguintes soluções: solução A (KOH 1N), sendo que 48mL desta solução teve o pH acertado para 4,5 com ácido acético glacial; em seguida, completou-se o volume da solução para 100mL com água desionizada. Solução C (preparada com 30g de Acrilamida e 0,2g de Bis-Acrilamida, dissolvidos em água desionizada para 100mL de solução).

A solução do eletrodo continha β -alanina e ácido acético 0,35M pH 4,5 (solução estoque), sendo diluída 10 vezes no momento do uso e foi realizada uma pré-corrida no gel de aproximadamente 30 minutos.

As amostras contendo cerca de 10 μ g de proteínas, foram dissolvidas em 20 μ L do tampão do eletrodo e 2 μ L de glicerol. A fucsina básica foi utilizada como marcador de migração. A eletroforese foi conduzida a 25mA de corrente, por aproximadamente 30 minutos, até o indicador fucsina básica atingir 75% do gel.

Terminada a migração o gel foi mergulhado em uma solução fixadora: metanol 50% - ácido acético 5%, e em seguida em uma solução corante: 0,2%(m/v) de Coomassie Brilhante Blue R-250 em água e metanol 50% na proporção de 1:1(v/v). O gel foi descorado com uma solução descorante formada por etanol a 30%, água e ácido acético a 10%.

2.2.6-) Ensaios enzimáticos e biológicos

2.2.6.1-) Atividade coagulante

A atividade coagulante da peçonha de *Bothrops pauloensis* e frações parcialmente purificadas foi realizada segundo ASSAKURA et al. (1992), utilizando 100 µL de plasma bovino citratado como substrato para a reação e 5µg de amostras protéicas diluídas em 20µL de salina.

Este experimento foi realizado com o aparelho coagulômetro Quick-Timer (DRAKE LTDA) que determina o tempo de coagulação de uma amostra de plasma bovino, até um tempo máximo de 120 segundos, utilizando um sistema óptico que detecta a variação brusca da densidade óptica da amostra no instante da coagulação (devido à formação do coágulo de fibrina).

Assim que a amostra era adicionada ao plasma bovino, o cronômetro do aparelho era acionado registrando o tempo (em segundos) necessário para a formação da rede de fibrina. Os tempos obtidos foram comparados ao controle positivo (peçonha bruta) para verificar se houve ou não diminuição do tempo de coagulação.

2.2.6.2-) Atividade fibrinogenolítica

A atividade proteolítica sobre o fibrinogênio foi realizada segundo o método de EDGAR & PRENTICE (1973), com modificações como descrito a seguir. Em 50µL de uma solução de fibrinogênio bovino (1,5mg/mL água) foram adicionados 5µg de proteínas e a solução incubada por 50 minutos a 37°C. Após a incubação a reação foi interrompida adicionando-se 25µL de solução STOP (Tris-HCl 0.06M pH 6.8, Azul de Bromofenol 0.001%, glicerol 10% e 10% de β-mercaptoetanol). Em seguida, as amostras foram

aquecidas a 100°C por 3 minutos e submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida a 14% com SDS (PAGE-SDS), como descrito no item 2.2.4.

O mesmo procedimento foi realizado incubando-se 5µg de proteínas incubadas com 50µL de fibrinogênio bovino em diferentes intervalos de tempos (0h, 5min., 15min., 30min., 45min., 1h e 2h) a 37°C. Esta atividade fibrinogenolítica tempo-dependente foi analisada em PAGE-SDS.

Também foi realizado um teste fibrinogenolítico dose-dependente, adicionando-se 50µL de uma solução de fibrinogênio bovino (1,5mg/mL água) a diferentes concentrações de proteínas (0,1µg; 0,5µg; 1µg; 3µg; 5µg e 10µg) e incubadas por 50 minutos a 37°C.

O efeito dos inibidores Benzamidina 10Mm, Aprotinina 10Mm, EDTA 10mM, 1,10 fenantrolina 10mM, PMSF 10Mm, leupeptina 1mM e β-mercaptoetanol 10mM sobre a atividade proteolítica também foi avaliado. Para cada ensaio, inicialmente a enzima parcialmente purificada foi pré-incubada por 1h à temperatura ambiente com o inibidor e em seguida, estas amostras foram incubadas com o fibrinogênio bovino por 50 minutos à 37°C. Por fim, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida a 14% com SDS, conforme item 2.2.4.

2.2.6.3-) Teste de degradação da caseína bovina

A atividade proteolítica sobre a caseína foi realizada preparando uma solução de caseína bovina a 1% (10mg/mL de tampão AMBIC 0,1M pH 7,8), sendo esta centrifugada por 15 minutos a 4000 rpm. O sobrenadante límpido foi separado para o preparo das amostras. Cerca de 10µg de proteínas dissolvidas em solução salina foram incubadas por 30 minutos a 37°C com 50µL de caseína. Para interromper a reação foram adicionados 50% de solução STOP e β-mercaptoetanol e em seguida, as amostras foram aquecidas por 3 minutos a 100°C.

O teste caseinolítico foi analisado em gel de poliacrilamida com agentes redutores (PAGE-SDS) utilizando 15µL de amostras preparadas em cada pocinho do gel. A eletroforese foi conduzida a 20mA, por aproximadamente 80 minutos, até o indicador azul de bromofenol alcançar o final do gel.

Terminada a migração os géis foram mergulhados em uma solução fixadora: metanol 50% - ácido acético 5%, e em seguida em uma solução corante: 0,2%(m/v) de

Coomassie Brillante Blue R-250 em água e metanol 50% na proporção de 1:1(v/v). O gel foi descorado com uma solução descorante formada por etanol a 30%, água e ácido acético a 10%.

2.2.6.4-) Atividade esterásica sobre o TAME

A atividade esterásica foi determinada sobre TAME (N-p-tolueno-sulfonil arginina metil éster) segundo Hummel (1959), com modificações: como substrato foi utilizada uma solução de TAME 1,04 μ M em Tris-HCl 0,02M, pH 8,1 em KCl 0,15M e 5 μ g de proteínas.

A quantificação da atividade foi realizada por análise espectrofotométrica a 244nm durante os 10 primeiros minutos de reação.

2.2.6.5-) Ensaios de incoagulabilidade sanguínea

O ensaio de desfibrinogenação foi realizado segundo o método descrito por GENE et al. (1989), com algumas modificações. Camundongos da raça Swiss, machos, de aproximadamente 35g foram divididos em 3 grupos (n=3) conforme descrito a seguir:

GI – animais receberam por via i.p. apenas 50 μ L de solução PBS.

GII – animais receberam por via i.p. 50 μ L de peçonha bruta na proporção de 1mg/kg do peso do animal.

GIII – animais receberam por via i.p. 50 μ L da fração B3 na proporção de 1mg/kg do peso do animal.

Após 6 horas os animais foram anestesiados com éter de petróleo, o sangue esgotado por punção cardíaca na ausência de anticoagulante, em seguida depositado imediatamente em tubo de vidro e o tempo gasto para formar um coágulo de fibrina visível foi cronometrado.

2.2.6.6-) Análise Estatística

Os resultados obtidos foram submetidos ao teste de Kruskal-Wallis (Systat for Windows) (ZAR, J. H.; 1984).

3-) Resultados

3.1-) Purificação parcial e caracterização bioquímica

3.1.1-) Cromatografia de troca iônica da peçonha bruta de *Bothrops pauloensis* em gel de CM-Sepharose

O fracionamento da peçonha de *Bothrops pauloensis* foi inicialmente realizado em resina CM-Sepharose, como descrito em métodos no item 2.2.1. Foram realizadas várias cromatografias de troca iônica para se adquirir material suficiente para a realização de testes enzimáticos e biológicos.

O perfil cromatográfico padrão obtido está mostrado na figura 01. A peçonha total foi resolvida em cinco frações denominadas CM1 a CM5. Todas as frações foram ensaiadas para verificar a presença de atividade coagulante, no entanto somente a fração CM4 apresentou tal atividade de forma significativa (resultados não apresentados).

3.1.2-) Cromatografia em gel de afinidade da fração CM4 em Benzamidina Sepharose

A fração CM4, depois de liofilizada foi submetida em resina de afinidade Benzamidina Sepharose, como descrito em métodos item 2.2.2. O perfil cromatográfico obtido está mostrado na figura 02. A fração total foi resolvida em três frações denominadas B1 a B3.

A fração B3 é o terceiro pico e mostrou excelente atividade coagulante “*in vitro*” e por isso foi escolhida para a realização de atividades biológicas e enzimáticas.

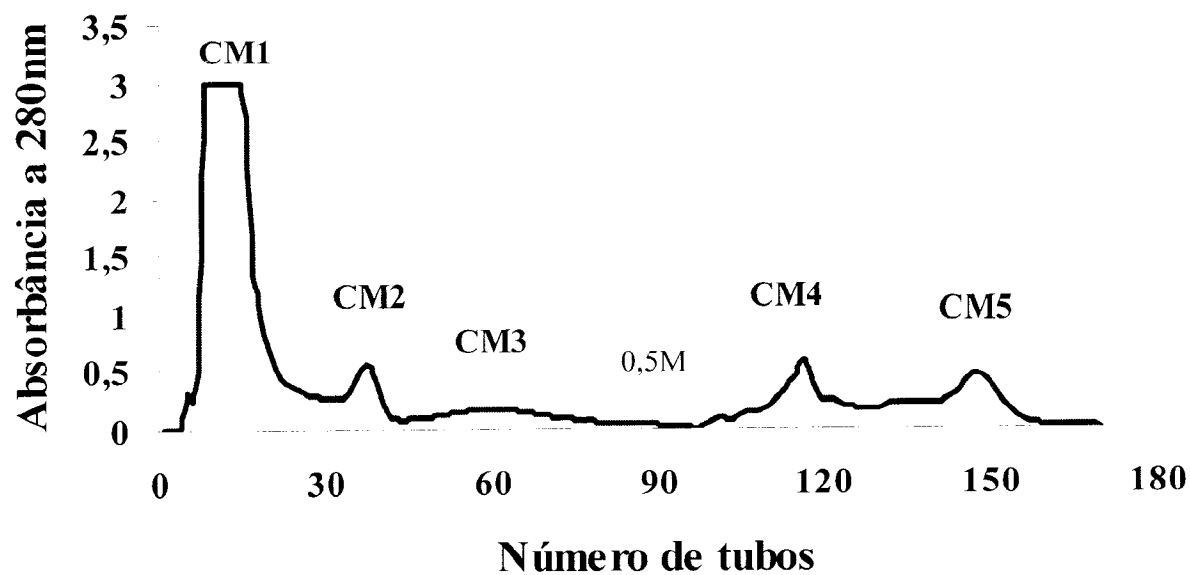


Figura 01: Fracionamento de 200mg da peçonha bruta (PB) de *Bothrops pauloensis* em coluna de CM-Sepharose (1,8 X 34 cm), equilibrada com tampão bicarbonato de amônio 0,05M, pH 7,8. As amostras foram eluídas num gradiente convexo de concentração (0,05-0,5M) do mesmo tampão, num fluxo de 20mL/h à temperatura ambiente. Frações de 3mL foram coletadas.

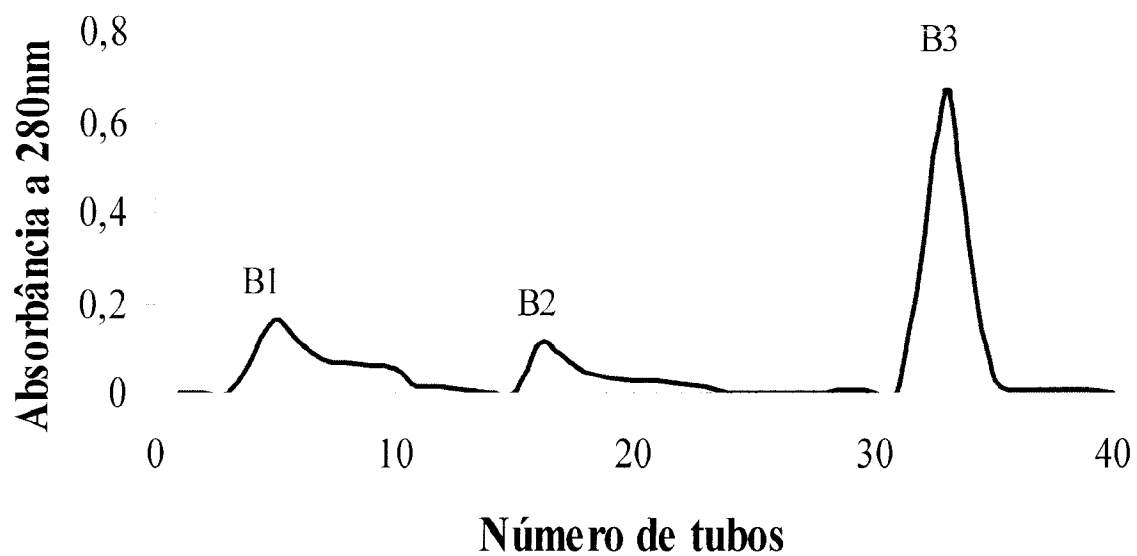


Figura 02: Fracionamento de 10mg de CM4 em coluna de Benzamidina Sepharose (4,5X1,0), equilibrada com tampão Tris-HCl 0,05M, pH 7,4. As amostras foram eluídas em tampão Tris-HCl 0,05M, pH 7,4; 0,5M NaCl e tampão Glicina 0,02M, pH 3,2; num fluxo de 3ml/tubo coletados manualmente.

3.1.3-) Recuperação protéica das frações obtidas nos fracionamentos

Na tabela 01 está representada a recuperação protéica pelo método do microbiureto, das frações obtidas a partir do fracionamento em CM-Sepharose da peçonha de *Bothrops pauloensis*. Como pode ser observado, a recuperação total de proteínas foi de aproximadamente 76% em relação a PB, sendo que a fração CM4 corresponde a 7,6% desta peçonha.

Tabela 01: Rendimento protéico das frações obtidas no fracionamento da PB de *Bothrops pauloensis* em CM-Sepharose.

Amostras	mg (totais)	Recuperação protéica (%) [*]
PB	122	100,00
CM1	63,75	52,25
CM2	7,35	6,03
CM3	8,4	6,89
CM4	9,28	7,6
CM5	3,4	2,79
Total	92,18	75,56

^{*}Recuperação protéica realizada pelo método do Microbiureto (Itzhaki e Gill, 1964).

Na tabela 02 está mostrado o rendimento protéico da fração principal obtida da recromatografia em Benzamidina Sepharose. Nota-se que a fração B3 corresponde a aproximadamente 40% da fração CM4.

Tabela 02: Rendimento protéico da fração B3 obtida no fracionamento de CM4 em Benzamidina Sepharose.

Amostras	mg (totais)	Recuperação protéica (%) [*]
CM4	9,3	100,00
B3	3,73	40,11

^{*}Recuperação protéica realizada pelo método do Microbiureto (Itzhaki e Gill, 1964).

3.1.4-) Eletroforese em gel de poliacrilamida com agentes desnaturantes

A figura 03 mostra o resultado da eletroforese em gel de poliacrilamida a 14% com agentes desnaturantes da peçonha bruta de *Bothrops pauloensis* e das frações CM4 e B3. A fração CM4 é formada por uma proteína majoritária de massa molecular aproximada de 35000, que provavelmente é a principal protease responsável pela ação coagulante “*in vitro*” presente nessa fração.

A fração B3, obtida após cromatografia da fração CM4 em Benzamidina Sepharose, apresentou um ótimo grau de pureza, com uma proteína principal com massa molecular aproximada de 35000 e um contaminante levemente corado cuja mobilidade eletroforética se assemelha a da proteína padrão anidrase carbônica (31000).

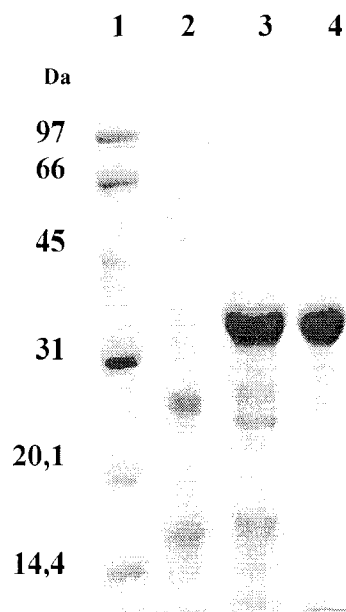


Figura 03: Eletroforese em gel de poliacrilamida a 14% com agentes desnaturantes da peçonha bruta de *Bothrops pauloensis* e frações parcialmente purificadas. 1- Padrão de massa molecular com fosforilase b (97000), albumina (66000), ovoalbumina (45000), anidrase carbônica (31000), inibidor de tripsina (20100) e lisozima (14400); 2- PB; 3- CM4; 4- B3.

3.1.5-) Eletroforese em gel de poliacrilamida sem agentes desnaturantes para proteínas básicas

A fração B3 quando submetida à eletroforese em gel de poliacrilamida para proteínas básicas (10%, pH 4,5) apresentou uma pequena migração eletroforética com uma única banda, como pode ser evidenciado na figura 04. Estes resultados indicam que a fração é formada por proteínas levemente básicas.



Figura 04: Eletroforese em gel de poliacrilamida a 10%, para proteínas básicas nas condições nativas em tampão β -alanina pH 4,5 da peçonha bruta, da fração CM4 e B3, obtidas nos fracionamentos da PB de *Bothrops pauloensis* em CM-Sepharose e Benzamidina Sepharose, respectivamente. 1: PB; 2: CM4; 3- B.3.

3.2-) Ensaios enzimáticos e biológicos

3.2.1-) Atividade coagulante

A atividade coagulante foi avaliada durante todo o processo de purificação. Os resultados apresentados na figura 05 demonstram que a fração CM4 obtida do fracionamento da peçonha bruta em gel de CM-Sepharose foi capaz de coagular o plasma bovino em aproximadamente 20 segundos, sendo que a PB coagulou o plasma em aproximadamente 55 segundos. A atividade coagulante da fração B3 foi bastante satisfatória atingindo um tempo aproximado de 6 segundos.

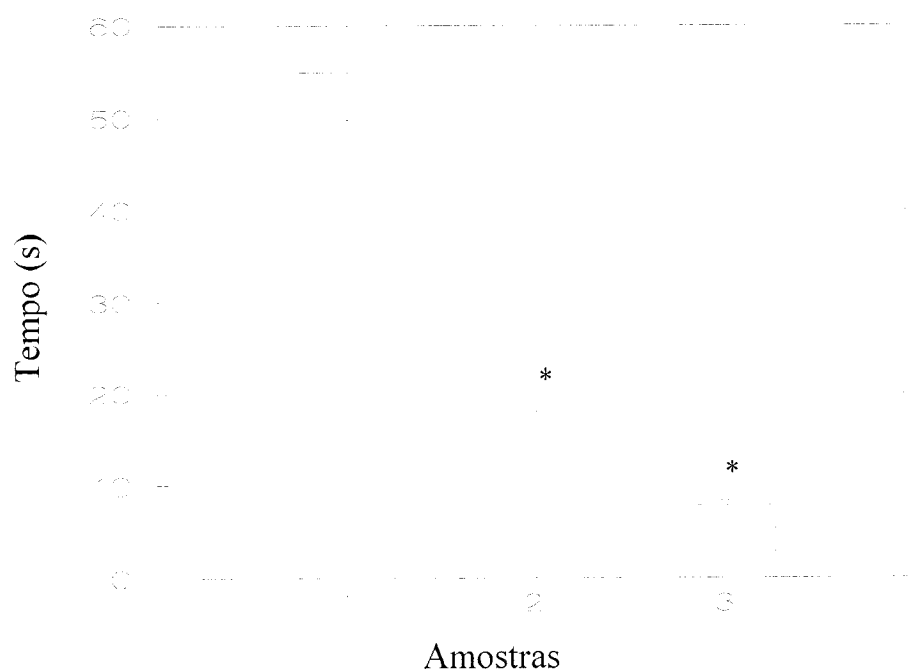


Figura 05: Atividade coagulante de 5 μ g da PB e frações parcialmente purificadas sobre 100 μ L de plasma bovino citratado. Os resultados apresentam uma média de 10 experimentos. 1: PB; 2:CM4; 3: B3.

*Significância estatística em relação ao controle positivo: (H= 25,229 e P= 0).

3.2.2-) Atividade fibrinogenolítica

Na figura 06 observa-se a hidrólise do fibrinogênio bovino pela peçonha bruta de *Bothrops pauloensis* e frações parcialmente purificadas após eletroforese em gel de poliacrilamida a 14% com agentes desnaturantes, por um tempo de 50 minutos. Pode-se observar que todas as frações foram capazes de degradar a cadeia A- α do fibrinogênio bovino, enquanto que a cadeia B- β foi apenas parcialmente degradada e nenhuma fração foi capaz de degradar a cadeia γ do fibrinogênio.

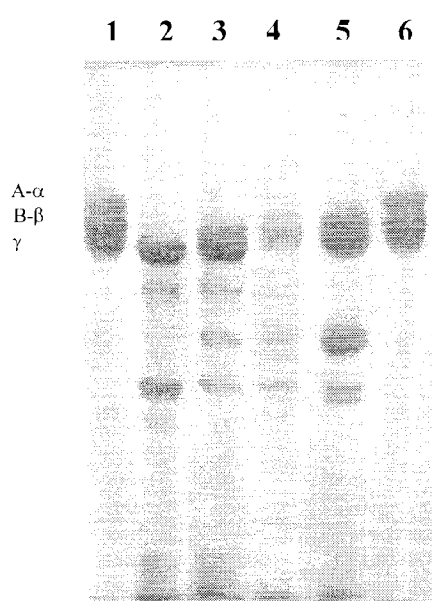


Figura 06: Eletroforese em gel de poliacrilamida a 14% com agentes desnaturantes dos produtos de hidrólise do fibrinogênio bovino, causada pela peçonha bruta (PB) e pelas frações parcialmente purificadas após 50' de incubação. 1- fibrinogênio bovino controle; 2- peçonha bruta de *Bothrops pauloensis*; 3- CM4; 4- B3 (5 μ g); 5- B3 (10 μ g); 6- fibrinogênio bovino controle.

A atividade fibrinogenolítica foi avaliada em diferentes intervalos de tempo (figura 07). A partir dos primeiros 5 minutos a cadeia A- α já estava parcialmente degradada, sendo totalmente consumida em 2h de incubação. A cadeia B- β começou a ser degradada a partir de 1h de incubação. Em nenhum momento a cadeia γ foi digerida.

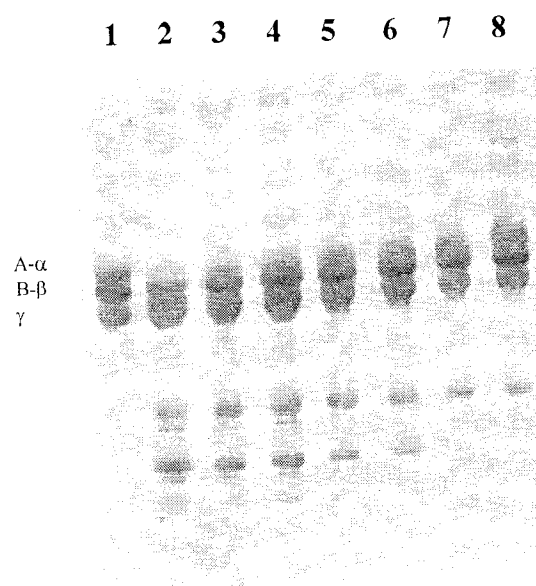


Figura 07: Eletroforese em gel de poliácridamida a 14% com agentes desnaturantes dos produtos de hidrólise do fibrinogênio bovino, causada pela fração B3, variando o tempo de incubação das amostras. 1- fibrinogênio bovino controle; 2- 2h; 3- 1h; 4- 45'; 5 - 30'; 6- 15'; 7- 5'; 8- 0h.

A figura 08 mostra que a degradação da cadeia A- α foi dose dependente. Como pode ser observado pequenas quantidades de B3 (0,1 μ g) foram capazes de degradar a cadeia A- α gerando produtos de degradação do fibrinogênio. No entanto, a cadeia B- β foi parcialmente degradada com 5 μ g de B3 e a cadeia γ não foi degradada nestas condições experimentais.

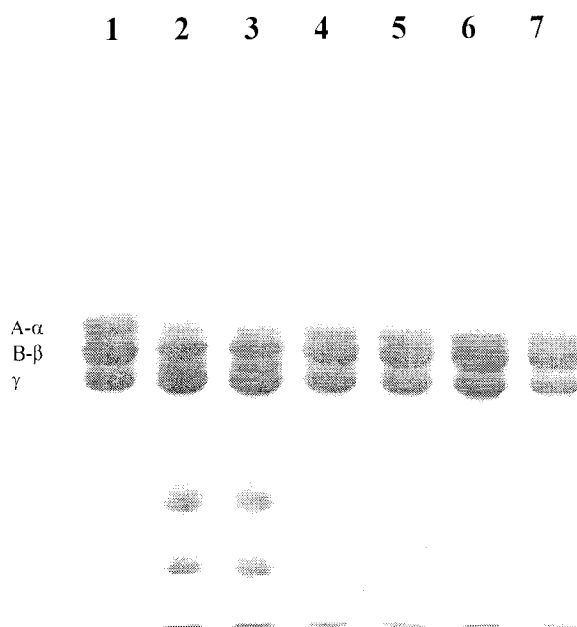


Figura 08: Eletroforese em gel de poliacrilamida a 14% com agentes desnaturantes dos produtos de hidrólise do fibrinogênio bovino, causada por diferentes concentrações da fração B3. 1- fibrinogênio bovino controle; 2- 10 μ g; 3- 5 μ g; 4- 3 μ g; 5- 1 μ g; 6- 0,5 μ g; 7- 0,1 μ g.

O efeito de agentes inibidores sobre a atividade proteolítica da fração B3 pode ser observado na figura 09. Dentre os inibidores testados, somente a Benzamidina e PMSF foram capazes de inibir a degradação da cadeia A- α do fibrinogênio.

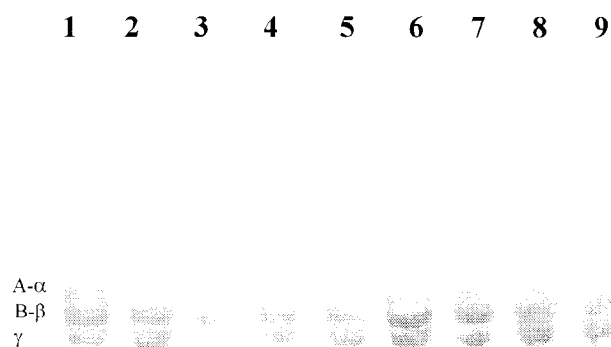


Figura 09: Inibição da atividade fibrinogenolítica da fração B3 em eletroforese em gel de poliacrilamida a 14% com agentes desnaturantes. 1- fibrinogênio bovino controle; 2- Controle positivo (fibrinogênio + fração B3); 3- Benzamidina; 4- PMSF; 5- Aprotinina; 6- EDTA; 7- Leupeptina; 8- 1,10 fenantrolina; 9- β -mercaptoetanol.

3.2.3-) Teste de degradação da caseína bovina

O resultado obtido para a atividade caseinolítica da peçonha bruta e das frações parcialmente purificadas está apresentado na figura 10.

Pode-se observar pela análise eletroforética que as cadeias da caseína foram digeridas somente pela PB e fração CM4, após 30 minutos de incubação. No entanto, a fração B3 não mostrou atividade proteolítica sobre este substrato nas condições experimentais utilizadas.



Figura 10: Eletroforese em gel de poliacrilamida a 14% com agentes desnaturantes dos produtos de hidrólise da caseína bovina, causada pela PB e pelas frações parcialmente purificadas. 1- caseína bovina controle; 2- PB de *Bothrops pauloensis*; 3- CM4; 4- B3.

3.2.4-) Atividade esterásica sobre o Tame

A atividade esterásica da peçonha bruta e frações isoladas (CM4 e B3) sobre o substrato TAME está demonstrado na figura 11. Como pode ser observada, todas as frações apresentaram atividade esterásica, no entanto a PB e CM4 apresentaram baixa atividade quando comparadas com a tripsina e trombina (controles positivos da reação). Já a fração B3 apresentou uma maior atividade esterásica do que PB e fração CM4 e demonstrou significância estatística em relação aos controles positivos.

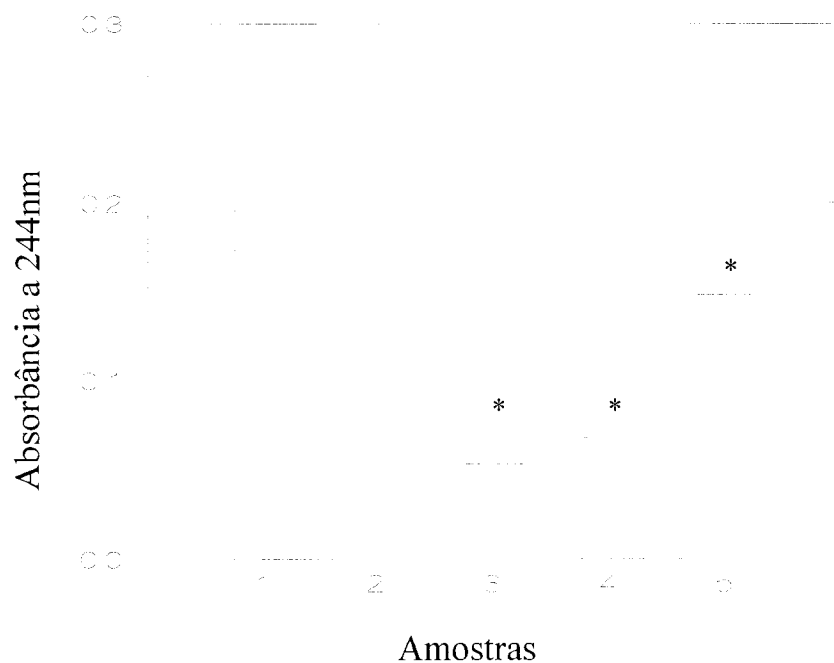


Figura 12: Atividade esterásica sobre o TAME. Os resultados apresentam uma média de 3 experimentos. 1: Tripsina; 2: Trombina; 3: PB; 4: CM4; 5: B3.

* Significância estatística em relação ao controle positivo ($H= 20,794$ e $P= 0$).

3.2.5-) Ensaios de incoagulabilidade sangüínea

A fração B3 quando injetada intraperitonealmente em camundongos, tornou o plasma incoagulável, embora a quantificação de fibrinogênio plasmático não tenha sido realizada. Estes efeitos de incoagulabilidade foram observados mesmo após 24h da realização da punção cardíaca e observou-se que o sangue diminuiu sua viscosidade ficando mais límpido.

A peçonha bruta tornou o sangue mais viscoso e muitas vezes formaram-se “grumos”, após a punção cardíaca, no entanto observou-se que o sangue não foi capaz de formar coágulo de fibrina denso.

4-) Discussão

Os distúrbios da coagulação sanguínea estão entre os efeitos mais dramáticos provocados pelo envenenamento de serpentes Viperidae e Crotalidae. Entre os componentes da peçonha, as SVSPs foram conhecidas por se envolverem diretamente nos eventos proteolíticos alterando o sistema hemostático das vítimas após a picada.

A literatura relata muitas evidências da importância dos estudos de toxinas ofídicas que contribuem para a elucidação de mecanismos biológicos e hemostáticos e além disto, componentes específicos isolados são largamente empregados em testes laboratoriais e estudos clínicos e teóricos.

Em 1950, investigações científicas evidenciaram a habilidade de enzimas peçonhentas em acelerar a coagulação do sangue e discutiam-se métodos de purificar proteases responsáveis por estes efeitos (SERRANO, 2005).

HENRIQUES et al. (1960) foram os pioneiros nos estudos de isolamento dessas proteínas, eles purificaram parcialmente um fator coagulante extraído da peçonha de *Bothrops jararaca*. Desde então, SVSPs têm sido extensamente estudadas e várias enzimas já foram isoladas e caracterizadas estrutural e funcionalmente. Atualmente, mais de 50 seqüências de aminoácidos de SVSPs são disponíveis em banco de dados (SERRANO et al.; 2005).

O presente trabalho teve como objetivo purificar parcialmente uma enzima coagulante com especificidade de hidrólise semelhante à trombina da peçonha de *Bothrops pauloensis* e caracterizar suas atividades proteolíticas e biológicas.

O primeiro passo de purificação da peçonha bruta foi realizado em CM-Sepharose, um tipo de resina que possui propriedades catiônicas. A amostra foi resolvida em cinco frações CM1 a CM5 e a atividade coagulante “*in vitro*” foi analisada em todas as frações, das quais apenas a fração 4 (CM4) apresentou ação coagulante, por isso foi selecionada para ser estudada, já que evidenciou a presença de enzimas da classe SVSPs.

A recuperação protéica estimada pelo método do microbiureto foi de aproximadamente 76%, este percentual de recuperação pode ser considerado alto quando

comparado com os valores encontrados para outras serpentes botrópicas. A fração CM4 representa aproximadamente 7,6% do total recuperado.

Seguindo com os passos de purificação a fração CM4 foi submetida em resina Benzamidina Sepharose, a qual possui propriedades de se ligar a grupamentos químicos específicos da classe de SVSPs, portanto separa biomoléculas por afinidade.

A amostra foi resolvida em três frações B1-B3 e apenas a fração 3 mostrou atividade coagulante “*in vitro*”, sendo a última a ser eluída da coluna, isto comprova que esta fração contém enzimas da classe das SVSPs pois ligaram com alta afinidade à benzamidina, a qual é um inibidor de tripsin-like.

A purificação parcial de uma enzima coagulante se mostrou bastante satisfatória pelas técnicas utilizadas no presente trabalho. A fração B3 foi obtida de uma coluna de afinidade em um pico muito simétrico e as análises eletroforéticas em condições desnaturantes (PAGE-SDS) e condições nativas (PAGE BÁSICA) revelaram a presença de uma proteína majoritária com um bom grau de pureza.

Quando analisada em SDS-PAGE, a enzima parcialmente isolada (B3) apresentou uma banda majoritária de peso molecular próximo de 35000, na presença de agente redutor (β -mercaptoetanol) e 30000 na ausência desse agente redutor (resultados não apresentados). 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 intra-cadeia, ela poderá aumentar o seu tamanho aparente e diminuir sua migração em relação à proteína sem β -mercaptoetanol.

As enzimas thrombin-like purificadas de diferentes peçonhas de serpentes são proteínas de cadeia única e com massas moleculares que podem variar de 26000 até 67000Da. As diferentes massas moleculares para essas enzimas podem ser atribuídas aos conteúdos de carboidratos que cada enzima contém. Uma exceção é a brevinase, isolada da peçonha de *Agkistrodon blomhoffi brevicaudus* (LEE et al.; 1999), que é uma enzima heterodímera formada por duas cadeias polipeptídicas unidas por pontes dissulfeto, entretanto estudo de cDNA desta protease sugere que é sintetizada como um polipeptídeo de cadeia única (LEE and PARK, 2000).

Essas proteases podem variar também em outras propriedades tais como atividade coagulante específica, especificidade na hidrólise das cadeias do fibrinogênio, fatores

ativadores da coagulação sanguínea e nos efeitos dos inibidores (SERRANO et al.; 2005).

De acordo com a atividade coagulante “*in vitro*” a fração CM4 (5µg) foi capaz de coagular o plasma bovino aproximadamente três vezes mais rápido que a peçonha bruta de *Bothrops pauloensis*, enquanto que a fração B3 coagulou o plasma bovino cerca de 6 vezes mais rápido que a peçonha bruta. Estes resultados demonstram que os métodos de purificação utilizados até o presente momento foram satisfatórios, pois a fração não perdeu suas funções proteolíticas uma vez que foi capaz de formar a rede de fibrina rapidamente, indicando a presença de enzimas thrombin-like.

Os resultados apresentados nos testes de degradação do fibrinogênio pela fração B3 demonstram que a cadeia A- α foi preferencialmente degradada, sendo a cadeia B- β hidrolisada quando o fibrinogênio foi incubado em tempos maiores. Este padrão de hidrólise é comum para a maioria das fibrinogenases isoladas de peçonhas de serpentes (OLIVEIRA et al.; 1999; XIUXIA et al.; 2001).

Alguns inibidores de proteases como o PMSF e Benzamidina foram capazes de inibir a ação proteolítica da fração B3 sobre o fibrinogênio. O PMSF é específico para serinoproteinasas, uma vez que é capaz de modificar o resíduo de serina do sítio catalítico dessas enzimas. Benzamidina inibe competitivamente as SVSPs. Este é um análogo dos aminoácidos arginina e lisina, os quais são resíduos específicos para a ação catalítica dessas enzimas. A benzamidina liga-se próximo à tríade catalítica, bloqueando a ligação do substrato e protegendo o sítio ativo da molécula da água (MARESGUIA and SHAW, 1965 apud SERRANO et al., 2005).

Os agentes quelantes EDTA e 1,10-fenantrolina não foram capazes de inibir a atividade proteolítica, provavelmente porque a enzima responsável por esta atividade (presente na fração B3) não ser dependente de íons metálicos como o cálcio e zinco. Em adição, os inibidores aprotinina, leupeptina e o agente redutor β -mercaptoetanol não foram capazes de inibir a atividade proteolítica da fração B3, embora o primeiro também seja um inibidor de SVSPs. Também a incapacidade da leupeptina e β -mercaptoetanol em inibir essa atividade sugerem que esta enzima não deve apresentar grupos SH- livres e contém um baixo conteúdo de meia cistina, embora a sequência completa de várias SVSPs revelem a presença de pelo menos doze resíduos de cisteína na estrutura primária dessas proteínas, onde dez dos quais formam pontes dissulfeto (ITOH et al.; 1988). Assim sendo, novos

experimentos devem ser realizados a fim de caracterizar melhor a ação de inibidores protéicos sobre a ação enzimática de B3.

A fração B3 não mostrou atividade proteolítica sobre a caseína, quando analisada em SDS-PAGE. Entretanto, tanto a peçonha bruta como a fração CM4 degradaram este substrato. Outros testes caseinolíticos quantitativos devem ser realizados para confirmar a ação proteolítica dessa fração sobre a caseína, apesar de não ser um substrato natural para a ação de toxinas de serpentes.

A fração B3 também mostrou uma expressiva atividade esterásica sobre o TAME, evidenciado pelo aumento da absorbância com o tempo, que indica um aumento na ação da proteína sobre o substrato. Estes estudos, apesar de serem qualitativos mostram que a fração B3 tem especificidade de hidrólise semelhante à trombina e tripsina. O TAME é um substrato bastante utilizado para o monitoramento de processos de purificação e caracterização de parâmetros enzimáticos de várias SVSPs de peçonhas ofídicas.

Com relação aos ensaios de incoagulabilidade sanguínea “*in vivo*”, nota-se que a peçonha bruta coagulou fracamente o sangue dos animais, com formação de pequenos “grumos”, isto se deve a efeitos de proteínas anticoagulantes e procoagulantes. Assim, entre as toxinas pode haver diferentes proteases que atuam em pontos distintos da cascata de coagulação sanguínea, ora promovendo a coagulação ora dissolvendo o coágulo de fibrina. A fração B3 foi capaz de tornar o plasma de camundongos incoagulável, provavelmente por depletar totalmente o estoque de fibrinogênio, quando injetada intraperitonealmente.

SVSPs geralmente não são capazes de ativar o fator XIII da cascata, portanto favorecem a fibrinólise causando incoagulabilidade “*in vivo*”. Assim, por levarem à uma rápida diminuição do fibrinogênio “*in vivo*”, causam efeitos anticoagulantes, diminuindo a viscosidade do sangue. Como resultado há uma melhora na circulação sanguínea, por isto estas enzimas têm sido muito usadas para o tratamento e prevenções de disfunções cardiovasculares e trombozes (BRAUD et al.; 2000).

Nossos estudos mostraram resultados promissores que evidenciam futuras possibilidades do uso clínico desta protease parcialmente purificada (fração B3). Essa enzima pode apresentar um efeito terapêutico semelhante a Batroxobina e Ancrod, porquanto mostra uma potente atividade desfibrinogenante em camundongos, já que possui a habilidade de tornar o plasma de camundongos incoagulável, pela depleção total do estoque de fibrinogênio, quando injetada intraperitonealmente (STOCKER et al., 1976).

Estudos “*in vitro*” da atividade fibrinolítica mostraram que a fração B3 não foi capaz de degradar o coágulo de fibrina formado em placa de petri com soluções de fibrinogênio e trombina. Por outro lado, a peçonha bruta, nas mesmas condições anteriores, conseguiu desfazer o coágulo, tornando-o líquido em poucos minutos. Isto pode ser explicado pela presença de enzimas proteolíticas com ação direta sobre a fibrina (resultados não mostrados).

Embora a fração B3 não tenha degradado a fibrina “*in vitro*”, não se pode afirmar que esta não seja fibrinolítica, pois a mesma pode degradar a fibrina indiretamente através da ativação do plasminogênio tecidual, o qual é convertido em plasmina e esta atuará proteoliticamente sobre a fibrina. Várias enzimas SVSPs ativadoras do t-PA já foram isoladas e suas estruturas determinadas (SERRANO et al., 2005). O mecanismo de ação da nova enzima coagulante (presente na fração B3) da peçonha de *Bothrops pauloensis* sobre o sistema fibrinolítico será posteriormente determinado em nosso laboratório.

Contudo, o estudo do mecanismo de ação de enzimas thrombin-like tem revelado que elas causam uma rápida e eficiente trombólise, ou seja, desfazem os coágulos de fibrina, formados quando há disfunção do sistema hemostático. Por esse motivo, essas enzimas têm despertado grande interesse para a clínica médica, principalmente aquelas com alto grau de pureza e que não apresentam efeitos colaterais.

5-) Conclusões

Este trabalho apresentou a purificação parcial de uma enzima coagulante a qual foi obtida após dois passos de purificação. Esta se mostrou majoritária quando analisada em eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de agentes desnaturantes revelando uma banda de massa molecular de aproximadamente 35000 Da.

Esta enzima parcialmente purificada também foi capaz de degradar preferencialmente a cadeia A- α do fibrinogênio, sendo esta atividade inibida por inibidores específicos para serinoproteinases. Além destas atividades, esta enzima apresentou atividade esterásica sobre o TAME e foi capaz de tornar o sangue dos animais incoagulável quando injetada por via intraperitoneal.

Atualmente estão em andamento experimentos adicionais como a purificação completa da enzima em sistema de HPLC-RP, sequenciamento da região N-terminal, focalização isoeletrica, bem como outras atividades enzimáticas que dão suporte à classificação dessa nova enzima de *Bothrops pauloensis* como uma nova thrombin-like da classe das SVSPs.

6-) Referências Bibliográficas

AMARAL, C. F. S.; DOURADO, H. V.; KOUYOUMDJIAN, J. A.; CARDOSO, J. L. C.; CAMPOS, J. A.; MARQUES, M. M. A.; LOPES, P. F. A. Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes ofídicos. **Ministério da Saúde, Fundação Nacional de Saúde, Centro Nacional de Epidemiologia**, p.15-18, 1991.

AMICONI, G.; AMORESANO, A.; BOUMIS, G.; BRANCACCIO, A.; DE CRISTOFARO, R.; DE PASCALIS, A.; DI GIROLAMO, S.; MARAS, B.; SCALONI, A. A novel venombin B from *Agkistrodon contortrix contortrix*: evidence for recognition properties in the surface around the primary specificity pocket different from thrombin. **Biochemistry**, v.39, p.10294-10308, 2000.

ANDRIÃO-ESCARSO, S. H.; SAMPAIO, S. V.; CUNHA, O. A. B.; MARANGONI, S.; OLIVEIRA, B.; GIGLIO, J. R. Isolation and characterization of a new clotting factor from *Bothrops jararacussu* (jararacuçu) venom. **Toxicon**: Elmsford, v.35, n.7, p.1043-1052, 1996.

ASSAKURA, M. T.; FURTADO, M. F.; MANDELBAU, F. R. Biochemical and biological differentiation of the venoms of the lancehead vipers (*Bothrops marajoensis* and *Bothrops moojeni*). **Compendium Biochemistry and Physiology**, n.102, p.727-732, 1992.

BAUAB, F. A. ; IWASHIMA, Y.; BRITES, V. L. C.; CURY, J. C. ; VICYORINO, W. T. Estudo comparativo da produção máxima de peçonha e inquérito bacteriológico bucal em serpentes Viperidae. Anais do I Congresso Científico da Universidade Federal de Uberlândia. 20-27 de janeiro de 1992. p. 110.

BORTOLETO, R. K.; MURAKAMI, M. T.; WATANABE, L.; SOARES, A. M.; ARNI, R. K. Purification, characterization and crystallization of jararacussin -I, a fibrinogen -clotting

enzyme isolated from the venom of *Bothrops jararacussu*. **Toxicon**: Elmsford, v.40, p.1307-1312, 2002.

BRAUD, S.; BON, C.; WISNER, A. Snake venom proteins acting on hemostasis. **Biochimie**: Elsevier, v.82, p.851-859, 2000.

BRITES, V. L. C.; BAUAB, F. A Fauna ofidiana do município de Uberlândia, Minas Gerais – Brasil : I. Ocorrência na área urbana. **R. Cent. Ci. Bioméd. Univ. Fed. Uberlândia**, v.4 (1), p.3-8, dez. 1988.

BURKHART, W.; SMITH, G. F. H.; SU, J. L.; PARIKH, I.; LEVINE, H. Amino acid sequence determination of Ancrod. The thrombin-like α -fibrinogenase from the venom of *Akistrodon rhodosoma*. **Febs Letters**, v.297, p.297, 1992.

CARDOSO, J. L.C. **Animais peçonhentos no Brasil: biologia clínica e terapêutica dos acidentes**. São Paulo: Sarvier, 2003.

CASTRO, H. C.; SILVA, D. M.; CRAIK, C.; ZINGALI, R. B. Structural features of a snake venom thrombin-like enzyme: thrombin and trypsin on a single catalytic platform? **Biochimica et Biophysica Acta**: Elsevier, v.1547, p.183-195, 2001.

CHO, S. Y.; HAHN, B-S.; YANG, K. Y.; KIM, Y. S. Purification and characterization of calobin II, a second type of thrombin-like enzyme from *Agkistrodon caliginosus* (Korean viper). **Toxicon**: Elmsford, v.39, p.499-506, 2000.

DALTRY, J. C.; WÜSTER, W.; THORPE, R. S. Diet and snake venom evolution. **Nature**: London, v.379, p.537-540, 1996.

EDGAR, W.; PRENTICE, C.R.M. The proteolytic action of ancrod on human fibrinogen and its polypeptide chains, **Thromb. Res.**, v. 2, p.85-95, 1973.

GENE, J. A.; ROY, A.; ROJAS, G.; GUTIÉRREZ, J. M.; CERDAS, L. Comparative study on coagulant, defibrinating, fibrinolytic and fibrinogenolytic activities of Costa Rican crotaline snake venoms and their neutralization by a polyvalent antivenom. **Toxicon**: Elmsford, v.27, p.841-846, 1989.

HAHN, B. S.; YANG, K. Y.; PARK, E. M.; CHANG, I. M.; KIM, Y. S. Purification and molecular cloning of calobin, a thrombin-like enzyme from *Agkistrodon caliginosus* (Korean viper). **Journal Biochemistry**, v.119, p.835-843, 1996.

HENRIQUES, O. B.; FICHMAN, M.; HENRIQUES, S. B. Partial purification of the blood-clotting factor from the venom of *Bothrops jararaca*. **Journal Biochemistry**, v.75, p. 551-556, 1960.

ITOH, N.; TANAKA, N.; FUNAKOSHI, I.; KAWASAKI, I.; MIHASHI, S.; YAMASHINA, I. Organization of the gene for batroxobin a thrombin-like snake venom enzyme. *J. Biol. Chem.*, v.263, p.7628-7633, 1988.

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

IZIDORO, L. F. M.; RODRIGUES, V. M.; RODRIGUES, R. S.; FERRO, E. V.; HAMAGUCHI, A.; GIGLIO, J. R.; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I. Neutralization of some hematological and hemostatic alterations induced by neuwiedase, a metalloproteinase isolated from *Bothrops neuwiedi pauloensis* snake venom, by the aqueous extract from *Casearia mariquitensis* (Flacourtiaceae). **Biochimie**: Elsevier, v.85, p.669-675, 2003.

JIN, Y.; LU, Q-M.; CHEN, R-Q.; WU, J-B.; XIONG, Y-L. Molecular characterization of a weak fibrinogen-clotting enzyme from *Trimeresurus jerdonii* venom. **Toxicon**: Elmsford, v.45, p.353-360, 2005.

JOSEPH, J. S.; CHUNG, M. C. M.; MIRTSCHEIN, P. I.; KINI, R. M. Effect of snake venom procoagulants on snake plasma: implications for the coagulation cascade of snakes. **Toxicon**: Elmsford, v.40, p.175-183, 2002.

KAMIGUTI, A. S.; HAY, C. R. M.; THEAKSTON, R. D. Insights into the mechanism of hemorrhage caused by snake venom metalloproteinase. **Toxicon**: Elmsford, v.34, p.627, 1996.

KOH, Y-S.; CHUNG, K-H; KIM, D-S. Biochemical characterization of a thrombin-like enzyme and fibrinolytic serine protease from snake (*Agkistrodon saxatilis*) venom. **Toxicon**: Elmsford, v.39, p.555-560, 2000.

KRAM, H. B.; DEL JUNCO, T.; CLARK, S. R.; OCAMPO, H. P.; SHOEMAKER, W. C. Techniques of splenic preservation using fibrin glue. **Journal Trauma**, v.30, p. 97, 1990.

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

LEE, J. W.; SEA, J. H.; RHEE, L. K.; JIN, L.; KAWAMURA, Y.; PARK, W. Purification and characterization of brevinase, a heterogeneous two-chain fibrinolytic enzyme from the venom of Korean snake, *Agkistrodon blomhoffi brevicaudus*. **Biochemical Biophysical Res. Common.**, v.260, p.665-670, 1999.

LEE, J. W.; PARK, W. cDNA cloning of brevinase, a heterogeneous two-chain fibrinolytic enzyme from *Agkistrodon blomhoffi brevicaudus* snake venom, by serial hybridization-polymerase chain reaction. **Arch. Biochemie Biophysiol**, v.377, p.234-240, 2000.

MAGALHÃES, A.; FERREIRA, R. N.; RICHARDSON, M.; GONTIJO, S.; YARLEQUE, A.; MAGALHÃES, H. P. B.; BLOCH, C.; SANCHEZ, E. F. Coagulant thrombin-like enzymes from the venoms of Brazilian and Peruvian bushmaster (*Lachesis muta muta*) snakes. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part B**, v. 136, p.255-266, 2003.

MARKLAND, F. S. Snake venoms and the hemostatic system, **Toxicon**, v.36, p.1749-1800. 1998.

MATSUI, T.; FUJIMURA, Y.; TITANI, K. Snake venom proteases affecting hemostasis and thrombosis. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdã, v.1477, p.146-156, 2000.

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, p.1069-1074, 1999.

OYAMA, E.; TAKAHASHI, H. Purification and characterization of a thrombin-like enzyme, elegaxobin, from the venom of *Trimeresurus elegans* (Sakishima-habu). **Toxicon**: Elmsford, v.38, p.1087-1100, 1999.

OYAMA, E.; TAKAHASHI, H. Purification and characterization of a thrombin-like enzyme, elegaxobin II, with lys-bradykinin releasing activity from the venom of *Trimeresurus elegans* (Sakishima-Habu). **Toxicon**: Elmsford, v.41, p.559-568, 2002.

REISFELD, R. A.; LEWIS, V. L. & WILLIAMS, D. E. Disk eletrophoresis of basic proteins and peptides on polyacrylamide gels. **Nature**, v.195, p.281-3, 1962.

RODRIGUES, V. M.; SOARES, A. M.; GUERRA-SÁ, R.; RODRIGUES, V.; FONTES, M. R. M.; GIGLIO, J. R. Structural and functional characterization of neuwiedase, a non hemorrhagic fibrin(ogen)olytic metalloprotease from *Bothrops neuwiedi* Snake venom, **Arch. Biochem. Biophy**, v.5381, p.213-224. 2000.

RODRIGUES, V. M.; SOARES, A. M.; ANDRIÃO-ESCARSO, S. H.; FRANCESCHI, A. M.; RUCAVADO, A.; GUTIÉRREZ, J. M.; GIGLIO, J. R. Pathological alteration induced by neuwiedase snake venom. **Biochimie**, v.83, Issue 6, p.471-479. 2001.

RODWELL, V.W. Proteins: structure & function. In: MURRAY, R.K.; GRANNER, D.K.; MAYES, P.A.; RODWELL, V.W. **Harper's Biochemistry**. 24 ed. USA: Lange Medical Publications. 1990. p.41-52.

- ROSENFELD, G. Symptomatology, pathology and treatment of snake bites in South America. In: **Venomous and their venoms 2**, p.345 (BUCHERL, W and BUCKLEY, E. E., eds). New york: Academic Press, 1971.
- SBH. 2005. Lista de espécies de répteis do Brasil. Sociedade Brasileira de Herpetologia (SBH). Disponível em: www.sbherpetologia.org.br/checklist/répteis.htm.
- SERRANO, S. M. T.; MAROUN, R. C. Snake venom serine proteinases: sequence homology vs. Substrate specificity, a paradox to be solved. **Toxicon**: Elmsford, v.45, p.1115-1132, 2005.
- SILVA, V. X. 2000. Revisão sistemática do complexo (Serpentes, Viperidae, Crotalinae). Tese de Doutorado. Universidade Federal de São Paulo. 134 p.
- SILVER, F. H.; WANG, M-C; PINS, G. D. Preparation and use of fibrin glue in sugery. **Biomaterials**, v.16, p.891, 1995.
- SMOLKA, M. B.; MARANGONI, S.; OLIVEIRA, B.; NOVELLO, J. C. Purification and partial characterization of a thrombin -like enzyme, balterobin, from the venom of *Bothrops alternatus*. **Toxicon**: Elmsford, v.36, p.1059-1063, 1997.
- SOSZKA, T.; KIRSCHBAU, N. E.; STEWART, G. I.; BUDZVNSKI, A. Z. Direct effect of fibrinogen-clotting enzymes on plasminogen activator secretion from human endothelial cells. **Thrombosis and Haemostasis**, v.54, p.164-169, 1985.
- SOUSA, J. R. F.; MONTEIRO, H. C.; CASTRO, H. C.; ZINGALI, R. B. Proteolytic action of *Bothrops jararaca* venom upon its own constituents. **Toxicon**: Elmsford, v.39, p.787-792, 2000.
- STOCKER, K.; BARLOW, G. H. The coagulant enzyme from *Bothrops atrox* venom (bathroxobin). In: **Methods of Enzymology**, v.45B, p.214 (LORAND, L., Ed.) New york: Academic Press. 1976.

STRYER, L. **Bioquímica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 4 ed. 1996. 1000 p.

TANAKA-AZEVEDO, A. M.; TORQUATO, R. J. S.; TANAKA, A. S.; SANO-MARTINS, I. S. Characterization of *Bothrops jararaca* coagulation inhibitor (BjI) and presence of similar protein in plasma of other animals. **Toxicon**: Elmsford, v.44, p.289-294, 2004.

WANG, M-C; PINS, G. D.; SILVER, F. H. Preparation of fibrin glue: the effects of calcium chloride and sodium chloride. **Materials Science and Engineering C**, v.3, p.131-135, 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**, Elmsford, v.39, n.8, p.1133-1139, 2001.

YOU, W-K.; CHOI, W-S.; KOH, Y-S.; SHIN, H-C.; JANG, Y.; CHUNG, K-H. Functional characterization of recombinant batroxobin, a snake venom thrombin-like enzyme, expressed from *Pichia pastoris*. **Febs Letters**, v.571, p.67-73, 2004.

ZAR, J. H. **Biostatistical Analysis**. 2ed. Ed. Prentice Hall. E.U.A: New Jersey, 1984. 718p. Systat for windows, v.9.0.

