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

CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL E ESTRUTURAL DE NOVAS PROTEASES ISOLADAS DA PEÇONHA DE *Bothrops alternatus* E DO LÁTEX DE *Euphorbia milii* var. *hislopii*

Aluna: Júnia de Oliveira Costa

Orientador: Dr. Nilson Penha Silva

Co-orientador: Dr. Fábio de Oliveira

UBERLÂNDIA, MG

2010

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

CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL E ESTRUTURAL DE NOVAS PROTEASES ISOLADAS DA PEÇONHA DE *Bothrops alternatus* E DO LÁTEX DE *Euphorbia milii* var. *hislopii*

Aluna: Júnia de Oliveira Costa

Orientador: Dr. Nilson Penha Silva

Co-orientador: Dr. Fábio de Oliveira

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

UBERLÂNDIA, MG
2010

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

C837c Costa, Júnia de Oliveira, 1980-
Caracterização funcional e estrutural de novas proteases isoladas da peçonha de ***Bothrops alternatus*** e do látex de *Euphorbia milii* var. hislopii [manuscrito] / Júnia de Oliveira Costa. - 2010.
126 f. : il.
Orientador: Nilson Penha-Silva.
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica.
Inclui bibliografia.
1. Cobra venenosa - Veneno - Teses. 2. Bothrops - Teses. I. Penha-Silva, Nilson. II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica. III. Título.
CDU: 615.99:598.126

Elaborado pelo Sistema de Bibliotecas da UFU / Setor de Catalogação e Classificação

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

CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL E ESTRUTURAL DE NOVAS PROTEASES ISOLADAS DA PEÇONHA DE *Bothrops alternatus* E DO LÁTEX DE *Euphorbia milii* var. *hislopii*

ALUNA: JÚNIA DE OLIVEIRA COSTA

COMISSÃO EXAMINADORA

Presidente: Dr. **Nilson Penha Silva** (Orientador)
Examinadores:
Dr. **Fábio de Oliveira** (Titular)
Dr. **Andreimar Martins Soares** (Titular)
Dr. **Luiz Fernando Moreira Izidoro** (Titular)
Dra **Márcia Helena Borges** (Titular)
Dra **Silvana Marcussi** (Suplente)
Dr. **Guilherme Rocha Lino de Souza** (Suplente)

Data da Defesa: 17/06/2010

As normas do PPGGB para o formato da tese foram contempladas.

Nilson Penha Silva
(Orientador)

DEDICATÓRIA

A todas as pessoas que de alguma forma contribuíram para o meu crescimento pessoal e profissional!

AGRADECIMENTOS

Agradeço a **Deus** pelo milagre da vida e ao meu **anjo da guarda** por me conduzir aos acertos e por me conceder sabedoria nos momentos de lidar com os erros e aprender com os mesmos.

Agradeço à minha família, em especial à minha **mãe**, pela confiança e apoio durante todos estes anos.

Ao **Professor Doutor Nilson Penha Silva** pela oportunidade em aprender com os seus ensinamentos. Uma pessoa correta, sempre disposto a auxiliar àqueles que necessitam. O admiro pela sua conduta ética e inteligente em suas orientações. Sua integridade e boa vontade com as quais se relaciona com as pessoas são exemplares. **Muito obrigada** pela confiança e pelos conhecimentos transmitidos, os quais foram fundamentais para o meu crescimento científico e profissional. O meu amor pela Bioquímica cresceu substancialmente a partir do momento que tive a honra de assistir às suas aulas, muito bem ministradas e didaticamente incomparáveis. **Enfatizo a minha eterna gratidão!**

Ao **Professor Doutor Fábio de Oliveira** pela longa convivência! Nos conhecemos em 1999 e, a partir daí, a minha admiração por você cresce exponencialmente. Tudo que sei em relação à purificação e caracterização de toxinas ofídicas aprendi principalmente com você, uma pessoa sábia, competente e, sobretudo, humana, que faz com que sua simplicidade seja admirada por todos. Você, amigo, me ensinou que os obstáculos existem para ser superados, me aconselhou não só no meio científico, como também na vida, me mostrou sempre o caminho certo e, é por isso e pela sua infinita capacidade moral e intelectual que repito incansavelmente que você é o exemplo que sempre buscarei seguir!!!! Sou uma pessoa de muita sorte por ter tido o privilégio de conhecê-lo. **Obrigada por tudo!!!**

Aos **Professores Dr. Andreimar Martins Soares** e **Dra Heloísa Selistre de Araújo** pela inestimável contribuição para a realização deste trabalho.

Às minhas grandes amigas **Kelly Cortes Fonseca e Carla Cristine Neves Mamede** pela ajuda inestimável neste trabalho. Vocês duas são admiráveis pelo talento e capacidade com que executam suas ações não só no laboratório, como também em suas expressões de amizade. **Adoro vocês!!!**

Ao meu eterno amigo **Norival Alves Santos-Filho** não só pelo auxílio no desenvolvimento do trabalho, mas também pela paciência em me escutar nos momentos complicados que um pós-graduando vivencia. **Conte sempre comigo!**

Ao **Mário da Silva Garrote Filho,** por dispor de seu tempo, colaborando e sanando minhas dúvidas em relação à titulação enzimática. **Obrigada, amigo!**

Às colegas do Laboratório de Biofísica: **Maraísa, Mayara, Nádia, Thaísa** e aos demais pelo auxílio e companheirismo.

Aos colegas do Laboratório de Enzimologia: **Rita, Mariana, Lúbia, Cleine, Letícia, Romeu, Guilherme** e aos demais pelas trocas de experiência e agradável convivência.

Aos Professores e Funcionários do Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica, em especial ao **Gerson,** sempre disposto a prestar as informações e, sobretudo, pela amizade que construímos durante estes anos. **Obrigada!**

Ao **Rubens Antônio Freitas,** Chefe de Setor de Registro Escolar da UFU, pela atenção e presteza com as quais me atendeu sempre que necessário.

À **Bete,** ao **Helinho** e à **Meire** do Instituto de Ciências Biomédicas da UFU pelos bons momentos que passamos e por me atenderem tão bem quando precisei.

À minha amiga de muitos anos **Danila** e à sua avó **Dona Lourdes** pelo acolhimento e pelos momentos de descontração.

Ao Michel que foi muito importante durante os nossos anos de convivência.

Aos meus colegas de trabalho do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Triângulo Mineiro, em especial, aos meus grandes amigos **Flávia Leva, Lindolfo Marra, Sírley Cristina, Gustavo Prado, Sérgio Sanches e Leandro Rafael.**

Ao diretor geral, **Professor Humberto Minéu**; ao Diretor de Ensino, **Professor Rodrigo Afonso** e ao Diretor Administrativo **Anivaldo Franco**, todos do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Triângulo Mineiro, Campus Ituiutaba. Agradeço também ao **Professor Marco Maciel**, atualmente, servidor do Instituto Federal de Brasília. Obrigada a todos vocês pela força e pela compreensão!

A todos que de alguma forma contribuíram para que este trabalho fosse concretizado.

“...Viver!

E não ter a vergonha

De ser feliz

Cantar e cantar e cantar

A beleza de ser

Um eterno aprendiz...

... Ah meu Deus!

Eu sei, eu sei

Que a vida devia ser

Bem melhor e será

Mas isso não impede

Que eu repita

É bonita, é bonita

E é bonita...”

Gonzaguinha

Este trabalho foi desenvolvido nos Laboratórios de Bioquímica (Enzimologia) e Biofísica Molecular da Universidade Federal de Uberlândia

SUMÁRIO

Apresentação 1

Capítulo I: Fundamentação Teórica: Proteases ofídicas e vegetais e seus mecanismos de estabilização 7

1. Proteases de peçonhas de serpentes 8
2. Hemostasia, coagulação sanguínea e fibrinólise 12
3. Alterações teciduais causadas por proteases botrópicas 18
4. Serinoproteases ofídicas e a clínica médica 20
5. Aspectos estruturais e funcionais de SVSPs 22
6. Proteases de plantas 24
7. Estabilidade de enzimas 27
8. Agentes caotrópicos 29
9. Osmólitos 30
10. Referências 33

Capítulo II: Bhalternin: functional and structural characterization of a new thrombin-like enzyme from *Bothrops alternatus* snake venom 47

Abstract 49
Resumo 50
1. Introduction 51
2. Material and methods 52
2.1 Material 52
2.2 Isolation of Bhalternin 52
2.3 Electrophoretic analysis: molecular weight determination 53
2.4 Electrophoresis in acid conditions 53
2.5 Estimation of protein concentration 53
2.6 N-terminal sequencing 53
2.7 Screening and isolation of SP from a venom gland cDNA library 54
2.8 Fibrinogenolytic and albuminolytic activities 54
2.9 Azocaseinolytic activity 55
2.10 Defibrinating Activity 55
2.11 Blood-clotting activity 55

2.12 Enzyme inhibitors 55
2.13 Animals..... 55
2.14 Morphological alterations induced by Bhalternin 56
2.15 Histological examination of myonecrosis..... 56
3. Results and discussion..... 56
Acknowledgements 60
References 60

Capítulo III: Purification and biochemical characterization of Eumiliin from *Euphorbia milii* var. *hislopii* latex 80
Abstract 82
Resumo 83
1. Introduction..... 84
2. Results and discussion..... 85
2.1 Purification and biochemical characterization of Eumiliin 85
2.2 Characterization of effects *in vivo* induced by Eumiliin..... 88
3. Conclusions..... 89
4. Experimental 89
4.1 Materials..... 89
4.2 Latex preparation 90
4.3 Estimation of protein concentration 90
4.4 Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoreses (SDS-PAGE).90
4.5 Mass spectrometry analysis of Eumiliin..... 90
4.6 Isolation of Eumiliin 91
4.7 N-terminal sequencing..... 91
4.8 Proteolytic activity..... 91
4.8.1 Fibrinogenolytic activity 91
4.8.1.1 Heat and Inhibitor effects on fibrinogenolytic activity..... 92
4.8.2 Caseinolytic activity 92
4.8.2.1 pH optimum 92
4.9 Hemorrhagic activity..... 92
4.10 Defibrinating activity 93
4.11 Histological examination of myonecrosis..... 93

4.12 Evaluation of oedema formation 93
4.13 Evaluation of hyperalgesia 94
References 94

Capítulo IV: Análise comparativa das estabilidades da balternina e da eumilina 107
Resumo 108
Abstract 109
1. Introdução 110
2. Material e métodos 113
3. Resultados e discussão 113
4. Considerações finais 117
5. Referências 117

LISTA DE FIGURAS

Apresentação

Figura 1. Aparato de peçonha de serpente 5
Figura 2. Distribuição geográfica da espécie *Bothrops alternatus*..... 6

Capítulo I

Figura 3. Mecanismo de ação da trombina e de enzimas 'thrombin-like' 11
Figura 4. Inter-relações entre as vias intrínseca e extrínseca da cascata da coagulação sanguínea e o sistema fibrinolítico 16
Figura 5. Complexos procoagulantes (tenase e protrombinase) representados esquematicamente 17
Figura 6. Envenenamento característico de serpentes botrópicas..... 20
Figura 7. Espécie *Euphorbia milii* var. *hislopii* (coroa-de-cristo) 25

Capítulo II

Figure 1. Purification of Bhalternin from *Bothrops alternatus* snake venom 71
Figure 2. Chromatographic profile by HPLC. SDS-PAGE in 14% (w/v) gel: reduced and non-reduced Bhalternin and Native PAGE (10% gel) for acidic proteins..... 72
Figure 3. Sequence of cDNA and of deduced amino acid residues from Bhalternin 73
Figure 4. Comparison of the amino acid sequence of *B. alternatus* serine protease (Bhalternin) with other serine proteases from different snake venoms..... 74
Figure 5. Proteolysis of bovine fibrinogen by Bhalternin..... 75
Figure 6. Light micrographs of section of mouse heart tissue 24 hours after i.p. injection of crude venom and Bhalternin 76
Figure 7. Light micrographs of section of mouse pulmonary tissue 24 hours after i.p. injection of crude venom and Bhalternin..... 77
Figure 8. Light micrographs of section of mouse hepatic tissue 24 hours after i.p. injection of crude venom and Bhalternin 78
Figure 9. Histopathological analysis of myotoxicity induced by Bhalternin 79

Capítulo III

Figure 1. Purification of Eumiliin from *Euphorbia milii* latex..... 100

Figure 2. Molecular mass estimation using electrophoresis and mass spectrometry 101
Figure 3. Proteolysis of bovine fibrinogen by Eumiliin 102
Figure 4. pH-dependence of proteolytic activity of Eumiliin 103
Figure 5. Hyperalgesia induced by Eumiliin in rat hind paws and Oedema-forming activity of Eumiliin in mice..... 104
Figure 6. Histopathological analysis induced by Eumiliin 105

Capítulo IV

Figura 1. Representação bidimensional de moléculas de água ao redor de uma esfera hidrofóbica..... 122
Figura 2. Curva sigmoidal típica resultante da titulação enzimática com agentes caotrópicos..... 123
Figura 3. Representação esquemática para a interação preferencial da água com o co-soluto..... 124
Figura 4. Mecanismo de desenovelamento das enzimas balternina e eumilina em concentrações crescentes de uréia. Curva obtida a partir dos dados originais.. 125
Figura 5. Mecanismo de desenovelamento das enzimas balternina e eumilina em concentrações crescentes de uréia. Os parâmetros das sigmóides foram usados para o cálculo dos valores de absorvância por meio de interpolação. 126

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Capítulo I

Quadro 1. Sequência N-terminal de serinoproteases isoladas de peçonhas ofídicas.....24

Quadro 2. Proteases isoladas de plantas e suas sequências amino-terminais.....26

Capítulo III

Table I. Amino terminal sequence of Eumiliin as compared to other proteases from plants…….....106

LISTA DE ABREVIATURAS

ADP – Adenosina difosfato

AMBIC – Bicarbonato de amônio

Bis-acrilamida – N, N' - metilenobisacrilamida

BLAST – 'Basic Local Alignment Search Tool'

CAPM - Cininogênio de alto peso molecular

DFP - Diisopropilfluorofosfato

EDTA – Ácido etilenodiaminotetracético

FPA – Fibrinopeptídeo A

FPB – Fibrinopeptídeo B

GdnHCl - Hidrocloreto de guanidina

HMWK – 'High molecular weight kininogen'

HPLC – 'High Performance Liquide Chromatography'

MEC - Matriz extracelular

PAGE – Eletroforese em gel de poliacrilamida

PB – Peçonha bruta

PDF - Produtos de degradação de fibrina

pI - Ponto isoelétrico

PK - Pré-calicreína

PLA_2 – Fosfolipase A_2

PMSF – Fenilmetilsulfonilfluoreto

SDS – Dodecil sulfato de sódio

SDS-PAGE - Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS

Serpinas - Inibidores naturais de serinoproteases

SVMPs – Snake venom metalloproteinases

SVSPs – Snake venom serineproteinases

TCA – Ácido tricloroacético

TE – Transição estrutural

TEMED - N,N,N',N'- tetrametiletilenodiamino

TLEs – Enzimas "thrombin-like" de peçonhas de serpentes

t-PA - Ativador do plasminogênio do tipo tecidual

TR – Trombina

Tris - Tris(hidroximetil)aminometano

u-PA - Ativador do plasminogênio do tipo uroquinase

UV/VIS - Ultra-Violeta/Visível

λ - Comprimento de onda

ΔG - Variação de energia livre de Gibbs

Apresentação

A presente tese de doutorado foi preparada de acordo com as Normas do Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica da Universidade Federal de Uberlândia, tendo sido subdividida em quatro capítulos.

O **capítulo I** faz uma revisão bibliográfica sobre as composições proteolíticas de peçonhas de serpentes e vegetais, estabelecendo as relações possíveis entre a estrutura e função, com uma preocupação especial sobre os mecanismos envolvidos no controle da estabilidade dessas proteínas, o que envolve, por um lado, a ação de agentes caotrópicos e, por outro, a ação de solutos estabilizantes geralmente chamados de osmólitos.

Os acidentes ofídicos ocorrem principalmente nas zonas rurais e áreas periféricas urbanas. Eles constituem um grave problema de saúde pública em países tropicais, despertando o interesse pelos agentes antiofídicos e pelas ações tóxico-farmacológicas dos componentes presentes em peçonhas de serpentes, as quais são sintetizadas por um par de glândulas exócrinas localizadas na mandíbula destes répteis **(Figura 1).**

Na região do Triângulo Mineiro, no Brasil, as serpentes botrópicas são responsáveis pelos mais altos índices de envenenamentos. Neste contexto, destaca-se a espécie *Bothrops alternatus* (urutu), a qual tem seu *habitat* em matas, áreas cultivadas e locais propícios à proliferação de roedores **(Figura 2).**

As peçonhas de serpentes apresentam inúmeras proteínas e peptídeos tóxicos e não tóxicos e, ainda, componentes não protéicos como carboidratos, lipídeos, aminas e outras moléculas menores. O sistema evolucionário selecionou toxinas de peçonhas que são específicas para muitos alvos em tecidos animais.

Dentre as toxinas presentes em peçonhas, destacam-se neurotoxinas, cardiotoxinas, miotoxinas, fosfolipases, L-aminoácido-oxidases e, especialmente, as proteases, as quais podem afetar o sistema hemostático e causar alterações teciduais.

Estas biomoléculas são conhecidas pelos seus efeitos paradoxais de natureza maléfica e terapêutica. Um mesmo complexo enzimático pode provocar alterações locais, sistêmicas e, em determinadas situações, o óbito, assim como prevenir, tratar e curar distúrbios dos sistemas de coagulação e fibrinólise, hipertensão arterial e câncer. A literatura relata a possibilidade de se utilizar tais

componentes orgânicos como fármacos antitrombóticos, anti-hipertensivos, anticancerígenos, além de antimicrobianos e anti-HIV.

As enzimas proteolíticas podem ser classificadas em metalo- e serinoproteases, ambas responsáveis por manifestações sistêmicas e locais como necrose, bolhas cutâneas e reações inflamatórias. As metaloproteases podem ser classificadas de acordo com os seus domínios e são dependentes de cátions como Zn^{+2}, Ca^{+2} ou Mg^{+2}. As serinoproteases requerem resíduos de serina para exercerem sua atividade catalítica. Muitas destas enzimas possuem ação semelhante a da trombina ('thrombin-like'), promovendo coagulação *in vitro* e incoagulabilidade *in vivo.* Este efeito *in vivo* permite sua utilização no tratamento de desordens sanguíneas trombóticas, importante causa patológica de mortalidade em humanos.

O **capítulo II** desta tese apresenta o artigo sobre a purificação e a caracterização estrutural e funcional de uma nova serinoprotease 'thrombin-like' isolada da peçonha de *Bothrops alternatus*. Esse artigo, intitulado '**Bhalternin: functional and structural characterization of a new thrombin-like enzyme from *Bothrops alternatus* snake venom'**, foi publicado no periódico **Toxicon** no ano de 2010 e pode ser localizado na internet sob 'digital identification object' (doi) número 10.1016/j.toxicon.2010.02.014.

Enzimas proteolíticas encontram-se também largamente distribuídas no reino vegetal, onde estão envolvidas em muitos processos biológicos como germinação de sementes, ativação proteolítica de proenzimas, senescência, bacteriólise e proteção contra patógenos. A literatura relata a presença de ação fibrinogenolítica também em algumas proteases vegetais. A maioria das enzimas proteolíticas encontradas em vegetais são cisteinoproteases, embora algumas endopeptidases tenham sido descritas como serino-, metalo- e aspartilproteases.

Os exemplos mais clássicos de enzimas proteolíticas vegetais são a papaína e a bromelina, isoladas de *Carica papaya* (mamão) e *Ananas comosus* (abacaxi), respectivamente. Essas enzimas apresentam diferentes aplicações comerciais na indústria alimentícia, pelo potencial digestivo, e na indústria farmacêutica, pela ação anti-inflamatória.

Enzimas proteolíticas estão presentes no látex de plantas, particularmente das espécies pertencentes ao gênero *Euphorbia*. A espécie *Euphorbia milii* var.

hislopii, popularmente conhecida como coroa-de-cristo, é originária de Madagascar, cultivada como planta ornamental em diversos países. No Brasil, ela é muito utilizada como cerca viva.

O presente trabalho procura também dar uma contribuição na caracterização fitoquímica e farmacológica das proteases do látex de *Euphorbia milii* var. *hislopii*, com o artigo apresentado no **capítulo III**, previamente publicado sob o título **'Purification and biochemical characterization of Eumiliin from *Euphorbia milii* var. *hislopii* latex',** na revista **Phytochemistry** no ano de 2010, sob o 'doi' número 10.1016/j.phytochem.2010.02.009.

As utilizações biotecnológicas e terapêuticas dessas enzimas dependem muito das suas estabilidades intrínsecas e das condições necessárias para o controle de suas estabilidades. É neste sentido que o **capítulo IV** desta tese apresenta resultados preliminares das avaliações das estabilidades das enzimas balternina e eumilina, descritas respectivamente nos **capítulos II** e **III**.

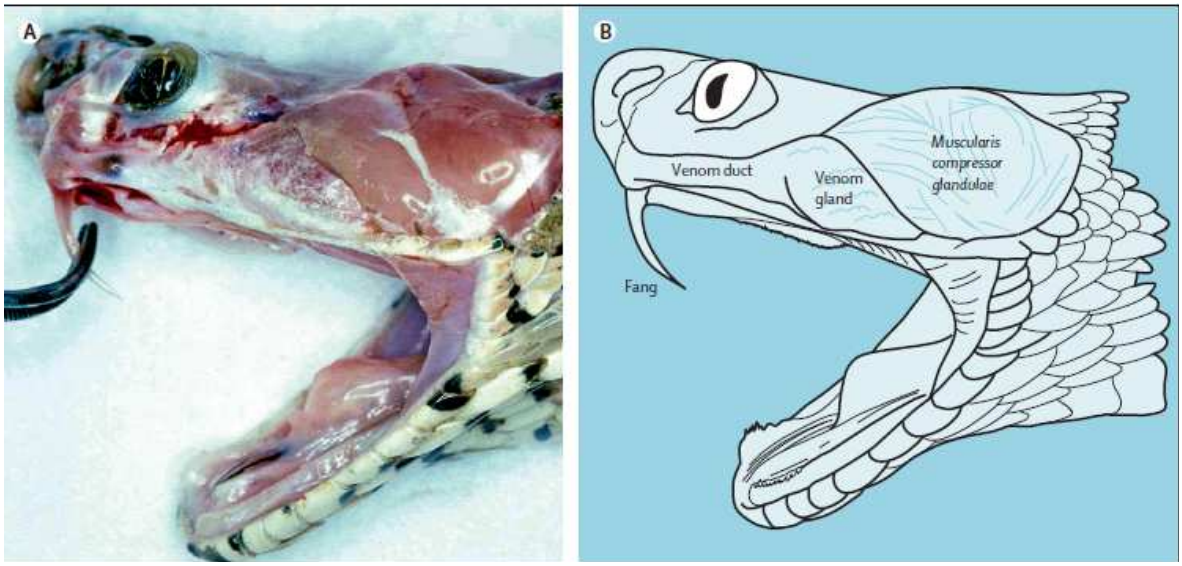


Figura 1: Aparato de peçonha de serpente. **A)** Espécie dissecada. **B)** Diagrama mostrando as localizações específicas na espécie dissecada, especialmente a glândula de peçonha (WARREL, 2010).

A

B

Figura 2: (A) Distribuição geográfica da espécie *Bothrops alternatus*. A região do Triângulo Mineiro está destacada em vermelho. Adaptado de Melgarejo (2003). **(B)** Serpente *B. alternatus*. Fonte: http:/www.ivb.rj.gov.br/galeria_bothrops/bothrops_9.html

Capítulo I

Fundamentação teórica

Proteases ofídicas e vegetais e seus mecanismos de estabilização

1. PROTEASES DE PEÇONHAS DE SERPENTES

Os acidentes ofídicos, com suas consequências locais, sistêmicas e fatais têm sido observados desde o tempo das antigas civilizações (ANGULO, LOMONTE, 2009). De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), cerca de 2.500.000 acidentes ocorrem anualmente, resultando em uma média 125 mil mortes por ano (PINHO, OLIVEIRA, FALEIROS, 2004). Aproximadamente 20 mil destes envenenamentos são registrados no Brasil, levando ao óbito cerca de 120 vítimas por ano (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2001), constituindo, portanto, um grave problema de Saúde Pública (BARRAVIEIRA, 1991).

As peçonhas de serpentes, sintetizadas por um par de glândulas exócrinas (KOCHVA et al., 1980; MACKESSY, BAXTER, 2006), são conhecidas por congregar efeitos maléficos com propriedades preventivas e até mesmo curativas de diversas doenças, despertando o interesse de pesquisadores no isolamento e caracterização bioquímica de seus componentes, que compreendem íons e biomoléculas, principalmente proteínas com atividade enzimática (JIMÉNEZ-PORRAS, 1970; TU, 1977).

As peçonhas das serpentes das famílias Viperidae e Elapidae são as principais responsáveis pelos danos teciduais locais (WARRELL, 1995, 2004), envolvendo complexos efeitos patológicos como necrose, hemorragia, edema, alterações nos vasos linfáticos e degradação da matriz extracelular (GUTIÉRREZ, LOMONTE, 2003; GUTIÉRREZ et al., 2009).

A literatura relata o isolamento e a caracterização de inúmeras proteínas ofídicas, que apresentam diversas atividades biológicas e/ou enzimáticas, tais como proteases, miotoxinas, fosfolipases A_2, fosfomonoesterases, L-aminoácido-oxidases, acetilcolinesterases, nucleotidases, nucleosidases e desintegrinas (MATSUI, FUJIMURA, TITANI, 2000; SWENSON, MARKLAND JR, 2005; MATSUI, HAMAKO, TITANI, 2010).

As enzimas proteolíticas, classificadas principalmente como metalo- e serinoproteases, geralmente afetam processos hemostáticos (GARCIA et al., 2004; LU, CLEMETSON, 2005; SANCHEZ et al., 2005), podendo ser classificadas como procoagulantes, anticoagulantes e/ou fibrin(ogen)olíticas (MARKLAND JR, 1991; SIIGUR, SIIGUR, 1992).

As metaloproteases encontradas em peçonhas ofídicas (SVMPs) são dependentes de cátions (normalmente Zn^{+2}, Ca^{+2} ou Mg^{+2}). Elas são sintetizadas na glândula de peçonha como proteínas multidomínios. Estes domínios compreendem um domínio proenzima e um domínio protease. As metaloproteases são secretadas como preproenzimas e ainda possuem módulos regulatórios adicionais, os quais são responsáveis pelas interações com a matriz extracelular e integrinas (RAMOS, CARMONA, SELISTRE-DE-ARAUJO, 2003).

Inicialmente, estas enzimas foram divididas em quatro classes denominadas P-I a P-IV. A primeira possui apenas o domínio metaloprotease, enquanto P-II apresenta o domínio metaloprotease seguido por um domínio "desintegrina-like". A classe P-III possui ambos os domínios citados para a classe PII e, ainda, o domínio rico em cisteína. Por fim, a classe P-IV apresenta enzimas com duas subunidades unidas por ligações dissulfeto, de forma que uma das subunidades é formada pelos três domínios encontrados na classe P-III e a outra caracterizada como uma proteína lectina tipo-C (HITE et al., 1994; MATSUI, FUJIMURA, TITANI, 2000; RAMOS, SELISTRE-DE-ARAÚJO, 2004). Segundo Fox, Serrano (2005), as SVMPs podem ser classificadas em PI, PIIa, PIIb, PIIIa, PIIIb e PIV. O critério utilizado para essa denominação baseou-se essencialmente na presença ou ausência de vários domínios não protease como observado através de transcrições de mRNA e proteínas isoladas de peçonhas.

As serinoproteases de peçonhas de serpentes (SVSPs) possuem resíduos de aminoácidos em posições específicas correspondendo à uma tríade catalítica altamente conservada (Ser195, His57 e Asp102) (SERRANO, MAROUN, 2005), podendo ativar ou inativar fatores de coagulação sanguínea, interferir na agregação plaquetária e participar do sistema fibrinolítico (BRAUD, BON, WISNER, 2000; WHITE, 2005).

Geralmente, as SVSPs se enovelam de forma semelhante à quimotripsina, enzima digestiva que apresenta dois domínios assimétricos de folhas beta, separados pela tríade catalítica. O mecanismo catalítico destas proteases inclui a reatividade do resíduo de serina, responsável pela formação de um complexo transiente acil-enzima, o qual é estabilizado por resíduos de histidina e ácido aspártico no interior do sítio ativo (LESK, FORDHAM, 1996). O resíduo de serina reage com inibidores enzimáticos como o PMSF (fenilmetilsulfonilfluoreto), o DFP

(diisopropilfluorofosfato) e a benzamidina, formando um complexo inativo estável indefinido. Dentre os aminoácidos que compõem as SVSPs, destacam-se os resíduos de cisteína respensáveis pela formação das pontes dissulfeto (SERRANO, MAROUN, 2005).

A atividade de serinoproteases está relacionada principalmente à ação do tipo da trombina ('thrombin-like') de peçonhas botrópicas (MATSUI, FUJIMURA, TITANI, 2000; SANTORO, SANO-MARTINS, 2003). Estas enzimas causam, paradoxalmente, coagulação sanguínea *in vitro* (PIRKLE, 1998; MAGALHÃES et al., 2007) e incoagulabilidade *in vivo* por depletar o fibrinogênio circulante, competindo com a trombina (TR) pela hidrólise do fibrinogênio. No entanto, ao contrário da ação da TR, as enzimas 'thrombin-like' (TLEs) não são inibidas pela heparina e, geralmente, não ativam o fator XIII da cascata de coagulação **(Figura 3).** Essas enzimas também são conhecidas como venombinas e são classificadas em três grupos (A, B ou AB), de acordo com a capacidade de liberação dos fibrinopeptídeos A, B ou ambos (MARKLAND, 1998; MAGALHÃES et al., 2007).

Há também TLEs conhecidas como ancrode ('ancrod'), isolada da peçonha de *Agkistrodon rhodostoma* (BURKHART et al., 1992), batroxobina, isolada de *Bothrops atrox* (STOCKER, BARLOW, 1976) e crotalase, isolada de *Crotalus adamanteus* (MARKLAND, DAMUS, 1971). Essas enzimas liberam preferencialmente o fibrinopeptídeo A (FPA) e, portanto, pertencem à classe venombina A, não ativam o fator XIII ou outros fatores de coagulação e não causam agregação plaquetária, de forma que o coágulo formado não possui ligações covalentes entre as cadeias fibrínicas (MARSH, 1994). As TLEs que liberam os fibrinopeptídeos A e B e ativam o fator XIII são conhecidas como venombinas AB e possuem como exemplo a enzima isolada da peçonha de *Bitis gabonica* (PIRKLE, 1998). Enzimas como a contortrixobina, isolada de *Agkistrodon contortrix contortrix* (AMICONI et al., 2000) e okinaxobina I, isolada de *Trimeresurus okinavensis* (IWASAKI et al., 1990) representam uma terceira classe de venombinas, conhecidas como venombinas B, que liberam preferencialmente o FPB.

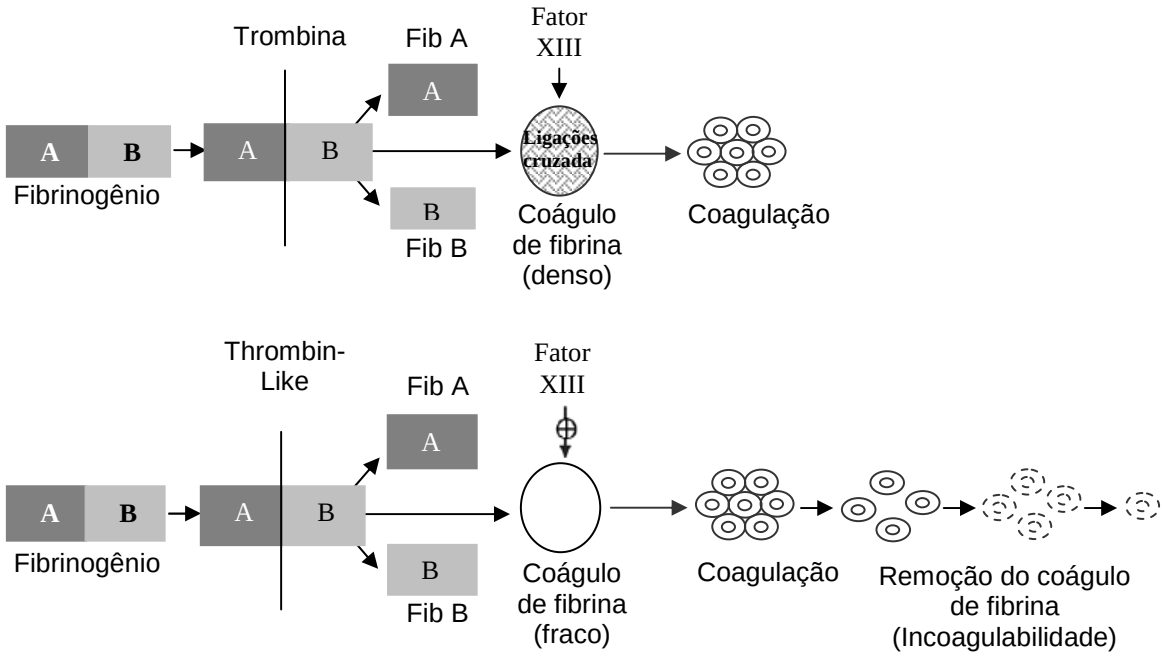


Figura 3: Mecanismo de ação da trombina e de enzimas 'thrombin-like'. **Fib A:** fibrinopeptídeo A; **Fib B:** fibrinopeptídeo B.

O resíduo de aspartato (Asp^{189}), localizado na base do sítio ativo das SVTLEs, requer aminoácidos básicos como a arginina e lisina no substrato, o que justifica a especifidade enzimática em catalisar a quebra de ligações arginil.

Substratos fluorogênicos ou cromogênicos para enzimas fibrinogenolíticas também podem ser utilizados para a determinação de atividades amidolíticas ou esterolíticas de SVTLEs (SILVA JÚNIOR, DE-SIMONE, 2004).

De acordo com Markland Jr (1991), as enzimas fibrinogenolíticas podem ser classificadas como Aα e Bβ-fibrinogenases. A especificidade de clivagem dirigida somente à cadeia γ do fibrinogênio não foi descrita na literatura até o presente momento. A maioria das enzimas fibrinogenolíticas degrada preferencialmente a cadeia Aα, seguida da cadeia Bβ do fibrinogênio plasmático (MARKLAND, 1998).

As atividades específicas de determinadas enzimas de peçonhas de serpentes merecem cautela, pois algumas ações podem ser desencadeadas sinergisticamente por duas ou mais toxinas (ANGULO, LOMONTE, 2009). Além disso, uma única enzima pode ter mais de uma atividade específica e,

consequentemente, ser responsável por múltiplos efeitos decorrentes do envenenamento. De qualquer forma, o isolamento e a caracterização de componentes presentes em peçonhas representam passos fundamentais para o entendimento dos eventos envolvidos em acidentes ofídicos (ANGULO, LOMONTE, 2009).

Portanto, a descoberta e o refinamento de técnicas cromatográficas, espectrofotométricas e eletroforéticas, assim como a elucidação de experimentos de caracterização de toxinas, torna-se de suma importância para o conhecimento e entendimento dos mecanismos bioquímicos e estruturais destas biomoléculas catalíticas.

2. HEMOSTASIA, COAGULAÇÃO SANGUÍNEA E FIBRINÓLISE

O processo de coagulação sanguínea ocorre em decorrência de injúrias vasculares, da exposição do sangue a componentes que normalmente não se encontram no interior dos vasos ou de alterações bioquímicas (FRANCO, 2001).

O mecanismo fisiológico da coagulação **(Figura 4)** envolve complexas interações entre proteases do plasma sanguíneo e seus cofatores, acarretando uma ativação sinérgica de zimogênios, de tal forma que cada fator, em sua maioria serinoproteases, com exceção dos fatores VIIa e XIIIa (VERSTRAETE, VERMYLEN, 1989; BOON, 1993), comporta-se como substrato para a enzima anterior e ativador da proenzima subsequente. A atividade proteolítica limitada é responsável por grande parte das etapas de ativação. É interessante ressaltar que as inúmeras enzimas envolvidas na coagulação se localizam em superfícies celulares contendo fosfolipídeos, especialmente em plaquetas. As membranas de plaquetas, quando ativadas, expressam sítios de ligação para os complexos fator IXa-fatorVIIIa, conhecido como complexo “tenase” e fator Xa-fatorVa, denominado complexo “protrombinase” (FRANCO, 2001) **(Figura 5).** Adicionalmente, íons cálcio são necessários em diversos passos das reações de coagulação.

Duas vias distintas, a intrínseca (iniciada por componentes presentes no espaço intravascular) e a extrínseca (que envolve componentes do sangue, mas também elementos que usualmente não estão presentes no espaço

intravascular), se entrelaçam e culminam em uma via comum para explicar o processo de coagulação (BARROS et al., 2009) **(Figura 4).**

A via intrínseca inicia-se com a ativação ou fase de contato, processo que envolve o fator XII, pré-calicreína, cininogênio de alto peso molecular (HMWK) e o fator XI. Uma superfície contendo cargas elétricas negativas desencadeia a ativação e união dos fatores de contato, os quais são independentes de cálcio e fosfolipídeos. Inicialmente, ocorre uma reação cíclica entre o fator XII e a pré-calicreína e, após o contato com a superfície, o fator XII é clivado em duas cadeias transformando-se no fator XIIa (forma ativa). Este, por sua vez, converte pré-calicreína em calicreína, que catalisa a sua própria geração por ativar o fator XII, acelerando a fase de contato. Outro catalisador é o HMWK, que atua como molécula carreadora responsável por elevar a concentração dos fatores de contato. O fator XIIa ativa ainda o fator XI, que, por sua vez, ativa o fator IX. O fator IXa, na presença de fator VIII, ativa o fator X da coagulação. Na via extrínseca, ativada no momento da injúria, o fator VII plasmático se liga ao seu cofator, o fator tecidual, e forma um complexo na presença de fosfolipídios e cálcio, o qual facilita a conversão por clivagem peptídica do fator VII na sua forma ativa. Este complexo ativa o fator X ao clivar um peptídeo na cadeia pesada da molécula e, além disto, ativa o fator IX por proteólise limitada (BARROS et al., 2009) **(Figura 4).**

A formação do fator Xa pelas vias intrínseca e extrínseca resulta na gênese da trombina, que, por proteólise do fibrinogênio, promove a formação de fibrina. Neste momento, o fator Xa ativa o fator V e forma o complexo ativador protrombinase, citado anteriormente, o qual é responsável pela conversão de protrombina em trombina (DAVIE, 2003) **(Figura 5)**.

A trombina, uma serinoprotease endógena converte por proteólise o fibrinogênio solúvel em fibrina insolúvel (KORNALIK, 1985). O fibrinogênio plasmático é uma glicoproteina dimérica de alto peso molecular (340 kDa), apresentando em cada dímero três cadeias polipeptídicas (Aα, Bβ e γ), unidas por ligações dissulfeto (WOLBERG, 2007). A sua degradação resulta na liberação dos fibrinopeptídeos A (FPA) e B (FPB) após a hidrólise das ligações Arg_{16}–Gly_{17} e Arg_{15}–Gly_{16} presentes, respectivamente, nas cadeias Aα e Bβ da molécula. A ativação do fator XIII da cascata de coagulação pela trombina resulta na formação

de ligações cruzadas entre as cadeias fibrínicas promovendo a formação do coágulo sanguíneo denso **(Figura 3).**

A hemostasia é um processo complexo. Logo após a lesão do vaso sanguíneo ocorre vasoconstrição, para diminuir o fluxo local e permitir maior contato entre as plaquetas circulantes e a região danificada do endotélio, processo chamado de adesão plaquetária. Essa adesão ocorre em superfícies carregadas negativamente, por interações entre glicoproteínas de membranas, principalmente glicoproteínas Ib (GPIb), VI (GPVI) e complexo Ia/integrina IIa, com proteínas do subendotélio como fator de von Willebrand (vWF), colágeno, fibronectina e vitronectina (KORNALIK, 1985).

O primeiro sistema de defesa contra a perda sanguínea se faz por meio deste tampão plaquetário. Desta forma, as plaquetas ativadas e aderidas ao endotélio liberam inúmeras substâncias, que promovem a agregação das plaquetas, ativam o mecanismo da coagulação e diminuem a permeabilidade vascular. Os ativadores químicos como a adenosina-difosfato (ADP), trombina, catecolaminas e colágeno são essenciais para os processos de adesão e agregação plaquetária (KORNALIK, 1985).

O passo seguinte é a deposição de uma rede fibrínica entre as plaquetas agregadas, o que contribui para estancar o sangramento. Como foi visto, a fibrina se forma por um mecanismo proteolítico. A ativação dos fatores da coagulação pode ocorrer pelas próprias plaquetas, contatos com superfícies carregadas negativamente e por células do vaso lesado. A cascata de coagulação é regulada por uma série de fatores, que impedem o crescimento descontrolado de trombo ou coágulo no interior do vaso (VERSTRAETE, VERMYLEN, 1989).

Um sistema anticoagulante natural pode agir contrariamente aos mecanismos coagulantes. A antitrombina (AT) e a proteína C (PTN C), com participação do cofator proteína S (PTN S), são imprescindíveis para os recursos anticoagulantes deste sistema. Desta forma, a AT possibilita a formação de complexos inativados (ex: complexo trombina-antitrombina) que resultam na remoção rápida de enzimas coagulantes da circulação. Na presença de trombomodulina, a PTN C é ativada pela trombina, resultando na inibição da coagulação por proteólise do fator VIIIa e do fator Va. É importante ressaltar ainda

que o inibidor do fator tecidual opera uma rápida limitação do FT (FRANCO, 2001).

Assim como o mecanismo de coagulação é responsável por impedir a perda excessiva de sangue, a última etapa da hemostasia, conhecida como fibrinólise, contribui para que não ocorra a formação desordenada de trombos intravasculares, evitando complicações tromboembolíticas.

O sistema fibrinolítico participa não somente da remoção do coágulo sanguíneo, como também de muitos outros fenômenos biológicos, como a remodelagem da matriz extracelular, reparação tecidual, transformação maligna, cicatrização, função macrofágica, ovulação e implantação do embrião (VERSTRAETE, VERMYLEN, 1989). Esse sistema é composto por diversas proteases séricas e inibidores, que regulam a conversão de plasminogênio (proenzima inativa) em plasmina (enzima ativa), que além de degradar a fibrina, também ativa metaloproteases da matriz extracelular (COLLEN, 1999) **(Figura 4).**

As enzimas do sistema fibrinolítico são todas serinoproteases, ao passo que os inibidores da fibrinólise são membros das serpinas, as quais são inibidores de proteases séricas. Dois ativadores fisiológicos do plasminogênio são conhecidos. O primeiro é conhecido como ativador do plasminogênio do tipo tecidual (t-PA, “tissue-type plasminogen activator”) e o segundo, é o ativador do plasminogênio do tipo uroquinase (u-PA, “urokinase-type plasminogen activator”). Ambos têm alta especificidade de ligação por seu substrato e promovem hidrólise de uma única ligação peptídica (Arg_{560}-Val_{561}), que resulta, portanto, na formação da plasmina.

Em síntese, a hemostasia compreende dois mecanismos opostos responsáveis pela formação e dissolução do coágulo de fibrina, os quais, simultaneamente, contribuem para a manutenção adequada do fluxo sangüíneo no interior dos vasos e se mantêm em equilíbrio pelas propriedades hemodinâmicas do sangue (BRAUD, BON, WISNER, 2000).

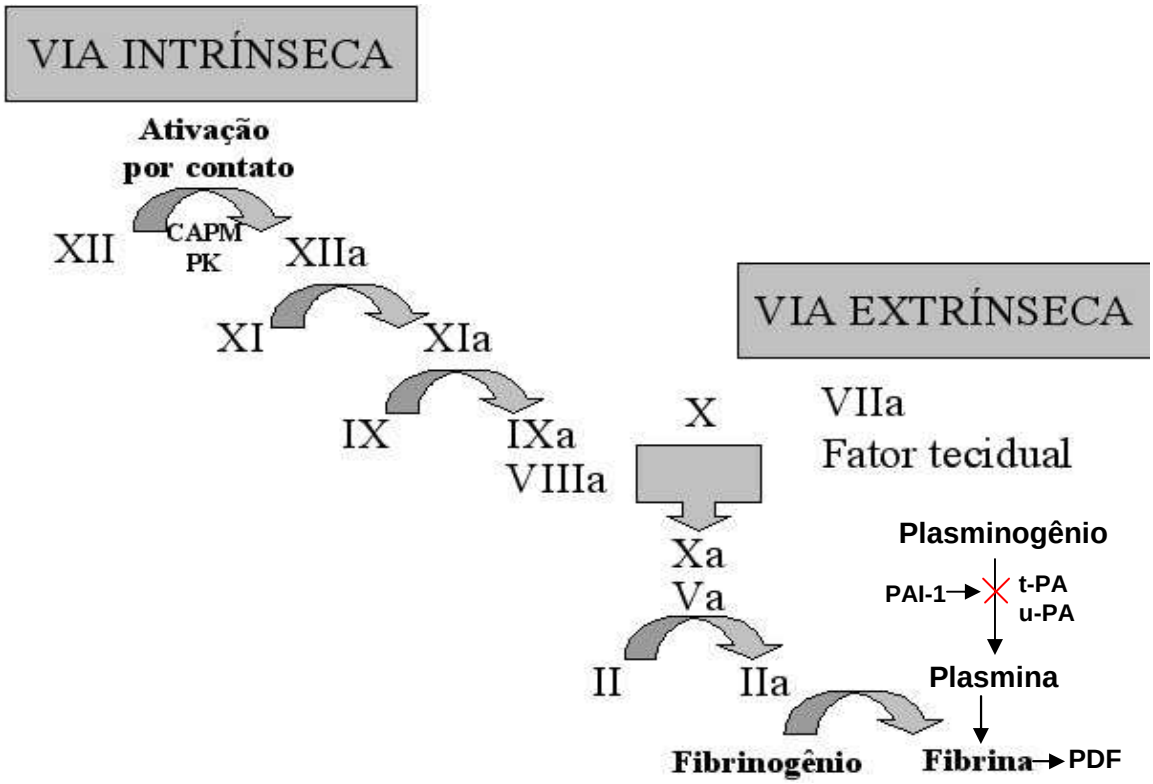


Figura 4: Inter-relações entre as vias intrínseca e extrínseca da cascata da coagulação sanguínea e o sistema fibrinolítico (FRANCO, 2001). CAPM: cininogênio de alto peso molecular. PK: pré-calicreína. PDF: produtos de degradação de fibrina. t-PA: Ativador do plasminogênio do tipo tecidual. u-PA: Ativador do plasminogênio do tipo uroquinase.

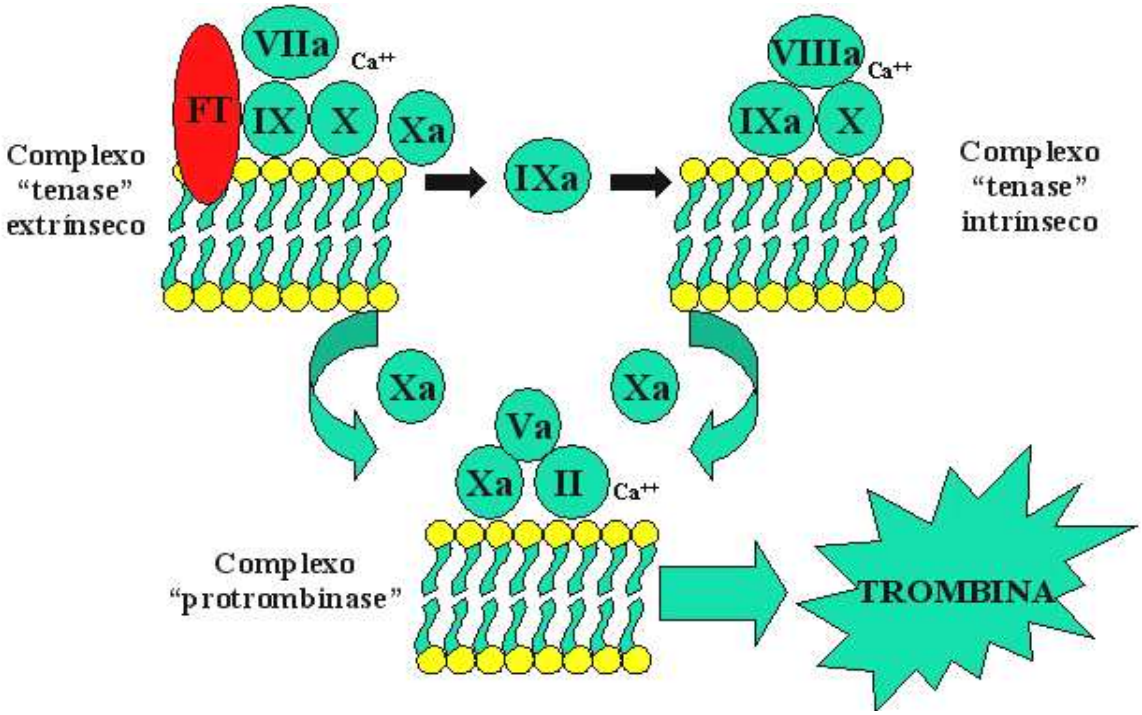


Figura 5: Complexos procoagulantes (tenase e protrombinase) representados esquematicamente. (FRANCO, 2001).

3. ALTERAÇÕES TECIDUAIS CAUSADAS POR PROTEASES BOTRÓPICAS

Envenenamentos por serpentes botrópicas podem resultar em alterações patológicas locais, as quais podem vir acompanhadas por uma série de efeitos deletérios sistêmicos (BOLAÑOS, 1982; GUTIÉRREZ et al., 1995; ARROYO, ROJAS, GUTIÉRREZ, 1999; OTERO et al., 2002; WARRELL, 2004). As manifestações clínicas das alterações sistêmicas incluem sangramento, coagulopatia, hipotensão, alterações hemodinâmicas, edema pulmonar, falência renal aguda, hemólise intravascular, alterações hepáticas e miocárdicas agudas e, em muitos casos não tratados com a antiveneno, podem ocorrer falência múltipla dos órgãos e morte (OTERO et al., 2002; WARRELL, 2004).

Em envenenamentos ou em atividades experimentais direcionadas, as peçonhas ofídicas são injetadas em posições anatômicas restritas e um gradiente de concentração de toxinas é estabelecido em diferentes áreas teciduais, variando ao longo do tempo. Tal gradiente depende do total de peçonha injetada e da capacidade toxicocinética de cada proteína presente no tecido afetado. É provável que em áreas em que concentração de toxinas é mais elevada os processos patológicos típicos predominem (OWNBY, BJARNASON, TU, 1978; GUTIÉRREZ, OWNBY, ODELL, 1984a).

Em áreas mais periféricas, os efeitos patológicos seriam pouco pronunciados, pois provavelmente, necrose e rompimento de microvasos ocorrem concomitantemente, com fenômenos menos drásticos tais como apoptose, ativação e proliferação de alguns tipos de células. Mesmo em áreas de alto impacto citotóxico, existem células como macrófagos e fibroblastos que não são afetadas pela ação das toxinas, mas podem ser ativadas por expressão de genes, síntese e proliferação de mediadores inflamatórios e componentes da matriz extracelular. Estes fenômenos são similares às consequências descritas após o choque isquêmico, onde áreas necrosadas são cercadas por uma região de células menos severamente afetadas, em que a intervenção terapêutica eficaz reduz a extensão do dano isquêmico (PACIARONI, CASO, AGNELLI, 2009).

Alterações teciduais locais podem ser resultantes do envenenamento por serpentes das famílias Viperidae e Elapidae (WARRELL, 1995, 2004). Toxinas botrópicas com ação citotóxica, especialmente metalo- e serinoproteases podem

induzir efeitos patológicos como necrose de pele e músculo, bolhas cutâneas **(Figura 6)**, hemorragia, danos em vasos linfáticos, degradação da matriz extracelular e inflamação (edema, infiltração leucocitária e dor) (GUTIÉRREZ, LOMONTE, 2003; SERRANO, MAROUN, 2005; MOURA-DA-SILVA, BUTERA, TANJONI, 2007; GUTIÉRREZ et al., 2009), porém, a contribuição para a resposta inflamatória da peçonha total é relativamente pouco compreendida.

A reação inflamatória local induzida por peçonhas botrópicas normalmente é resultante da ação combinada de diversas toxinas, atuando rapidamente em tecidos muscular e conectivo, promovendo a liberação de mediadores inflamatórios endógenos (TREBIEN, CALIXTO, 1989; PERALES et al., 1992; MOURA-DA-SILVA et al., 1996; GONÇALVES, MARIANO, 2000; CHACUR et al., 2002).

Apesar dos avanços significativos no entendimento da patogênese dos danos teciduais locais induzidos por peçonhas de serpentes, observações recentes sugerem que o conhecimento sobre este fenômeno é ainda limitado. O estudo deste aspecto é baseado em três suposições implícitas. Primeira, o tecido e a resposta celular para a ação de toxinas têm sido vistos dentro de uma perspectiva dicotômica, ou seja, células são danificadas ou poupadas da ação das toxinas (GUTIÉRREZ, OWNBY, ODELL, 1984a). Segunda, as respostas teciduais às peçonhas foram consideradas homogêneas, no sentido que as alterações foram frequentemente investigadas por mudanças celulares na matriz extracelular e por componentes inflamatórios em homogeneizados de tecidos totais (RUCAVADO et al., 2002). Terceira, os efeitos patológicos locais foram estudados predominantemente pelos efeitos de toxinas purificadas e isoladas de peçonhas, sugerindo que o processo de envenenamento pode ser compreendido pela distinção do mecanismo de ação de toxinas individuais.

Quando se analisa o efeito de enzimas de peçonhas na matriz extracelular (MEC) do tecido afetado, pode-se observar que em áreas de alta concentração de peçonha é provável que ocorra a degradação difundida da MEC com consequências drásticas para o processo de reparo e regeneração do tecido. No entanto, a degradação da matriz extracelular em regiões periféricas cujos locais são menos afetados, provavelmente é mais limitada e pode resultar em exposição de moléculas, na liberação de fatores de crescimento armazenados em

proteoglicanos da matriz e liberação de fragmentos biologicamente ativos de componentes da MEC (PACIARONI, CASO, AGNELLI, 2009).

Figura 6: Envenenamento característico de serpentes botrópicas. Neste caso, acidente ofídico por *Bothrops atrox* no membro inferior, com a presença de bolhas, edema e necrose (WARREL, 2010).

4. SERINOPROTEASES OFÍDICAS E A CLÍNICA MÉDICA

As principais causas de mortalidade e morbidade nos países desenvolvidos são as condições clínicas associadas a quadros trombóticos. Entre elas estão as doenças cerebrovasculares isquêmicas, doenças vasculares periféricas e infarto do miocárdio, conhecidas como desordens aterotrombóticas. Destacam-se ainda as desordens trombóticas venosas, representadas pela embolia pulmonar e pela trombose profunda das veias (ARIËNS et al., 2002).

A interação de fatores de risco aterogênicos como dislipidemias, hipertensão e diabetes com anomalias do sistema hemostático contribuem para as manifestações destas desordens, as quais geralmente levam muitos anos para se desenvolverem (ARIËNS et al., 2002).

O infarto do miocárdio está relacionado ao aparecimento de um coágulo de fibrina rico em plaquetas e resistente à dissolução pela plasmina. A trombose venosa normalmente ocorre em pacientes geneticamente predispostos, com

deficiências na síntese da proteína C ou da antitrombina III e, quando comparada às doenças arteriais, predominam os polímeros de fibrina e o número de plaquetas é reduzido (ARIËNS et al., 2002).

O desenvolvimento das doenças arteriais envolve a hipertensão e a deposição lipídica, resultando em hiperplasia da musculatura lisa e levando à formação, por exemplo, do ateroma coronário. Com o passar do tempo, as placas se tornam instáveis e se rompem, formando êmbolos que ativam a via extrínseca da cascata de coagulação, iniciando uma série de eventos que levarão à oclusão trombótica das artérias coronárias (ARIËNS et al., 2002).

As doenças cardiovasculares (DCVs) correspondem às desordens do coração e vasos sanguíneos e incluem doenças cardíacas coronárias, doenças cerebrovasculares, hipertensão, doenças arteriais periféricas e cardíacas reumáticas, anomalias cardíacas congênitas e falência cardíaca (DENG et al., 2010). De acordo com a Organização Mundial da Saúde, cerca de 17,5 milhões de pessoas morreram de DCVs em 2005, o que representa 30% das mortes globais. Em 2015, aproximadamente 20 milhões de pessoas morrerão de DCVs. A trombose intravascular é caracterizada pela agregação fibrínica em artérias, representando uma das principais causas de doenças cardiovasculares. Agentes trombolíticos estão sendo usados no tratamento terapêutico de trombose, destacando os ativadores de plasminogênio como tPA (ativador de plasminogênio tecidual), uroquinase e estreptoquinase. Apesar do seu uso difundido, todos estes agentes têm efeitos secundários indesejáveis e possuem preços relativamente elevados (BLANN, LANDRAY, LIP, 2002).

A busca por outros agentes trombolíticos torna-se importante sob os aspectos terapêutico e econômico. Desta forma, moléculas antitrombóticas encontradas em peçonhas de serpentes estão sendo purificadas e caracterizadas devido à alta eficácia que estes componentes apresentam no processo de dissolução de trombos (XIUXIA et al., 2001; BORTOLETO et al., 2002; LEONARDI, GUBENSEK, KRIZAJ, 2002).

O interesse médico por proteínas presentes em peçonhas ofídicas vem crescendo substancialmente devido às suas propriedades farmacológicas. Algumas SVTLEs estão sendo utilizadas em laboratórios na detecção do fibrinogênio em amostras de sangue heparinizadas, na verificação do processo de

formação da rede fibrínica, assim como na terapia antitrombótica, em transplantes de órgãos e em cirurgias vasculares (MARSH, WILLIAMS, 2005). Novamente, como citado anteriormente tem-se como exemplo de moléculas desfibrinogenantes as enzimas batroxobina, ancrode (Arwin®) e crotalase. Merece especial atenção, uma enzima 'thrombin-like' isolada da peçonha de *Bothrops moojeni* denominada de BThTl, a qual destaca-se não só por suas propriedades anticoagulantes, como também pode ser utilizada como cola biológica em conjunto com outras substâncias (OLIVEIRA, HOMSI-BRANDEBURGO, 2004).

É importante ressaltar ainda a importância da cola de fibrina utilizada em processos cirúrgicos como esplenectomia, preservação esplênica, trauma, neurocirurgias, microcirurgias oftalmológicas e cirurgias cardiotoráxicas (WANG, PINS, SILVER, 1995). A cola de fibrina pode ser usada como agente hemostático e selante, a qual pode ser formada a partir do mecanismo de ação de TLEs, que é similar à cascata de coagulação sanguínea por interromper o extravasamento sanguíneo por meio da proteólise do fibrinogênio, resultando em monômeros de fibrina, responsáveis pela formação do coágulo "frouxo", o que favorece a reabsorção da cola por fibrinólise (COSTA et al., 2009).

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 como agentes desfibrinogenantes terapêuticos (BORTOLETO et al., 2002).

5. ASPECTOS ESTRUTURAIS E FUNCIONAIS DE SVSPs

Muitas SVSPs foram isoladas e suas características estruturais e funcionais elucidadas, especialmente as pertencentes à família Viperidae (PIRKLE, 1998; SILVA JR, DE-SIMONE, 2004; SAKAI et al., 2006). As sequências deduzidas por cDNA de muitas serinoproteases ofídicas revelaram um domínio altamente conservado na região amino-terminal, rico em resíduos de valina. O **Quadro 1** apresenta a sequência de aminoácidos da região N-terminal de algumas SVSPs mostrando o alto grau de homologia entre elas.

A estrutura tridimensional de uma proteína apresenta diferentes domínios estruturais e está diretamente relacionada à sua função biológica. Geralmente, a compreensão dos mecanismos relacionados à atividade catalítica de uma enzima requer a utilização de procedimentos que permitam a quantificação, a análise do grau de pureza e a estrutura parcial da biomolécula por meio da sequência N-terminal, podendo complementar outras técnicas mais sofisticadas como a obtenção da sequência completa utilizando métodos pertencentes à tecnologia do DNA recombinante (SHIVELY, PAXTON, LEE, 1989).

Neste contexto, o RT-PCR permite determinar o cDNA e, assim, deduzir os aminoácidos. Pelo alinhamento múltiplo é possível comparar a sequência de aminoácidos e, portanto, a similaridade estrutural entre enzimas presentes em diferentes peçonhas ofídicas.

Costa et al. (2010) purificaram e caracterizaram bioquimicamente uma enzima 'thrombin-like' (balternina) da peçonha de *B. alternatus*. O produto de amplificação por PCR produziu um fragmento de cDNA de 708 pares de bases que codifica para a proteína madura de 236 resíduos de aminoácidos. O alinhamento múltiplo da balternina e de outras serinoproteases de peçonhas de serpentes mostrou que esta enzima apresenta similaridade entre 65 a 72% com serinoproteases isoladas de diferentes gêneros ofídicos, por meio do sequenciamento total.

O processo de autoproteólise pode ser observado algumas vezes em proteases de peçonhas, principalmente se os primeiros resíduos de aminoácidos deduzidos corresponderem a um fragmento interno da enzima. De qualquer forma, o alinhamento múltiplo é uma ferramenta de grande importância, pois permite detectar se as similaridades estruturais encontradas em classes específicas de proteases se conservam.

Embora haja alto grau de homologia entre as SVSPs, sugerindo a divergência a partir de uma molécula ancestral comum, a especificidade por diferentes substratos como fibrinogênio, cininogênio e plasminogênio é significativamente alta (SERRANO, MAROUN, 2005).

As bases moleculares que definem a especificidade para o substrato ainda são pouco compreendidas. Desta forma, técnicas mais sofisticadas, como a

cristalografia por raios-X e modelagem molecular são importantes para o estudo e compreensão da estrutura e função de proteínas.

Quadro 1: Sequência N-terminal de serinoproteases isoladas de peçonhas ofídicas

SVTLEs	N-terminal	Serpente	Referências	PMID
Balternina	**VIGGDE**C**N**INEHRSL	*Bothrops alternatus*	Costa et al. (2010)	20184912
Purpurase	**V**V**GGDE**C**N**INEHRSL	*Cryptelytrops purpureomaculatus*	Tan (2010)	19770070
TI-Bp	**VIGGDE**C**D**INEH**PF**L	*B. pauloensis*	Costa et al. (2009)	19539638
Catroxobina	**V**V**GGDE**C**N**INEHRSL	*Crotalus atrox*	Pirkle, Theodor, Lopez (1989)	2617466
Flavoxobina	**VIGGDE**C**D**INEH**PF**L	*Trimeresurus flavoviridis*	Shieh et al. (1988)	3170503
Crotalase	**VIGGDE**C**N**INEH**PF**L	*C. adamanteus*	Markland, Damus (1971)	5132665
Gabonase	**V**V**GG**A**E**C**K**I**DG**H**RC**L**	*Bitis gabonica*	Pirkle et al. (1986)	3522580
Batroxobina	**VIGGDE**C**D**INEH**PF**L**	*B. atrox*	Stocker, Barlow (1976)	1011993
Botrombina	**VIGGDE**C**D**INEH**PF**L**	*B. jararaca*	Nishida et al. (1994)	8110787

Nota: Resíduos de aminoácidos conservados estão destacados em amarelo.

6. PROTEASES DE PLANTAS

Alguns extratos vegetais apresentam compostos antibacterianos (LIRIO, HERMANO, FONTANILLA, 1998), moluscicidas, (JURBERG, CABRAL NETO, SCHALL, 1985; TIWARI, SINGH, SINGH, 2003), antimutagênicos (REZENDE et al., 2004) e anticarcinogênicos (HECKER, 1968).

A medicina popular utiliza algumas espécies no tratamento e cura de doenças de pele, oftalmológicas e genitourinárias, gonorréia, reumatismo,

enxaqueca e envenenamentos ofídicos (SINGLA, PATHAK, 1990; VLIETINK, 1987; JAIN, 1996; BHATNAGAR, ANIL, SRIVASTAVA, 2000).

Inúmeras plantas laticíferas das famílias Euphorbiaceae, Apocyanaceae, Asclepiadaceae e Moraceae têm sido alvo de pesquisas fitoquímicas e farmacológicas, como ações fungicidas e o uso em doenças como a tuberculose e úlcera (SAMPAIO et al., 2004; 2005).

A espécie *Euphorbia milii* var. *hislopii* (coroa-de-cristo) **(Figura 7)**, originária da Ilha de Madagascar, é uma arbusto perene muito ramificado e utilizado como cerca viva em jardins. Suas inúmeras aplicações se estendem desde a indústria de cosméticos até a sua potencialidade no combate a moluscos e a esquistossomose em bovinos, ovinos e humanos (SOUZA et al., 1997; SCHALL et al., 2001; SUBHASH, JAGANNADHAM, 2008).

Figura 7: Espécie *Euphorbia milii* var. *hislopii* (coroa-de-cristo).

O látex, encontrado em vacúolos de células secretoras especializadas e geralmente associado à defesa da planta contra patógenos (SILVA et al., 2003), é um fluido branco leitoso formado por resinas, ceras, açúcares, lipídeos, proteínas e enzimas como peroxidases, esterases, fosfatases e proteases (LYNN, CLEVETTE-RADFORD, 1986a; YAGAMI et al., 1998), as quais desempenham funções importantes na fisiologia da planta (MENON et al., 2002).

O **Quadro 2** mostra algumas enzimas proteolíticas isoladas de espécies vegetais e a comparação de suas sequências amino-terminais.

Quadro 2: Proteases isoladas de plantas e suas sequências amino-terminais

Proteases	N-terminal	Espécie	Referências	PMID
Eumiliina	A F L L Q I I V T P P N	*Euphorbia milii*	Fonseca et al. (2010)	20206951
Milina	D V S Y V G L I L E T D	*E. milii*	Subhash, Monu, Jagannadham (2006)	18782069
Bamboo	T T R T P N F L G L V D	*Pleioblastus hindsii* Nakai	Arima et al. (2000a)	10963447
Asclepaina c I	L P N S V D W R Q K G V	*Asclepias curassavica L.*	Liggieri et al. (2004)	15517987
Asclepaina f	V E L P D S V D W R E K	*A. fruticosa*	Trejo et al. (2009)	19455353
Cardosina A	D S G G A V V A L T N D	*Cynara cardunculus* L.	Domingos et al. (2000)	11082193

Adaptado de Fonseca et al. (2010).

As metalo- e serinoproteases isoladas de plantas podem atuar na hemostasia, resultando em importantes ações farmacológicas (RICHTER et al., 2002). Algumas serinoproteases presentes nas famílias Euphorbiaceae, Moraceae e Asteraceae foram isoladas e caracterizadas (LYNN, CLEVETTE-RADFORD, 1986a,b; 1987).

As cisteinoproteases são largamente encontradas em vegetais e participam da germinação das sementes (KEMBHAVI et al., 1993), na ativação de zimogênios, na hidrólise de proteínas inativas, na bacteriólise (RUDENSKAYA et al., 1998), e no desenvolvimento dos frutos (BRADY, 1987). Muitas cisteíno-proteases têm sido isoladas de vegetais como *Carica papaya* (papaína), *Ficus glabrata*, *Fícus carica*, dentre outras. Algumas aspartilproteases também estão envolvidas na germinação das sementes. Normalmente, elas são heterodímeros com massa molecular aproximada de 42 kDa e, geralmente, são sintetizadas como zimogênios (SIMÕES, FARO, 2004).

Muitas enzimas vegetais podem apresentar ação proteolítica sobre o fibrinogênio. Dentre as fibrinogenases isoladas de látex de plantas destacam-se

às pertencentes às espécies *Calotropis gigantea* (ABRAHAM, JOSHI, 1979; PAL, SINHA, 1980), *Synadenium grantii* (MENON et al., 2002; RAJESH et al., 2006) e *Euphorbia milii* (FONSECA et al., 2010).

As proteases representam cerca de 60% do total da venda mundial de enzimas (MORCELLE**,** CAFFINI, PRIOLO, 2004). Portanto, o isolamento e o estudo destas biomoléculas torna-se promissor, especialmente para o desenvolvimento de tecnologias que favoreçam o meio ambiente como o tratamento de couro e diversos processos de bioremediação, assim como a aplicação na indústria farmacêutica para fabricação de pomadas cicatrizantes e promoção de hidrólise de polipeptídeos em peptídeos menores e aminoácidos, facilitando a digestão e a absorção de proteínas (UHLIG, 1998).

A função de uma proteína está intrinsecamente relacionada à sua conformação estrutural nativa. Desta forma, o estudo da estabilidade de enzimas é importante para melhor elucidar os mecanismos de enovelamento, os quais são essenciais para a catálise enzimática.

7. ESTABILIDADE DE ENZIMAS

A síntese e o enovelamento de uma proteína são importantes para a sua função biológica. A molécula de DNA é transcrita em moléculas de RNA, que por sua vez são traduzidas em proteínas, que se enovelam para se tornar estrutural- e funcionalmente ativas.

A estrutura tridimensional de uma proteína é mantida por sua composição em aminoácidos da cadeia polipeptídica, pelas ligações não-covalentes como as pontes de hidrogênio e as interações hidrofóbicas e eletrostáticas, que quando somadas, contribuem significativamente para a estabilidade da biomolécula e, ainda, por ligações covalentes como as pontes de dissulfeto e as ligações peptídicas (NOSOH, SEKIGUCHI, 1990; BRANDEN, TOOZE, 1991). Mudanças pós-traducionais também são impotantes para manter a estabilidade enzimática.

As pontes de hidrogênio (PH) entre os átomos da cadeia polipeptídica substituem as PH entre esta e as moléculas de água, estabilizando a proteína (NELSON, COX, 2002). A interação hidrofóbica é responsável pela repulsão entre

as cadeias laterais apolares dos aminoácidos e as moléculas de água. Portanto, em meio aquoso, a cadeia polipeptídica se enovela de forma que essas cadeias laterais hidrofóbicas não interajam com a água (NOSOH, SEKIGUCHI, 1990).

Alguns aminoácidos polares, especialmente aqueles classificados como básicos e ácidos, apresentam cadeias laterais com cargas positivas e negativas, respectivamente. Cargas elétricas isoladas ou que formem pares de repulsão tendem a tornar uma proteína instável e, conseqüentemente, propensa a sofrer desenovelamento. Por outro lado, quando as cargas elétricas de sinal contrário estão próximas, isso aumenta a estabilidade de uma proteína (NOSOH, SEKIGUCHI, 1990). As ligações dissulfeto favorecem a rigidez natural da molécula protéica (NOSOH, SEKIGUCHI, 1990; BRANDEN, TOOZE, 1991).

A partir de 1980, estudos teóricos e experimentais resultaram em avanços revolucionários no entendimento de processos e princípios do enovelamento de proteínas. A incapacidade de alcançar ou manter a estrutura protéica enovelada corretamente pode estar relacionada a algumas doenças, as quais estão ganhando destaque nas indústrias farmacêuticas (ALBERCH, PEREZ-NAVARRO, CANALS, 2004; JOHNSTON, BROTCHIE, 2004; SELLAL et al., 2005). A demência de Alzheimer, a doença de Parkinson, a encefalopatia espongiforme e a esclerose lateral amiotrófica são exemplos de doenças relacionadas à agregação e enovelamento anormais de proteínas (KELLY, 1998; LOMAS, CARRELL, 2002; STEFANI, DOBSON, 2003; STEFANI, 2004), embora ainda não se saiba se a agregação é causa ou conseqüência da morte associada a tais doenças. Algumas drogas visam a inibição da agregação (ZIMMERMANN et al., 2005) ou proteção, impedindo a morte celular (SPONNE et al., 2004).

A literatura relata vários estudos sobre a estabilidade enzimática e suas aplicações práticas (SHAW, BOTT, 1996; ILLANES, 1999; POLIZZI et al., 2007).

A estabilidade termodinâmica da proteína é essencial para preservação de sua atividade catalítica e da operacionalização de seu uso contínuo como biocatalisadores (ILLANES, 1999), normalmente em formas imobilizadas (MIYAWAKI et al., 2008).

O processo de desnaturação vem sendo utilizado como ferramenta no estudo das propriedades e do mecanismo de enovelamento de proteínas (TANFORD, KAWAHARA, LAPANJE, 1966; GREENE, PACE, 1974; SHORTLE,

1996; FERSHT, 1999; CAMILLONI et al., 2008), principalmente pelo uso de agentes caotrópicos, os quais contribuem para a elucidação dos mecanismos determinantes da estabilidade enzimática.

8. AGENTES CAOTRÓPICOS

Os mecanismos determinantes do enovelamento e da estabilidade de uma proteína são comumente analisados usando equilíbrio químico, curvas de desnaturação e renaturação combinadas com cinéticas de desenovelamento e renovelamento (FERSHT, 1999). As medidas experimentais quantificadas são as mudanças na energia livre de Gibbs para a transição estrutural (TE), consistindo na diferença energética (ΔG) entre os estados enovelado, intermediário e desenovelado e a dependência da TE com o desnaturante (MYERS, PACE, SCHOLTZ, 1995).

Agentes caotrópicos como uréia e hidrocloreto de guanidina são utilizados em análises experimentais de desenovelamento, pois desestabilizam e desorganizam a estrutura protéica, tornando-a mais suscetível à desnaturação (TANFORD, 1962; ANJUM, RISCHI, AHMAD, 2000).

Existem algumas possíveis explicações para o efeito caotrópico da uréia, fundamentadas na redução do efeito hidrofóbico (BRESLOW, GUO, 1990) ou na diminuição do custo energético envolvido na formação da camada de hidratação ao redor da proteína desenovelada, favorecendo o deslocamento de moléculas de água para aquela camada (NOZAKI, TANFORD, 1963; TSAI, GERSTEIN, LEVITT, 1996).

Acredita-se ainda que a uréia induza a formação de cavidades (clatratos) delimitadas por moléculas de água organizadas no próprio solvente. Portanto, peptídeos, polipeptídeos e proteínas poderiam se encaixar nessas cavidades, com custo energético menor do que aquele que seria decorrente da formação de uma camada de hidratação ao redor deles (TSAI, GERSTEIN, LEVITT, 1996).

Cabe ressaltar que o efeito de caotrópicos não é sempre deletério. Determinados organismos utilizam a uréia em vários processos biológicos, como no processo de hibernação. Neste período, em que o metabolismo encontra-se

reduzido, ocorre retenção hídrica e inativação enzimática (YANCEY et al., 1982; YANCEY, 2004).

Embora existam várias teorias que tentam elucidar os processos envolvidos na estabilização de enzimas, ainda não há uma unificação de idéias e diversos estudos acerca deste assunto continuam sendo realizados por pesquisadores de todo o mundo (SCHELLMAN, 2002).

9. OSMÓLITOS

A maioria das células não suporta condições ambientais e fisiológicas extremas como a alta concentração de sal e elevações ou diminuições bruscas de temperatura.

O acúmulo intracelular de solutos como estratégia de proteção e adaptação à osmolaridade elevada foi adotada por microrganismos, plantas, animais e humanos (RHODES, HANSON, 1993; GALINSKI, TRÜPER, 1994; BURG, KWON, KÜLTZ, 1997; DA COSTA, SANTOS, GALINSKI, 1998; ROBERTS, 2000; HOHMANN, 2002), possibilitando a sobrevivência sob estresse osmótico, pois estes solutos aumentam a pressão osmótica do meio intracelular (ARAKAWA et al., 2006).

Além disso, algumas classes de compostos são usadas universalmente pelos diferentes reinos da natureza, refletindo contrastes fundamentais nos tipos de solutos que são compatíveis com as funções macromoleculares e celulares (DA COSTA, SANTOS, GALINSKI, 1998; SINGH et al., 2009).

Existem dois mecanismos de ação dos osmólitos. No primeiro, em que o mecanismo é direto, a proteína é estabilizada pelos próprios osmólitos. No segundo, em que a ação é indireta, os osmólitos estabilizam chaperonas, as quais participam no enovelamento protéico celular. As chaperonas também são conhecidas como proteínas de choque térmico (‘heat shock proteins’), podendo atuar no processo de reenovelamento de proteínas que se desnaturaram parcialmente devido à altas temperaturas (ARAKAWA et al., 2006).

Os aminoácidos (glicina, prolina e taurina), álcoois poliidroxílicos (glicerol e sorbitol) e os açúcares (sacarose e trealose) são conhecidos como osmólitos

soluto-compatíveis, pois agem como estabilizadores de proteínas, não alterando a função protéica, mesmo em concentrações elevadas (BOWLUS, SOMERO, 1979).

As metilaminas óxido de trimetilamina (TMAO), betaína e sarcosina protegem as proteínas intracelulares contra os efeitos caotrópicos da uréia, sendo denominadas de osmólitos neutralizadores (YANCEY, SOMERO, 1979).

Em determinadas situações, quando o processo de desnaturação é reversível, os estados nativo e desnaturado de uma proteína estão em equilíbrio. Assim, uma alteração na estabilidade, que é inversamente proporcional ao conteúdo energético, afeta o equilíbrio entre estes estados. Normalmente, a interação entre a proteína e o osmólito é desfavorável e este soluto preferencialmente excluído da superfície daquela macromolécula, levando à formação de uma camada de hidratação constituída por moléculas de água altamente organizadas, que possuem pouca mobilidade quando comparadas às moléculas de água do solvente. A energia envolvida na organização das moléculas de água e, portanto, na manutenção da camada de hidratação eleva-se de acordo com a extensão da mesma (TIMASHEFF, 2002; TIMASHEFF, ARAKAWA, 1989). Os osmólitos atuam tanto sobre o estado nativo quanto sobre o desnaturado. Entretanto, a superfície da proteína exposta ao solvente é maior no estado desnaturado (mais estendido) do que no estado nativo (mais compacto), envolvendo um maior conteúdo de energia livre por mol de proteína (potencial químico) na molécula desnaturada, justamente por apresentar a camada de hidratação mais extensa. Por fim, o potencial químico do estado desnaturado será maior do que do estado nativo, favorecendo o deslocamento do equilíbrio em direção ao estado nativo, que desta forma é estabilizado (GEKKO, TIMASHEFF, 1981; BOLEN, BASKAKOV, 2001). Este seria o mecanismo de ação dos osmólitos, também denominado de efeito solvofóbico.

A concentração de cada osmólito é fator predominante para desencadear a ação protetora. A enzima malato desidrogenase é protegida da desnaturação a 44 ^{o}C por concentrações fisiológicas de betaína, trealose, prolina ou glicerol. Estes solutos promovem uma diminuição dos movimentos de grupos da proteína mesmo em temperaturas elevadas o suficiente para promover sua agregação e desnaturação (DIAMANT et al., 2001). Contrariamente, concentrações de glicerol

acima de 4 $mol.L^{-1}$ não afetam a atividade da glicose-6-fosfato-desidrogenase (BOROWITZKA, BROWN, 1974; ARAKAWA et al., 2006).

A utilização de sacarose ou trealose a 1,5 $mol.L^{-1}$ eleva a temperatura intermediária da transição de desnaturação térmica, também chamada de temperatura de fusão ('melting temperature' ou T_m) da lisozima TAP2. A T_m corresponde à temperatura intermediaria de transição entre os estados nativo e desenovelado (VIANA, GARROTE-FILHO, PENHA-SILVA, 2005). De forma análoga, a ribonuclease A, o citocromo C e a mioglobina também apresentam aumento da temperatura de transição térmica na presença de alguns osmólitos. No entanto, o ΔG (variação de energia livre) de desnaturação destas enzimas não sofre alterações a 25 ^{o}C na presença destes solutos, contribuindo para não alteração do turnover destas biomoléculas (ANJUM, RISHI, AHMAD, 2000).

A análise e a compreensão da intrínseca relação entre a estrutura e a função de uma enzima sob diferentes circunstâncias de desnaturação, assim como estudos que forneçam introspecções na base molecular da estabilidade destas biomoléculas torna-se de suma importância do ponto de vista comercial, industrial, terapêutico e biotecnológico.

10. REFERÊNCIAS

ABRAHAM, K.I.; JOSHI, P. N. Studies on proteinases from *Calotropis gigantea* latex. Purification and some properties of two proteinases containing carbohydrates. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 568, p. 111–119, 1979.

ALBERCH, J.; PEREZ-NAVARRO, E.; CANALS, J. M. Neurotrophic factors in Huntington's disease. **Progress in Brain Research**, v. 146, p. 195–229, 2004.

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.

ANGULO, Y.; LOMONTE, B. Biochemistry and toxicology of toxins purified from the venom of the snake *Bothrops asper*. **Toxicon**, v. 54, p. 949–957, 2009.

ANJUM, F.; RISHI, V.; AHMAD, F. Compatibility of osmolytes with Gibbs energy of stabilization of proteins. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1476, p. 75-84, 2000.

ARAKAWA, T.; EJIMA, D.; KITA, Y.; TSUMOTO, K. Small molecule pharmacological chaperones: From thermodynamic stabilization to pharmaceutical drugs. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1764, p. 1677–1687, 2006.

ARIËNS, R. A. S.; LAI, T. S.; WEISEL, J. W.; GREENBERG, C. S.; GRANT, P. J. Role of factor XIII in fibrin clot formation and effects on genetic polymorphisms. **Blood**, v. 100, p. 743-754, 2002.

ARIMA, K.; UCHIKOBA, T.; YONEZAWA, H.; SHIMADA, M.; KANEDA, M., Isolation and characterization of a serine protease from the sprouts of *Pleioblastus hindsii* Nakai. **Phytochemistry**, v. 54, p. 559-565, 2000a.

ARROYO, O.; ROJAS, G.; GUTIÉRREZ, J. M. Envenenamiento por mordedura de serpiente en Costa Rica en 1996: epidemiología y consideraciones clínicas. **Acta Médica Costarricense**, v. 41, p. 23–29, 1999.

BARRAVIEIRA, B. Acidentes por serpentes dos gêneros *Bothrops, Lachesis* e *Micrurus.* **Arquivos Brasileiros de Medicina**, v. 65, p. 345-35, 1991.

BARROS, L. C.; FERREIRA JR., R. S.; BARRAVIERA, S. R. C. S., STOLF, H. O., THOMAZINI-SANTOS, I. A.; MENDES-GIANNINI, M. J. S.; TOSCANO, E.; BARRAVIERA, B. A new fibrin sealant from Crotalus durissus terrificus venom: applications in medicine. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B,** v. 12, p. 553-571, 2009.

BHATNAGAR, V. P.; ANIL, K.; SRIVASTAVA, J. N. Wild medicinal herbs of Agra. **Journal of Medicinal and Aromatic Plant Sciences**, v. 22, p. 464- 467, 2000.

BLANN, A.D.; LANDRAY, M.J.; LIP, G.Y. ABC of antithrombotic therapy: an overview of antithrombotic therapy. **British Medical Journal (Clinical Research ed.)**, v. 325, p. 762–765, 2002.

BOLAÑOS, R. Las serpientes venenosas de Centroamérica y el problema del ofidismo. Primera parte. Aspectos zoológicos, epidemiológicos y biomédicos. **Revista Costarricense de Ciências Médicas**, v. 3, p. 165–184, 1982.

BOLEN, D. W.; BASKAKOV, I. V. The osmophobic effect: natural selection of a thermodynamic force in protein folding. **Journal of Molecular Biology**, v. 310, p. 955-963, 2001.

BOON, G. D. An overview of hemostasis. **Toxicologic Pathology**, v. 21, p. 170-179, 1993.

BOROWITZKA, L. J.; BROWN, A. D. The salt relations of marine and halophilic species of the unicellular green alga, *Dunaliella*. The role of glycerol as a compatible solute. **Archives of Microbiology**, v. 96. p. 37–52, 1974.

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**, v. 40, p. 1307–1312, 2002.

BOWLUS, R. D.; SOMERO, G. N. Solute compatibility with enzyme function and structure rationales for the selection of osmotic agents and endproducts of anaerobic metabolism in marine invertebrates. **The Journal of Experimental Zoology**, v. 288, p. 137–151, 1979.

BRADY, C.J. Fruit ripening. **Annual Review of Plant Physiology**, v. 38, p. 155–178, 1987.

BRANDEN, C.; TOOZE, J. Prediction, enginneering, and design of protein structures. In: _____. **Introduction to Protein Structure.** Nova York e Londres: Garland Publisching, 1991, p. 247-266.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Manual de Diagnóstico e Tratamento de Acidentes por Animais Peçonhentos.** Fundação Nacional de Saúde, 2001.

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

BRESLOW, R.; GUO, T. Surface tension measurements show that chaotropic salting-in denaturants are not just water-structure breakers. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 87, p. 167-169, 1990.

BURG, M.; KWON, E.; KÜLTZ, D. Regulation of gene expression by hypertonicity. **Annual Review of Physiology**, v. 59, p. 437–455, 1997.

BURKHART, W.; SMITH, G. F. H.; SU, J. L; PARIKH, I.; LEVINE III, H. Amino acid sequence determination of ancrod, the thrombin-like fibrinogenase from the venom of *Agkistrodon rhodostoma*. **FEBS Letters**, v. 297, p.297-301, 1992.

CAMILLONI, C.; GUERINI ROCCO, A.; EBERINI, I.; GIANAZZA, E.; BROGLIA, R. A.; TIANA, G. Urea and Guanidinium Chloride Denature Protein L in Different Ways in Molecular Dynamics Simulations. **Biophysical Journal**, v. 94, p. 4654–4661, 2008.

CHACUR, M.; PICOLO, G.; TEIXEIRA, C. F. P.; CURY, Y. Bradykinin is involved in hyperalgesia induced by *Bothrops jararaca* venom. **Toxicon**, v. 40, p. 1047–1051, 2002.

COLLEN D. The plasminogen (fibrinolytic) system. **Thrombosis and Haemostasis**, v. 82, p. 259-270, 1999.

COSTA, F. L. S.; RODRIGUES, R. S.; IZIDORO, L. F. M.; MENALDO, D. L.; HAMAGUCHI, A.; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I.; FULY, A. L.; SOARES, S. G.; SELISTRE-DE-ARAÚJO, H. S.; BARRAVIERA, B.; SOARES, A. M.;; RODRIGUES, V. M. Biochemical and Functional Characterization of a Thrombin-like enzyme isolated from *Bothrops pauloensis* snake venom. **Toxicon**, v. 54, p. 725-735, 2009.

COSTA, J. O.; FONSECA, K. C.; MAMEDE, C. C. N.; BELETTI, M. E.; SANTOS-FILHO, N. A.; SOARES, A. M.; ARANTES, E. C.; HIRAYAMA, S. N. S.; SELISTRE-DE-ARAÚJO, H. S.; FONSECA, F.; HENRIQUE-SILVA, F.; PENHA-SILVA, N.; OLIVEIRA, F. Bhalternin: Functional and Structural Characterization of a new Thrombin-like enzyme from *Bothrops alternatus* snake venom. **Toxicon**, v. 55, p. 1365-1377, 2010.

DA COSTA, M. S.; SANTOS, H.; GALINSKI, E. A. An overview of the role and diversity of compatible solutes in Bacteria and Archaea. **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**, v. 61, p. 117–153, 1998.

DAVIE, E. W. A brief historical review of the waterfall/cascade of blood coagulation. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 278, p. 50819-50832, 2003.

DENG, Z.; WANG, S.; LI, QI.; JI, X.; ZHANG, L.; HONG, M. Purification and characterization of a novel fibrinolytic enzyme from the polychaete, *Neanthes japonica* (Iznka). **Bioresource Technology**, v. 101, p. 1954–1960, 2010.

DIAMANT, S.; ELIAHU, N.; ROSENTHAL, D.; GOLOUBINOFF, P. Chemical chaperones regulate molecular chaperones *in vitro* and in cells under combined salt and heat stresses. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 276, p. 39586–39591, 2001.

DOMINGOS, A.; CARDOSO, P. C.; ZHONG-TIAN, X.; CLEMENTE, A.; BRODELIUS, P. E.; PAIS, M. S. Purification, cloning and autoproteolytic

processing of an aspartic proteinase from *Centaurea calcitrapa*. **European Journal of Biochemistry**, v. 267, p. 6824-6831, 2000.

FERSHT, A. **Structure and Mechanism in Protein Science: a Guide to Enzyme Catalysis and Protein Folding.** New York: W. H. Freeman, 1999.

FONSECA, K. C.; MORAIS, N. C. G.; QUEIROZ, M. R.; SILVA, M. C.; GOMES, M. S.; COSTA, J. O.; MAMEDE, C. C. N.; TORRES, F. S.; PENHA-SILVA, N.; BELETTI, M. E.; CANABRAVA, H. A. N.; OLIVEIRA, F. Purification and biochemical characterization of Eumiliin from *Euphorbia milii* var. *hislopii* latex. **Phytochemistry**, v. 71, p. 708-715, 2010.

FOX, J. W.; SERRANO, S. M. T. Structural considerations of the snake venom metalloproteinases, key members of the M12 reprolysin family of metalloproteinases. **Toxicon**, v. 45, p. 969-985, 2005.

FRANCO, R. F. Fisiologia da coagulação, anticoagulação e fibrinólise. Medicina, Ribeirão Preto. **Simpósio Hemostasia e Trombose**, v. 34, p. 229-237, 2001.

GALINSKI, E. A.; TRÜPER, H. G. Microbial behavior in salt-stressed ecosystems. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 15, p. 95–108, 1994.

GARCIA, L. T.; PARREIRAS e SILVA, L. T.; RAMOS, O. H.; CARMONA; A. K.; BERSANETTI, P. A.; SELISTRE-DE-ARAUJO, H. S. The effect of post-translational modifications on the hemorrhagic activity of snake venom metalloproteinases. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 138, p. 23–32, 2004.

GEKKO, K.; TIMASHEFF, S. N. Mechanism of protein stabilization by glycerol: preferential hydration in glycerol-water mixtures. **Biochemistry**, v. 20, p. 4667-4676, 1981.

GONÇALVES, L. R. C.; MARIANO, M. Local haemorrhage induced by *Bothrops jararaca* venom: relationship to neurogenic inflammation**. Mediators of Inflammation**, v. 9, p. 101–107, 2000.

GREENE, R. F.; PACE, C. N. Urea and guanidine hydrochloride denaturation of ribonuclease, lysozyme, a-chymotrypsin, and b-lactoglobulin. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 249, p. 5388–5394, 1974.

GUTIÉRREZ, J. M.; OWNBY, C. L.; ODELL, G. V. Pathogenesis of myonecrosis induced by crude venom and a myotoxin of *Bothrops asper*. **Experimental and Molecular Pathology,** v. 40, p. 367–379, 1984a.

GUTIÉRREZ, J. M.; ROMERO, M.; DÍAZ, C.; BORKOW, G.; OVADIA, M. Isolation and characterization of a metalloproteinase with weak hemorrhagic activity from the venom of the snake *Bothrops asper* (terciopelo). **Toxicon**, v. 33, p. 19–29, 1995.

GUTIÉRREZ, J. M.; LOMONTE, B. Efectos locales en el envenenamiento ofídico en América Latina. In: Cardoso, J. L. C., França, F. O. S., Wen, F. H., Málaque, C. M. S., Haddad, V. (Eds.). **Animais Peçonhentos no Brasil: Biologia, Clínica e Terapêutica dos Acidentes.** Sarvier: São Paulo, 2003, p. 310–323.

GUTIÉRREZ, J. M.; RUCAVADO, A.; CHAVES, F.; DÍAZ, C.; ESCALANTE, T.; Experimental pathology of local tissue damage induced by *Bothrops asper* snake venom. **Toxicon**, v. 54, p. 958–975, 2009.

HECKER, E. Co-carcinogenic principles from seed oil of *Croton tiglium* and other Euphorbiaceae. **Cancer Research**, v. 28, p. 2338- 2349, 1968.

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. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 308, p. 182–191, 1994.

HOHMANN, S. Osmotic adaptation in yeast—control of the yeast osmolyte system. **International Review of Cytology**, v. 215, p. 149–187, 2002.

ILLANES A. Stability of biocatalysts. **Electronic Journal of Biotechnology: EJB**, v. 2, p. 1–8, 1999.

IWASAKI, A.; SHIEH, T. C.; SHIMOHIGASHI, Y.; WAKI, M.; KIHARA, H.; OHNO, M. Purification and characterization of a coagulant enzyme, okinaxobin I, from the venom of *Trimeresurus okinavensis* (Himehabu snake) wich releases fibrinopeptide B. **Journal of Biochemistry**, v.108, p. 822-828, 1990.

JAIN, S. K. **Medicinal Plants**. 6.ed. National Book Trust, New Delhi, India, 1996.

JIMÉNEZ-PORRAS, J. M. Biochemistry of snake venoms. **Clinical Toxicology**, v. 3, p. 389–431, 1970.

JOHNSTON, T. H.; BROTCHIE, J. M. Drugs in development for Parkinson's disease. **Current Opinion in Investigational Drugs**, v. 5, p. 720–726, 2004.

JURBERG, P.; CABRAL NETO, J. B.; SCHALL, V. T. Molluscicide activity of the 'avelós' plant (*Euphorbia tirucalli*, L.) on *Biomphalaria glabrata*, the mollusk vector of schistosomiasis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 80, p. 423-427, 1985.

KELLY, J. W. The alternative conformations of amyloidogenic proteins and their multi-step assembly pathways. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 8, p. 101–106, 1998.

KEMBHAVI, A. A.; BUTTLE, D. J.; KNIGHT, C. G.; BARRETT, A. J. The two cysteine endopeptidases of legume seeds: purification and characterization by use of specific fluorometric assays. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 303, p. 208-213, 1993.

KOCHVA, E.; ORON, U.; OVADIA, M.; SIMON, T.; BDOLAH, A. **Venom glands, venom synthesis, venom secretion and evolution.** In: Natural Toxins Eaker, D. and T. Wadstrom, editors. eds. Pergamon Press: New York, 1980, p. 3–12.

KORNALIK, F. The influence of snake venom enzymes on blood coagulation **Pharmacology & Therapeutics**, v. 29, p. 353-405, 1985.

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, p. 55–62, 2002.

LESK, A. M.; FORDHAM, W. D. Conservation and variability in the structures of serine proteinases of the chymotrypsin family. **Journal Molecular Biology**, v. 258, p. 501-537, 1996.

LIGGIERI, C., ARRIBÉRE, M.C., TREJO, S.A., CANALS, F., AVILÉS, F.X., PRIOLO, N. Purification and biochemical characterization of asclepain c I from the latex *Asclepias curassavica L*. **Journal of Protein Chemistry**, v. 23**,** p. 403–411, 2004.

LIRIO, L. G.; HERMANO, M. L.; FONTANILLA, M. Q. Antibacterial activity of medicinal plants from the Philippines. **Pharmaceutical Biology**, v. 36, p. 357-359, 1998.

LOMAS, D. A.; CARRELL, R. W. Serpinopathies and the conformational dementias. **Nature Reviews Genetics**, v. 3, p. 759–768, 2002.

LU, O.; CLEMETSON, J. M. Snake venoms and hemostasis. **Journal of Thrombosis and Haemostasis: JTH**, v. 8, p. 1791–1799, 2005.

LYNN, K. R.; CLEVATTE-RADFORD, N. Ficin E, a serine-centred protease from *Ficus elastica.* **Phytochemistry**, v. 25, p. 1559-1561, 1986a.

LYNN, K. R.; CLEVATTE-RADFORD, N. A. Hevains: Serine-centred proteases from the latex of *Hevea brasiliensis*. **Phytochemistry**, v. 25, p. 2279-2282, 1986b.

LYNN, K. R.; CLEVATTE-RADFORD, N. A. Biochemical properties of latices from the Euphorbiaceae. **Phytochemistry**, v. 26, p. 939-944, 1987.

MACKESSY, S. P.; BAXTER, L. M. Bioweapons synthesis and storage: the venom gland of front-fanged snakes. **Zoologischer Anzeiger**, v. 245, p. 147–159, 2006.

MAGALHÃES, A.; MAGALHÃES, H. P.; RICHARDSON, M.; GONTIJO, S.; FERREIRA, R. N.; ALMEIDA, A. P.; SANCHES, E. F. Purification and properties of a coagulant thrombin-like enzyme from the venom of *Bothrops leucurus*. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 146, p. 565-575, 2007.

MARKLAND, F.S.; DAMUS, P.S. Purification and properties of a thrombin-like enzyme from the venom of *Crotalus adamanteus* (Eastern diamondback rattlesnake). **The Journal of Biological Chemistry**, v. 246, p. 6460-6470, 1971.

MARKLAND JR, F. S. Inventory of α and β fibrinogenases from snake venoms. **Journal of Thrombosis and Haemostasis: JTH**, v. 65, p. 438–443, 1991.

MARKLAND, F. S. Snake venom fibrinogenolytic and fibrinolytic enzymes: an update inventory. **Journal of Thrombosis and Haemostasis: JTH**, v. 79, p. 668–674, 1998.

MARSH, N. A. Snake venoms affecting the haemostatic mechanism. **Blood Coagulation & Fibrinolysis: an International Journal in Haemostasis and Thrombosis**, v. 5, p. 399–410, 1994.

MARSH, N. A.; WILLIAMS, V. Practical applications of snake venom toxins in haemostasis. **Toxicon**, v. 45, p. 1171–1181, 2005.

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

MATSUI, T.; HAMAKO, J.; TITANI, K. Structure and function of snake venom proteins affecting platelet plug formation. **Toxins**, v. 2, p. 10-23, 2010.

MELGAREJO, A. F. Serpentes Peçonhentas do Brasil. In: Cardoso J.L.C., França F.O.S., Wen F.H., Málque C.M.S & Haddad Jr V. (ed.) **Animais Peçonhentos no Brasil: Biologia, Clínica e Terapêutica dos Acidentes.** Sarvier: São Paulo, 2003, p. 33-61.

MENON, M.; VITHAYATHIL, P. J.; RAJU, S, M.; RAMADOSS, C. S. Isolation and characterization of proteolytic enzymes from the latex of *Synadenium grantii* Hook, ‘f’. **Plant Science**, v. 163, p. 131–139, 2002.

MIYAWAKI, O.; MA, GE-LI; HORIE, T.; HIBI, A.; ISHIKAWA, T.; KIMURA, S. Thermodynamic, kinetic, and operational stabilities of yeast alcohol dehydrogenase in sugar and compatible osmolyte solutions. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 43, p. 495–499, 2008.

MORCELLE**,** S. R.; CAFFINI, N. O.; PRIOLO, N. Proteolytic properties of *Funastrum clausum* Látex. **Fitoterapia**, v. 75, p. 480–493, 2004.

MOURA-DA-SILVA, A. M.; LAING, G. D.; PAINE, M. J.; DENNISON, J. M.; POLITI, V.; CRAMPTON, J. M.; THEAKSTON, R. D. Processing of pro-tumor necrosis factor-alpha by venom metalloproteinases: a hypothesis explaining local tissue damage following snake bite. **European Journal of Immunology**, v. 26, p. 2000–2005, 1996.

MOURA-DA-SILVA, A. M.; BUTERA, D.; TANJONI, I. Importance of snake venom metalloproteinases in cell biology: effects on platelets, inflammatory and endothelial cells. **Current Pharmaceutical Design**, v. 13, p. 2893–2905, 2007.

MYERS, J.K., PACE, C. N., SCHOLTZ, J. M. Denaturant m values and heat capacity changes: relation to changes in accessible surface areas of protein unfolding. **Protein Science: a Publication of the Protein Society**, v. 4, p. 2138–2148, 1995.

NELSON, D. L.; COX, M. M. Lehninger: **Princípios de Bioquímica.** 3. ed. São Paulo: Sarvier, 2002.

NISHIDA, S.; FUJIMURA, Y.; MIURA, S.; OZAKI, Y.; USAMI, Y.; SUZUKI, M.; TITANI, K.; YOSHIDA, E.; SUGIMOTO, M.; YOSHIOKA, A.; FUKUI, H. Purification and characterization of Bothrombin, a fibrinogen-clotting serine protease from the venom of *Bothrops jararaca*. **Biochemistry**, v. 33, p. 1843-1849, 1994.

NOSOH, Y.; SEKIGUCHI, T. Protein engineering thermostability. **Tibtech**, v. 8, p. 16-20, 1990.

NOZAKI, Y.; TANFORD, C. The solubility of amino acids and related compunds in aqueous urea solutions. **Journal of Biological Chemistry**, v. 238, p. 4074- 4081, 1963.

OLIVEIRA, F.; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I. **Processo de purificação e uso da enzima anticoagulante e trombolítica Bthtl proveniente de peçonha da serpente *Bothrops moojeni*.** Patente: Privilégio de Inovação. n. PI0406273-6. 23 dez. 2004.

OTERO, R.; GUTIÉRREZ, J.; MESA, M. B.; DUQUE, E.; RODRÍGUEZ, O.; ARANGO, J. L.; GÓMEZ, F.; TORO, A.; CANO, F.; RODRÍGUEZ, L. M.; CARO, E.; MARTÍNEZ, J.; CORNEJO, W.; GÓMEZ, L. M.; URIBE, F. L.; CÁRDENAS, S. NÚÑEZ, V.; DÍAZ, A. Complications of *Bothrops*, *Porthidium* and *Bothriechis* snakebites in Colombia: a clinical and epidemiological study of 39 cases attended in a university hospital. **Toxicon**, v. 40, p. 1107–1114, 2002.

OWNBY, C. L.; BJARNASON, J. B.; TU, A. T. Hemorrhagic toxins from rattlesnake *(Crotalus atrox)* venom. Pathogenesis of hemorrhage induced by three purified toxins. **The American Journal of Pathology**, v. 93, p. 201–218, 1978.

PACIARONI, M.; CASO, V.; AGNELLI, G. The concept of ischemic penumbra in acute stroke and therapeutic opportunities. **European Neurology**, v. 61, p. 321–330, 2009.

PAL, G.; SINHA, N. K. Isolation, crystallization and properties of Calotropis DI and DII from *Calotropis gigentea*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 202, p. 321–329, 1980.

PERALES, J.; AMORIM, C. Z.; ROCHA, S. L.; DOMONT, G. B.; MOUSSATCHE, H. Neutralization of the oedematogenic activity of *Bothrops jararaca* venom on the mouse paw by an antibothropic fraction isolated from opossum (*Didelphis marsupialis*) serum. **Agents Actions**, v. 37, p. 250–259, 1992.

PINHO, F. M. O.; OLIVEIRA, E. S.; FALEIROS, F. Acidente ofídico no Estado de Goiás. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 50, p. 93-96, 2004.

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

PIRKLE, H.; THEODOR, I.; LOPEZ, R. Catroxobin, a weakly thrombin-like enzyme from the venom of *Crotalus atrox.* NH2-terminal and active site amino acid sequences. **Thrombosis Research**, v. 56, p. 159–68, 1989.

PIRKLE, H. Thrombin-like enzymes from snake venoms: an updated inventory. **Thrombosis and Haemostasis**, v. 79, p. 675-683, 1998.

POLIZZI K. M.; BOMMARIUS, A. S.; BROERING J. M.; CHAPARRO-RIGGERS, J. F. Stability of biocatalysts. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 11, p. 220-225, 2007.

RAJESH, R.; NATARAJU, A.; GOWDA, C.D.R.; FREY, B.M.; FREY, F.J.; VISHWANATH, B.S. Purification and characterization of a 34-kDa, heat stable glycoprotein from *Synadenium grantii* latex: action on human fibrinogen and fibrin clot. **Biochimie**, v. 88, p. 1313–1322, 2006.

RAMOS, O. H. P.; CARMONA, A. K.; SELISTRE-DE-ARAUJO, H. S. Expression, refolding, and *in vitro* activation of a recombinant snake venom pro-metalloprotease. **Protein Expression and Purification**, v. 28, p. 34–41, 2003.

RAMOS, O. H. P.; SELISTRE-DE-ARAUJO, H. S. Comparative analysis of the catalytic domain of hemorrhagic and non-hemorrhagic snake venom metallopeptidases using bioinformatic tools. **Toxicon**, v. 44, p. 529-538, 2004.

REZENDE, J. R.; RODRIGUES, S. B.; JABOR, I. A. S. PAMPHILE, J.A., ROCHA, C.L.M.S.C. Efeito antimutagênico do látex de *Euphorbia tirucalli* no sistema metionina em *Aspergillus nidulans.* **Acta Scientiarum Biological Sciences**, v. 26, p. 481- 484, 2004.

RHODES, D.; HANSON, A. D. Quaternary ammonium and tertiary sulfonium compounds in higher plants. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 44, p. 357–384, 1993.

RICHTER, G.; HANS, P. S.; FRIEDRICH, D.; PETER, L. Activation and inactivation of human factor X by proteases derived from *Ficus carica*. **British Journal of Haematology**, v. 119, p. 1042–1051, 2002.

ROBERTS, M. F. Osmoadaptation and osmoregulation in Archae. **Frontiers in Bioscience: a Journal and Virtual Library**, v. 5, p. 796–812, 2000.

RUCAVADO, A.; ESCALANTE, T.; TEIXEIRA, C. F. P.; FERNANDES, C. M.; DÍAZ, C.; GUTIÉRREZ, J. M. Increments in cytokines and matrix Metalloproteinases in skeletal muscle after injection of tissue-damaging toxins from the venom of the snake *Bothrops asper*. **Mediators of Inflammation**, v. 11, p. 121–128, 2002.

RUDENSKAYA, G. N.; BOGACHEVA, A. M.; PREUSSER, A.; KUZNETSOVA, A. V.; DUNAEVSKY, Y. A. E.; GOLOVKIN, B. N.; STEPANOV, V. M. Taraxalisin- a serine proteinase from dandelion *Taraxacum officinale* Webb s.I. **FEBS letters**, v. 437, p. 237-240, 1998.

SAKAI, J.; ZHANG, S.; CHEN, H.; ATSUMI, F.; MATSUI, T; SHIONO, H.; SANADA, S.; OKADA, T. Primary structure of a thrombin-like serine protease, kangshunmei, from the venom of *Agkistrodon halys brevicaudus stejnegeri*. **Toxicon**, v. 48, p. 313-322, 2006.

SAMPAIO, T. S.; NOGUEIRA, P. C. L. Volatile components of mangaba fuit (*Hancornia speciosa*) at three stages of maturity. **Food Chemistry**, v. 95, p. 606-10, 2005.

SANCHEZ, E. E.; GALAN, J. A.; POWELL, R. L.; REYES, S. R.; SOTO, J. G.; RUSSELL,W. K.; RUSSELL, D. H.; PEREZ, J. C. Disintegrin, hemorrhagic, and proteolytic activities of Mohave rattlesnake, *Crotalus scutulatus scutulatus* venoms lacking Mojave toxin. **Comparative Biochemistry and Physiology,** v. 141, p. 124–132, 2005.

SANTORO, M. L.; SANO-MARTINS, I. S. Distúrbios hemostáticos em envenenamentos por animais peçonhentos no Brasil. In: Cardoso, J. L. C.; França, F. O.; Fan, H. W.; Málaque, C. M. S.; Haddad Jr., V. (Eds.). **Animais Peçonhentos no Brasil: Biologia, Clínica e Terapêutica dos Acidentes.** Sarvier: São Paulo, 2003, p. 289–309.

SCHALL, V. T.; VASCONCELLOS, M. C.; ROCHA, R. S.; SOUZA, C. P.; MENDES, N. M. The control of the scistosome-transmitting snails *Biomphalaria glabrata* by the plant molluscicide *Euphorbia splendense* var. *hislopii* (syn milii Des. Moul): a longitudinal field study in an endemic area in Brazil. **Acta Tropica**, v. 79, p. 165-170, 2001.

SCHELLMAN, J. A. Fifty years of solvent denaturation. **Biophysical Chemistry**, v. 96, p. 91-101, 2002.

SELLAL, F.; NIEOULLON, A.; MICHEL, G.; MICHEL, B. F.; LACOMBLEZ, L.; GREERTS, H.; DELINI-STULA, A.; BENTUE-FERRER, D.; BORDET, R.; ALLAIN, H. Pharmacology of Alzheimer's disease: where do we go from here? **Therapie**, v. 60, p. 89–107, 2005.

SERRANO, S. M. T.; MAROUN, R. C. Snake venom serine proteinases: sequence homology vs. substrate specificity, a paradox to be solved. **Toxicon**, v. 45, p. 1115-1132, 2005.

SHAW, A.; BOTT, R. Engineering enzymes for stability. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 6, p. 546–50, 1996.

SHIEH, T. C.; KAWABATA, S. I.; KIHARA, H.; OHNO, M.; IWANAGA, S. Amino acid sequence of a coagulant enzyme, flavoxobin, from *Trimeresurus flavoviridis* venom. **Journal of Biochemistry**, v. 103, p. 596-605, 1988.

SHIVELY, J.; PAXTON, R. J.; LEE, T. D. Highlights of protein structural analysis. **Trends in Biochemical Sciences,** v. 14, p. 246-252, 1989.

SHORTLE, D. The denatured state (the other half of the folding equation) and its role in protein stability. **The FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 10, p. 27–34, 1996.

SIIGUR, J.; SIIGUR, E. The direct acting fibrin(ogen)olytic enzymes from snake venoms. **Journal of Toxicology. Toxin Reviews**, v. 9, p. 91–113, 1992.

SILVA, J. R. A.; AMARAL, A. C. F.; SIANI, A. C.; REZENDE, C. M.; FELCMAN, J.; PINTO, A. C. Contribution to the study of *Himatanthus sucuuba*: latex macromolecule, microelements and carbohydrates. **Acta Amazonica**, v. 33, p. 105–110, 2003.

SILVA JR., F, P., DE-SIMONE, S. G. S1 subside in snake venom thrombin-like enzymes: can S1 subsite lipophilicity to used to sort binding affinities of trypsin-like enzymes to small-molecule inhibitors? **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 12, p. 2571-2587, 2004.

SIMÕES, I.; FARO, C. Structure and function of plant aspartic proteinases. **European Journal of Biochemistry / FEBS**, v. 271, p. 2067-2075, 2004.

SINGH, L. R.; DAR, T. A.; RAHMAN, S.; JAMAL, S.; AHMAD, F. Glycine betaine may have opposite effects on protein stability at high and low pH values. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1794, p. 929–935, 2009.

SINGLA, A.K.; PATHAK, K. Phytoconstituents of Euphorbia species. **Fitoterapia**, v. 61, p. 483-516, 1990.

SOUZA, C. A. M.; DE-CARVALHO, R. R.; KURIYAMA, S. N.; ARAUJO, I. B.; RODRIGUES, R. P.; VOLLMER, R. S.; ALVES, E. N.; PAUMGARTTEN, F. J. R. Study of the embryofeto-toxicity of crown of thorns (*Euphorbia milii*) latex, a natural molluscicide. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 30, p. 1325-1332, 1997.

SPONNE, I.; FIFRE, A.; KOZIEL, V.; KRIEM, B.; OSTER, T.; PILLOT, T. Humanin rescues cortical neurons from prion–peptide-induced apoptosis. **Molecular and Cellular Neurosciences**, v. 25, p. 95–102, 2004.

STEFANI, M.; DOBSON, C. M. Protein aggregation and aggregate toxicity: new insights into protein folding, misfolding diseases and biological evolution. **Journal of Molecular Medicine**, v. 81, p. 678–699, 2003.

STEFANI, M. Protein misfolding and aggregation: new examples in medicine and biology of the dark side of the protein world. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1739, p. 5–25, 2004.

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

SUBHASH C. Y., MONU P., JAGANNADHAM, M. V. Highly stable glycosylated serine protease from the medicinal plant *Euphorbia milii*. **Phytochemistry**, v. 67, p. 1414-1426, 2006.

SUBHASH, C. Y.; JAGANNADHAM, M. V. Physiological changes and molluscicidal effects of crude latex and Milin on *Biomphalaria glabrata*. **Chemosphere**, v. 71, p. 1295-1300, 2008.

SWENSON, S.; MARKLAND JR, F. S. Snake venom fibrin(ogen)olytic enzymes. **Toxicon**, v. 45, p. 1021-1039, 2005.

TAN, N. H. Isolation and characterization of the thrombin-like enzyme from *Cryptelytrops purpureomaculatus* venom. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 151, p. 131-136, 2010.

TANFORD, C. Contribution of hidrofobic interactions to the stability of the globular conformation of proteins. **Journal of the American Chemical Society**, v. 84, p. 4240-4247, 1962.

TANFORD, C.; KAWAHARA, K.; LAPANJE, S. Proteins in 6 M guanidine hydrochloride. Demonstration of random coil behaviour. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 241, p. 1921–1923, 1966.

TIMASHEFF, S. N.; ARAKAWA, T. Stabilization of protein structure by solvents. In: **Protein Structure: a practical approach**. Oxford: IRL Press, 1989, p. 331-345.

TIMASHEFF, S. N. Protein-solvent preferential interactions, protein hydration, and the modulation of biochemical reactions by solvent components. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99, p. 9721-9726, 2002.

TIWARI, S.; SINGH, P.; SINGH, A. Toxicity of *Euphorbia tirucalli* plant against freshwater target and non-target organisms. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, v. 6, p. 1423-1429, 2003.

TREBIEN, H.A., CALIXTO, J.B. Pharmacological evaluation of rat paw oedema induced by *Bothrops jararaca* venom. **Agents Actions**, v. 26, p. 292–300, 1989.

TREJO, S. A.; LÓPEZ, L. M.; CAFFINI, N. O.; NATALUCCI, C. L.; CANALS, F.; AVILÉS, F. .X. Sequencing and characterization of asclepain f: the first cysteine peptidase cDNA cloned and expressed from *Asclepias fruticosa* latex. **Planta**, v. 230, p. 319–328, 2009.

TSAI, J.; GERSTEIN, M.; LEVITT, M. Keeping the shape but changing the charges: A simulation study of urea and its iso-steric analogs. **The Journal of Chemical Physics**, v. 104, p. 9417-9430, 1996.

TU, A. T. **Venoms: Chemistry and Molecular Biology.** New York: John Wiley and Sons, 1977.

UHLIG, H. **Plant Proteases, Industrial Enzymes and Their Applications**. New York: John Wiley and Sons, Inc., 1998, p. 147-151.

VERSTRAETE, M.; VERMYLEN, J. Determinantes celulares, químicos e reológicos da trombose e fibrinólise. **Trombose**. São Paulo: Sarvier, 1989, p. 1-45.

VIANA, Y. A.; GARROTE-FILHO, M. S.; PENHA-SILVA, N. Estabilização de proteínas por osmólitos. **Bioscience Journal**, v. 21, p. 83-88, 2005.

VLIETINK, K. J. In: Hostettmann, K., Lea, P.J. (Eds.). **Biologically active substances from traditional drug Biologically active natural product.** Oxford Science Publications, Oxford, 1987.

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, p. 1133–1139, 2001.

WANG, M-C; PINS, G. D.; SILVER, F. H. Preparation of fibrin glue: the effects of calcium chloride and sodium chloride. **Materials Science and Engineezing C**, v. 3, p. 131-135, 1995.

WARRELL, D. A. Clinical toxicology of snakebite in Africa and the Middle East/Arabian Peninsula. In: Meier J, White J, eds. **Handbook of Clinical Toxicology of Animal Venoms and Poisons**. Boca Raton, FL: CRC Press, 1995, p. 433–492.

WARRELL, D. A. Epidemiology, clinical features and management of snake bites in Central and South America. In: Campbell J, Lama WW, eds. **Venomous**

reptiles of the western hemisphere. Ithaca: Cornell University Press, 2004, p. 709–61.

WARRELL, D. A. Snake bite. **The Lancet**, v. 375, p. 77–88, 2010.

WHITE, J. Snake venoms and coagulophaty. **Toxicon**, v. 45, p. 951 - 967, 2005.

WOLBERG, A. S. Thrombin generation and fibrin clot structure. **Blood Reviews**, v. 21, p. 131-142, 2007.

YAGAMI, T.; SATO, M.; NAKAMURA, A.; KOMIYAMA, T.; KITAGAWA, K.; AKASAWA, A.; IKEZAWA. Z. Plant defense-related enzymes as latex antigens. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 101, p. 379–385, 1998.

YANCEY, P. H.; SOMERO, G. N. Counteraction of urea destabilization of protein structure by methylamine osmoregulatory compounds of elasmobranch fishes. **The Biochemical Journal**, v. 183, p. 317–322, 1979.

YANCEY, P. H.; CLARK, M. E.; HAND, S. C.; BOWLUS, R. D.; SOMERO, G. N. Living with whater stress: evolution of osmolyte system. **Science**, v. 217, p. 1214-1222, 1982.

YANCEY, P. H. Compatible and counteracting solutes: protecting cells from the Dead Sea to the deep sea. **Science Progress**, v. 87, p. 1-24, 2004.

ZIMMERMANN, M.; BORRONI, B.; CATTABENI, F.; PADOVANI, F.; DI LUCA, M. Cholinesterase inhibitors influence APP metabolism in Alzheimer disease patients. **Neurobiology of disease**, v.19, p. 237–242, 2005.

Capítulo II

Bhalternin: Functional and structural characterization of a new thrombin-like enzyme from *Bothrops alternatus* snake venom

Bhalternin: functional and structural characterization of a new thrombin-like enzyme from *Bothrops alternatus* snake venom

Júnia de O. Costa[a,h]*, Kelly C. Fonseca[a], Carla C. Neves Mamede[b], Marcelo E. Beletti[b], Norival A. Santos-Filho[c], Andreimar M. Soares[d], Eliane C. Arantes[e], Sílvia N. S. Hirayama[f], Heloísa S. Selistre-de-Araújo[f], Fernando Fonseca[g], Flávio Henrique-Silva[g], Nilson Penha-Silva[a], Fábio de Oliveira[b,i]*

[a] Instituto de Genética e Bioquímica, Universidade Federal de Uberlândia, 38400-902. Uberlândia, MG, Brazil

[b] Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal de Uberlândia, 38400-902. Uberlândia, MG, Brazil

[c] Departamento de Bioquímica e Imunologia, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, FMRP-USP, Ribeirão Preto, SP, Brazil

[d] Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, FCFRP-USP, Ribeirão Preto, SP, Brazil

[e] Departamento de Física e Química, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, FCFRP-USP, Ribeirão Preto, SP, Brazil.

[f] Departamento de Ciências Fisiológicas, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP, Brazil

[g] Departamento de Genética e Evolução, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP, Brazil.

[h] Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Triângulo Mineiro, Campus Ituiutaba, Ituiutaba, MG, Brazil

[i] Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Nano-Biofarmacêutica (N-Biofar)

Corresponding authors: Tel. (fax): +55-34-3218-2118; extension 32. Tel. (fax): +55-34-3218-2203; extension 23. E-mail address: foliveira@umuarama.ufu.br and/or juniacosta@iftriangulo.edu.br

Abstract

A serine protease from *Bothrops alternatus* snake venom was isolated using DEAE Sephacel, Sephadex G-75 and Benzamidine-Sepharose column chromatography. The purified enzyme, named Bhalternin, ran as a single protein band on analytical polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and showed molecular weights of 31,500 and 27,000 under reducing and non-reducing conditions, respectively. Its complete cDNA was obtained by RT-PCR and the 708 bp codified for a mature protein of 236 amino acid residues. The multiple alignment of its deduced amino acid sequence showed a structural similarly with other serine proteases from snake venoms. Bhalternin was proteolytically active against bovine fibrinogen and albumin as substrates. When Bhalternin and bovine fibrinogen were incubated at 37 ℃, at a ratio of 1 :10 (w/w), the enzyme cleaved preferentially the Aα-chain, apparently not degrading the Bβ and γ-chains. Stability tests showed that the intervals of optimum temperature and pH for the fibrinogenolytic activity were 30 – 40 ℃ and 7.0 to 8.0, respectively. Also, the inhibitory effects of benzamidine on the fibrinogenolytic activity of Bhalternin indicate that it is a serine protease. This enzyme caused morphological alterations in heart, liver, lung and muscle of mice and it was found to cause blood clotting *in vitro* and defibrinogenation when intraperitoneally administered to mice, suggesting it to be a thrombin-like enzyme. Therefore, Bhaltenin may be of interest as a therapeutic agent in the treatment and prevention of thrombotic disorders.

Keywords: *Bothrops alternatus*, snake venom, fibrinogenase, thrombin-like, defibrinogenation.

Resumo

Uma serinoprotease da peçonha de *Bothrops alternatus* foi isolada por meio de três etapas cromatográficas: DEAE Sephacel, Sephadex G-75 e Benzamidina-Sepharose. A enzima purificada, denominada balternina, apresentou uma única banda protéica quando analisada em SDS-PAGE, eletroforese em gel de poliacrilamida sob condições desnaturantes, apresentando peso molecular de aproximadamente 31.500 e 27.000 na presença e na ausência de agente redutor, respectivamente. O cDNA completo foi obtido por RT-PCR e a proteína madura de 236 resíduos de aminoácidos foi codificada por 708 pares de bases. O alinhamento múltiplo das sequências de aminoácidos deduzidas desta enzima mostrou similaridade estrutural com outras serinoproteases de peçonhas de serpentes. A balternina apresentou atividades fibrinogenolítica e albuminolítica. Quando a protease e o fibrinogênio bovino foram incubados a 37 ℃, na proporção de 1:10 (m/m), a enzima clivou preferencialmente a cadeia Aα e, aparentemente, não degradou as cadeias Bβ e γ do substrato. Testes de estabilidade mostraram que o intervalo ótimo de temperatura e pH para a atividade proteolítica sobre o fibrinogênio foram de 30 a 40 ℃ e 7,0 a 8,0, respectivamente. O efeito de inibidores enzimáticos mostrou que a benzamidina inibiu a atividade fibrinogenolítica, indicando que a balternina é uma serinoprotease. A enzima isolada causou, ainda, alterações morfológicas no coração, fígado, pulmão e músculo de camundongos, desencadeando também coagulação *in vitro* e desfibrinogenação *in vivo*, quando administrada intraperitonealmente em camundongos, sugerindo ser uma enzima ‘thrombin-like’. Desta forma, a balternina pode ser de interesse como agente terapêutico na prevenção e tratamento de desordens trombóticas.

Palavras-chave: *Bothrops alternatus*, peçonha de serpente, fibrinogenase, ‘thrombin-like’, desfibrinogenação.

1. Introduction

Enzymes from snake venoms may be proteolytic, hemorrhagic, anticoagulant, procoagulant, and/or fibrin(ogen)olytic (Sant' Ana et al., 2008; Gomes et al.; 2009; Gay et al.; 2009). The hemostasis process is mainly affected by proteases from snake venoms (Garcia et al., 2004; Cecchini et al., 2005; Lu and Clemetson, 2005; Sanchez et al., 2005). These enzymes are yet responsible for pain, edema, necrosis, systemic disturbances, tissue and cellular alterations (Sano-Martins et al., 1997; Castro et al., Ribeiro et al., 2001; 2004; Francisco et al., 2006; Clissa et al., 2006; Pérez et al., 2007, Bernardes et al., 2008).

According to their interaction with inhibitors, proteolytic enzymes may be mainly classified as serine proteases (SVSPs) or metalloproteases (SVMPs) (Andrião-Escarso, 1997; Thomazini-Santos et al., 1998; Matsui et al., 2000; Vieira et al., 2004). They can promote fibrin(ogen)olysis (Swenson and Markland Jr., 2005), both degrade preferentially the Aα-chain of fibrinogen followed by the β-chain. The γ-chain is rarelly hydrolyzed by fibrinogenases isolated from snake venoms of the *Bothrops* genus.

The SVSPs found in the Viperidae family contain a highly conserved catalytic triad (Ser195, His57, and Asp102) (Serrano and Maroun, 2005). Thrombin-like enzymes (TLEs) are serine proteases that hydrolyze the fibrinogen, liberating fibrinopeptides A and/or B (A, B and AB venombin) (Magalhães et al., 2007) and promoting the formation of weak fibrin clot. SVSPs with thrombin-like activity possess similar action to thrombin, but are not inhibited by heparin, and they do not promote activation of the blood coagulation factor XIII. These enzymes present *in vitro* coagulant and *in vivo* defibrin(ogen)ating activities (Stocker, 1990; Pérez et al., 2008).

Many TLEs have been isolated, such as ancrod isolated from *Agkistrodon rhodostoma* (Nolan et al., 1976), batroxobin from *Bothrops atrox moojeni* (Stocker and Barlow, 1976), crotalase purified from *C. adamanteus* (Markland and Damus, 1971), ABUSV-SPase from *Agkistrodon blomhoffii ussurensis* (Liu et al., 2009) and a serine protease from *Bothrops asper* (Pérez et al., 2008).

Proteases with defibrinogenating action have potential to be diagnostic or antithrombotic agents, or reagents to elucidate mechanisms of hemostasis

(Rojnuckarin et al., 2006; Calvete et al., 2009). In this report, we describe the isolation, biochemical and structural characterization of Bhalternin, a thrombin-like enzyme from *Bothrops alternatus* snake venom.

2. Material and methods

2.1 Material

Desiccated *B. alternatus* venom was purchased from Pentapharm of Brazil (Uberlândia-MG, Brazil). Acrylamide, ammonium persulfate, benzamidine, bromophenol blue, ethylenediaminetetracetic acid (EDTA), bovine fibrinogen, β-mercaptoethanol, *N*,*N*'-methylene-bis-acrylamide, sodium dodecyl sulphate (SDS) and *N*,*N*,*N'*,*N'*-tetramethylethylenediame (TEMED) were from Sigma Chemical Co. (St Louis, MO, USA). Glycine, Tris, molecular weight markers for electrophoresis and all chromatographic media were from Amersham Pharmacia Biotech. All other reagents used were of analytical grade.

2.2 Isolation of Bhalternin

Crude venom of *Bothrops alternatus* (200 mg) was dissolved in 50 mM ammonium bicarbonate buffer (pH 7.8) and clarified by centrifugation at 10,000 *xg* for 10 min. The supernatant solution was resolved on a DEAE-Sephacel column (1.7 x 15 cm), previously equilibrated with 50 mM ammonium bicarbonate (Ambic), pH 7.8 and eluted with a convex concentration gradient (50 mM – 0.8 M) of the same buffer. Fractions of 3.0 mL/tube were collected, their absorbances at λ = 280 nm were read and those corresponding to peak DS4 were pooled, lyophilized, dissolved in 50 mM ammonium bicarbonate, pH 7.8 and applied on a Sephadex G-75 column (1 x 100 cm), previously equilibrated with the same buffer. The fraction named DS4G2 was lyophilized and applied on a column of Benzamidine-Sepharose (1 x 10 cm), previously equilibrated with 50 mM Tris-HCl, 0.4 M NaCl, pH 7.4. After elution of the unbound fraction, 0.1 M glycine-HCl, pH 3.0, was applied to the column and the absorbance of the eluting material was monitored at 280 nm. Fractions of 3 mL were collected into tubes containing 0.5 mL of 0.5 M Tris buffer, pH 9.0. The isolated enzyme was named Bhalternin.

Evidence of high purity of the isolated serine protease was obtained by reverse phase HPLC using a C2/C18 column of 4.6×100 mm (GE Healthcare) which was equilibrated with solvent A (0.1% trifluoroacetic acid), and eluted with a concentration gradient of solvent B (70% acetonitrile, 0.1% trifluoroacetic acid) from 0 to 100%, at a flow rate of 1 mL/min during 110 min. The peaks were monitored by absorbance at 280nm.

2.3 Electrophoretic analysis: molecular weight determination

The molecular weight of Bhalternin was determined using SDS-PAGE (14%) according to Laemmli (1970). Electrophoresis was carried out at 20 mA/gel in Tris-glycine buffer, pH 8.3, containing 0.01% SDS. The molecular weight standard proteins used were phosphorylase b (97,000), bovine serum albumin (66,000), ovoalbumin (45,000), carbonic anhydrase (30,000), soybean trypsin inhibitor (20,100), and α-lactalbumin (14,400). Gels were stained with Coomassie Blue R-250, 0.2% (w/v), in acetic acid : methanol : water (1 : 5 : 5, v/v).

2.4 Electrophoresis in acid conditions

Electrophoresis for native protein was performed by the method of Laemmli (1970) and Davis (1964), with some modifications. Electrophoresis was carried out at 20 mA/gel in Tris-glycine buffer, pH 8.3. Gels were stained with Coomassie Blue R-250, 0.2% (w/v), in acetic acid : methanol : water (1 : 5 : 5, v/v).

2.5 Estimation of Protein Concentration

Protein concentration was determined according to a microbiuret method described by Itzhaki and Gill (1964), using bovine serum albumin as standard.

2.6 N-terminal sequencing

A PPSQ-33A (Shimadzu) automatic sequencer was used for the N-terminal sequencing. The phenylthyoidantoin (PTH) amino acids were identified by comparing their retention times with the 20 PTH-amino acid standard mixture. The peptides obtained were compared with the sequences of other related proteins in the SWISS-PROT/TREMBL databases using the FASTA and BLAST programs.

2.7 Screening and isolation of SP from a venom gland cDNA library

The venom gland was extracted and the mRNA was isolated (Poly Attract Systems III, Promega®) from total RNA. The cDNA library was constructed using the CloneMiner cDNA Library Construction Kit, (Invitrogen®) and sequencing of the 960 clones was performed using DYEnamic™ ET Dye Terminator Kit and the automatic sequencer MegaBACE™ DNA Analysis System, (GE Healthcare®) using the M13 primer. The sequences were compared to the National Center for Biotechnology Information databank (NCBI) and resulted in some incomplete serine proteases so an extension were made using internal primers designed based on the cDNA sequences. The complete sequence were obtained using the assemble software CAP3 Sequence Assemble Program (Huang, 1999) and the confirmation from a comparison with the NCBI databank.

2.8 Fibrinogenolytic and albuminolytic activities

Fibrinogenolytic activity was assayed as previously described by Oliveira et al. (1999). Fibrinogen (5 µg) and Bhalternin were mixed in a ratio of 1:10 (w/w) and the mixture was incubated at 37 ºC for different time intervals (0–60 min). The reaction was stopped by the addition of an equal volume of a denaturing buffer containing 2% (w/v) SDS and 10% (v/v) β-mercaptoethanol. The reaction products were analyzed using SDS-PAGE and 14% gels. For the quantitative assay, proteolytic activity, using albumin and fibrinogen as substrate, was determined according to Lomonte and Gutiérrez (1983), substituting casein for albumin and fibrinogen, respectively. About 50 µg of Bhalternin was added to 1.0 mL of 1% albumin or fibrinogen solution in 01 M Tris–HCl buffer, pH 8.0. The mixture was incubated at 37 ℃ during 30 min and the reaction was stopped by the addition of 4.0 mL of 5% trichloroacetic acid. After a period of 30 min at room temperature, the tubes were centrifuged, the supernatant collected and the absorbance determined by spectrophotometric measurement at 280 nm using a Speckol spectrophotometer. One unit of activity was defined as an increase of 0.01 absorbance units at 280 nm. All experiments were carried out in triplicate.

2.9 Azocaseinolytic activity

Bhalternin (50 µg) was added to 2 mL of azocasein (1 mg/mL) in 0.2 M Tris-HCl, pH 8.0, 4 mM $CaCl_2$ and incubated at 37 ℃ for 30 min. Five hundred microlitres of 5% (m/v) trichloroacetic acid (TCA) was then added to precipitate the undegraded azocasein. After 20 min the solution was filtered and the absorbance of the filtrate measured at 366 nm. One unit of activity was defined as an increase of 0.01 absorbance units at 366 nm. All experiments were carried out in triplicate.

2.10 Defibrinating Activity

Defibrinating activity was tested using the method of Gene et al. (1989), with slight modifications. Briefly, four Swiss mice (18–20 g) were i.p. injected with 5 µg of Bhalternin dissolved in 200 µL saline; control animals received only 200 µL saline. After one hour, animals were sacrificed by an overdose of ketamine/xylazine and bled by cardiac puncture. Whole blood was placed in tubes and kept at 25–30 ℃ until clotting occurred.

2.11 Blood-Clotting Activity

Bovine blood samples were collected into 3.8% sodium citrate (9:1, v/v) and centrifuged at 2500x*g* for 15 min at 4 ℃ to obtain platelet-rich plasma. Clotting activity was determined by mixing 5 µg of Bhalternin with 200 µL of citrated bovine plasma at 37 ºC and by determining the clotting time.

2.12 Enzyme Inhibitors

Inhibition of fibrinogenolytic activity was determined by incubating Bhalternin (5 µg) dissolved in 200 µL of 50 mM Tris-HCl, pH 7.8, for 15 min at room temperature (25 ℃) with one of the following inhibitors: 5 mM benzamidine, 5 mM β-mercaptoethanol and 5 mM EDTA and the fibrinogenolytic activity was determined as previously described in section 2.8.

2.13 Animals

Adult male mice were maintained under standard conditions (temperature 22 ± 1 ^{o}C, 60 and 70% of relative humidity, 12 h light/dark cycle and diet and water

ad libitum). All experiments followed the ethical standards for animal experiments in toxinological research recommended by the International Society of Toxinology.

2.14 Morphological alterations induced by Bhalternin

Groups of four mice (18–20 g) were injected i.p. with 50 µg of crude venom or 50 µg of Bhalternin, dissolved in PBS (100 µL). Control mice were injected with 100 µL of PBS under identical conditions. Twenty-four hours after injection, mice were killed by an overdose of ketamine/xylazine, and the heart, lung, liver and kidney were dissected out. For histological analysis, tissues were placed in 10% formaldehyde and processed routinely for embedding in paraffin. Thick sections (5 mm) were prepared and stained with hematoxylin-eosin (H-E) for light microscopic observation.

2.15 Histological examination of myonecrosis

Myotoxic activity was assayed on the basis of the morphological alterations induced by i.m. injections of crude venom (50 µg) or Bhalternin (50 µg/100µL) in the right gastrocnemius muscle of Swiss mice (18–20 g, n = 4). After 24 h, the animals were sacrificed by an overdose of ketamine/xylazine and a small section of the central region of the muscle was excised and soaked in fixing solution (10% formaldehyde in PBS, v/v). The material was then dehydrated by increasing concentrations of ethanol and processed for inclusion in paraffin. The resulting blocks were sliced in 2.5 mm thick sections, stained with 0.25% (w/v) hematoxylin–eosin and examined under a light microscope (Rodrigues et al., 2001).

3. Results and discussion

The main feature of *B. alternatus* venom is its high proteolytic activity, responsible for most of the local and systemic effects observed during envenomation by this snake (Costa et al., 2007).

In this work, Bhalternin was purified from *B. alternatus* snake venom by ion exchange chromatography on DEAE-Sephacel column producing six major protein peaks (DS1 – DS6) (Fig. 1A). The fraction DS4 was fractioned on a Sephadex G-

75 column, resulting in three peaks named DS4G1, DS4G2 and DS4G3 (Fig. 1B). After this, peak DS4G2 was fractionated on Benzamidine-Sepharose column, resulting in two new fractions, named DS4G2B1 and DS4G2B2 (Bhalternin) (Fig. 1C). This enzyme represented ~ 1.85 % (w/w) of the initial desiccated venom.

To confirm the purity degree, the Bhalternin was applied on a C2/C18 reverse-phase HPLC column, resulting in a unique major peak (Fig. 2A). The sample showed a great purity level, as observed in native conditions (Fig. 2D). SDS-PAGE analysis indicated that the Bhalternin enzyme consists of a single polypeptide chain and had a molecular weight of about 31,500 under reduced conditions (Fig. 2B) and 27,000 under non-reduced conditions (Fig. 2C).

The product from amplification by PCR produced a cDNA fragment of 780 bp that codifies for a mature protein of 236 amino acids residues (Fig. 3), corresponding to a theoretical p*I* of 8.0 and molecular weight of 25,300. The N-terminal amino acid sequence of protein, Bhalternin was determined by automated sequencing and confirmed by the nucleotide sequence (Fig. 3). The multiple alignment of Bhalternin and those of other snake venom serine proteases (Fig. 4) show that this enzyme has similarity between 72 to 65% with others serine proteases from different genus.

Bhalternin induced blood-clotting *in vitro*, defibrinogenation *in vivo*, albuminolytic and fibrinogenolytic activities, but it did not present azocaseinolytic activity, showing substrate-specificity. The blood-clotting activity on bovine plasma was about 3-fold higher than that of the crude venom. In addition, this protease caused defibrinogenation when administered i.p. to mice, making the plasma uncoagulable. Fibrinogen levels became very low one hour after injection of 5 µg of Bhalternin, with normal fibrinogen levels being only reestablished after 24 hours.

Generally, serine proteases that cause defibrinogenation *in vivo*, also promote blood clotting *in vitro* (Gutiérrez et al., 2009). These enzymes are called thrombin-like and can be represented by Bhalternin and other enzymes isolated recently, as Leucurobin from *Bothrops leucurus* (Magalhães et al., 2007), BjussuSP-I from *Bothrops jararacussu* (Sant´Ana et al., 2008) and BJ-48 from *Bothrops jararacussu* (Silva-Junior et al., 2007).

The proteolytic activity may interfere with coagulation and the fibrin(ogen)olytic systems, following envenomation by *Bothrops* snakes (Matsui et

al., 2000). A number of these proteases have been used clinically as anticoagulants or in preclinical research to investigate their possible therapeutic potential (Braud et al., 2000; Marsh, 2001; Lewis and Garcia, 2003; Marsh and Williams, 2005).

Therefore, Bhalternin promotes uncoagulability i*n vivo* acting as a benign defibrinogenating agent to remove fibrinogen from the blood and presented blood clotting activity *in vitro*. Within minutes after administration of the enzyme, there was a depression in the fibrinogen concentration in plasma and within an hour, the fibrinogen levels were reduced and the plasma remained uncoagulable up to 24 hours. The suggestion that anticoagulation could be achieved by totally removing plasma fibrinogen from the circulation by snake venom fibrin(ogen)olytic enzymes was first made in 1968 (Reid and Chan, 1968). Studies of the mechanism of action of the fibrin(ogen)olytic enzymes have revealed that they cause a fast and efficient anticoagulant and antithrombotic activity. In other words, they undo the formed fibrin clot when there is dysfunction of the hemostatic system (Bernardes et al., 2008).

The mechanism of defibrin(ogen)ation that promotes hemostatic alterations as blood clotting, prothrombin and activated partial thromboplastin times, is normally described in envenomations by *Bothrops* snake venoms (Arroyo et al., 1999; Otero et al., 2006; Gutiérrez el al., 2009). Therefore, the fibrin(ogen)olytic serine protease Bhalternin stands out as a promising tool for its importance as an anticoagulant and thrombolytic enzyme and for a better understanding of the action mechanism of ophidian venoms, especially those from the *Bothrops* genus.

The fibrin(ogen)olytic enzymes found in snake venoms can be classified in three groups, depending on the specificity of hydrolysis of the fibrinogen chains. The first group presents enzymes with hydrolysis preference for the α-chain (Leonardi et al., 2002; Mukherjee, 2008), the second for the β-chain (Estevão-Costa et al., 2000; Guo et al., 2001; Samel et al., 2002; Bernardes et al., 2008) and the third for the γ-chain fibrinogen (Nikai et al., 1984). As shown in figure 5A, Bhalternin showed proteolytic activity on fibrinogen, preferentially hydrolyzing the Aα-chain and apparently not degrading the Bβ and γ-chains of bovine fibrinogen. Therefore, Bhalternin is classified as an α-fibrinogenase, as well as BmooMP*α*-I, an α-fibrinogenase from *Bothrops moojeni* (Bernardes et al., 2008), BaltMP-I and

BaltMP-II from *Bothrops alternatus* (Costa et al., 2007), BaltF from *Bothrops alternatu*s snake venom (Costa et al., 2003) and leucurolysin-a purified from *Bothrops leucurus* (Bello et al., 2006). The quantitative analysis of the fibrinogenolytic and albuminolytic activities showed specific activity of ~ 1800 units/mg for fibrinogen and ~ 1700 units/mg for albumin, both in pH 8,0 (data not shown).

Stability tests showed that the intervals of optimum temperature and pH for the fibrinogenolytic activity were 30-40 ℃ (Fig. 5 B) and 7.0-8.0 (Fig. 5C), respectively, evidenced by degradation products of the bovine fibrinogen.

Figure 5D shows the effects of some inhibitors on the fibrinogenolytic activity of Bhalternin. Incubation of the purified enzyme for 15 min at 37 ℃ with benzamidine (5 mM) completely abolished its fibrinogenolytic activity, suggesting it to be a serine protease. Additionally, EDTA (5mM) partially abolished and β-mercaptoethanol (5 mM) had little or no effect on this activity.

Histological examination showed important morphological alterations in the heart, lung and liver, as well as the myotoxicity caused by the crude venom and Bhalternin (Fig. 6, 7, 8 and 9, respectively). In the heart, the crude venom unchained valve inflammation, evidenced by leukocyte infiltration in the conjunctive tissue, and Bhalternin caused hemolysis (Fig. 6E and F). In the lung, both crude venom and enzyme caused apparent hyperemia (Fig. 7C and E). Bhaternin also provoked lymphocytic interstitial pneumonitis evidenced by dilatation of the alveolar septa due to moderate polymorphonuclear infiltrate and mononuclear cells. In the liver, crude venom caused necrosis evidenced by cellular disorganization and inflammatory infiltrate, while Bhalternin caused necrosis and inflammatory infiltrate (Fig. 8E, F and G). In the kidney, crude venom and Bhalternin showed glomerular congestion (data not shown).

As *B. alternatus* crude venom, Bhalternin induced myotoxicity. Histopathological analysis revealed a drastic myonecrosis and leukocyte infiltrate induced by this enzyme. When compared with control cells, gastrocnemius muscle cells of mice injected with Bhalternin showed extensive cellular destruction, displaying contracted and clumped fibers in different stages of degeneration. Inflammatory cells can be observed surrounding the altered striated muscle cells. Bhalternin induced an intense infiltration of inflammatory cells (mainly

polymorphonuclear cell infiltration) and the degeneration of striated muscle cells as characterized by the loss of myofibrils. There was no evidence of vascular lesions or hemorrhage (Fig. 9E and F).

In conclusion, we have purified a thrombin-like enzyme, named Bhalternin, from *B. alternatus* snake venom, which caused morphological alterations induced in mice and presents fibrinogenolytic, albuminolytic, and defibrinogenating activities. We also present the complete amino acid sequence of Bhalternin and discussed its homology with other serine proteases snake venom.

Acknowledgements

This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Ministério da Ciência e Tecnologia (MCT), Brazil. The authors would like to acknowledge Fernando Antônio Pino Anjolette for technical assistance during amino-terminal sequencing.

Conflict of interest

The authors declare that there is no conflict of interest.

References

Andrião-Escarso, S. H., Sampaio, S.V., Cunha, O.A., Marangoni, S., Oliveira, B., Giglio, J.R., 1997. Isolation and characterization of a new clotting factor from *Bothrops jararacussu* (jararacuçu) venom. Toxicon 35, 1043-1052.

Arroyo, O., Rojas, G., Gutiérrez, J.M., 1999. Envenenamiento por mordedura de serpiente en Costa Rica en 1996: epidemiología y consideraciones clínicas. Acta Méd. Costarric. 41, 23–29.

Bello, C.A., Hermogenes, A.L.N., Magalhaes, A., Veiga, S.S., Gremski, L.H., Richardson, M., Sanchez, E.F., 2006. Isolation and biochemical characterization of a fibrinolytic proteinase from *Bothrops leucurus* (white-tailed jararaca) snake venom. Biochimie 88, 189-200.

Bernardes, C.P., Santos-Filho, N.A., Costa, T.R., Gomes, M.S.R., Torres, F.S., Costa, J.O., Borges, M.H., Richardson, M., Santos, D.M., Pimenta, A.M.C., Homsi-Brandeburgo, M.I., Soares, A.M., Oliveira, F., 2008. Isolation and structural characterization of a new fibrin(ogen)olytic metalloproteinase from *Bothrops moojeni* snake venom. Toxicon 51, 574–584.

Braud, S., Bon, C., Wisner, A., 2000. Snake venom proteins acting on hemostasis. Biochimie 82, 851-859.

Calvete, J.J., Sanz, L., Angulo, Y., Lomonte, B., Gutiérrez, J.M., 2009. Venoms, venomics, antivenomics. FEBS Lett. 583, 1736-1743.

Castro, I., Burdmann, E.A., Seguro, A.C., Yu, L., 2004. *Bothrops* venom induces direct renal tubular injury: role for lipid peroxidation and prevention by antivenom**.** Toxicon 43**,** 833-839.

Cecchini, A.L., Marcussi, S., Silveira, L.B., Borja-Oliveira, C.R., Rodrigues-Simioni, L., Amara, S., Stabeli, R.G., Giglio, J.R., Arantes, E.C., Soares, A.M., 2005. Biological and enzymatic activities of *Micrurus* sp. (Coral) snake venoms. Comp. Biochem. Physiol. A 140, 125–134.

Clissa, P.B., Lopes-Ferreira, M., Della-Casa, M.S., Farsky, S.H.P., Moura-da-Silva, A.M., 2006. Importance of jararhagin disintegrin-like and cysteine-rich domains in the early events of local inflammatory response. Toxicon 47, 591-596.

Costa, J.O., Baldo, C., Hamaguchi, A., Homsi-Brandeburgo, M.I., Oliveira, F., 2003. Purification of a fibrinogenolytic enzyme from the venom of *Bothrops alternatus*. Bioscience Journal 19, 147-153.

Costa, J.O., Petri, C.B., Hamaguchi, A., Homsi-Brandeburgo, MI., Oliveira, C.Z, Soares, A.M., Oliveira, F. 2007. Purification and functional characterization of two fibrinogenolytic enzymes from *Bothrops alternatus* snake venom. J. Venom Anim. Toxins Incl. Trop. Dis. 13, 640-654.

Davis, B.J. 1964. Disc Electrophoresis. II. Method and Application to Human Serum Proteins. Ann. N. Y. Acad. Sci. 121, 404-427.

Estêvão-Costa, M.I., Diniz, C.R., Magalhães, A., Markland, F.S., Sanchez, E.F., 2000. Action of metalloproteases mutalysin I and II on several components of the hemostatic and fibrinolytic systems. Thromb. Res. 99, 363-376.

Francisco, G., Zara, F.J., Maria, D.A., Cruz-Neto, A.P., 2006. Toxin jararhagin in low doses induces interstitial edema and increases the metabolic rate and red blood cells in mice. Toxicon 48, 1060-1067.

Garcia, L.T., Parreiras e Silva, L.T., Ramos, O.H., Carmona, A.K., Bersanetti, P.A., Selistre-de-Araujo, H.S., 2004. The effect of post-translational modifications on the hemorrhagic activity of snake venom metalloproteases. Comp. Biochem. Physiol. C 138, 23-32.

Gay, C.C, Maruñak, S.L., Teibler, P., Ruiz, R., Acosta de Pérez, O.C., Leiva, L.C., 2009. Systemic alterations induced by a *Bothrops alternatus* hemorrhagic metalloproteinase (baltergin) in mice. Toxicon 53, 53-59.

Gene, J.A., Roy, A., Rojas, G., Gutiérrez, J. M., Cerdas, L., 1989. Comparative study on coagulant, defibrinating, fibrinolyic and fibrinogenolytic activities of Costa Rican crotaline snake venoms and their neutralization by a polyvalent antivenom. Toxicon 27, 841-848.

Gomes, M.S.R, Mendes, M.M., Oliveira, F., Andrade, R.M., Bernardes, C.P., Hamaguchi, A., Alcântara, T.N., Soares, A.M., Rodrigues, V.M., Homsi-Brandeburgo, M.I., 2009. BthMP: a new weakly hemorrhagic metalloproteinase from *Bothrops moojeni* snake venom. Toxicon 53, 24-32.

Guo, Y.W., Chang, T.Y., Lin, K.T., Liu, H.W., Shih, K.C., Cheng, S.H., 2001. Cloning and functional expression of the mucrosobin protein, a beta-fibrinogenase of *Trimeresurus mucrosquamatus* (Taiwan Habu). Protein. Expr. Purif. 23, 483-490.

Gutiérrez, J.M., Escalante, T., Rucavado, A., 2009. Experimental pathophysiology of systemic alterations induced by Bohrops asper snake venom. Toxicon 54, 976-987.

Huang, X. and Madan, A., 1999. CAP3: A DNA sequence assembly program. Genome Res., 9, 868-877.

Itzhaki, R.F., Gill, D.M., 1964. A microbiuret method for estimating proteins. Anal. Biochem., 9, 401–410.

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

Leonardi, A., Gubensek, F., Krizaj, I., 2002. Purification and characterisation of two hemorrhagic metalloproteases from the venom of the long-nosed viper, *Vipera ammodytes ammodytes.* Toxicon 40, 55-62.

Lewis R.J., Garcia, M.L., 2003. Therapeutic potential of venom peptides. Nat. Rev. Drug. Discov. 2, 790-802.

Liu, S., Sun, M.Z., Sun, C., Zhao, B., Greenaway, F.T., Zheng, Q., 2009. A novel serine protease from the snake venom of *Agkistrodon blomhoffii ussurensis.* Toxicon 52, 760-768.

Lu, O., Clemetson, J.M., 2005. Snake venoms and hemostasis. J. Thromb. Haemost. 8, 1791-1799.

Lomonte, B., Gutiérrez, J.M., 1983. La actividad proteolítica de los venenos de serpientes de Costa Rica sobre la caseína. Rev. Biol. Trop. 31, 37- 40.

Magalhães, A., Magalhães, H.P.B., Richardson, M., Gontijo, S., Ferreira, R.N., Almeida, A.P., Sanchez, E.F., 2007. Purification and properties of a coagulant thrombin-like enzyme from the venom of *Bothrops leucurus*. Comp. Biochem. Physiol., Part A Mol. Integr. Physiol. 146, 565-575.

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

Marsh, N.A., 2001. Diagnostic use of snake venom. Haemostasis 31, 211-217.

Marsh, N.A., Williams, V., 2005. Practical applications of snake venom toxins in haemostasis. Toxicon 45, 1171-1181.

Matsui T., Fujimura Y., Titani K., 2000. Snake venom proteases affecting hemostasis and thrombosis. Biochem. Biophys. Acta 1477, 146-156.

Mukherjee, A.K., 2008. Characterization of a novel pro-coagulant metalloprotease (RVBCMP) possessing α-fibrinogenase and tissue haemorrhagic activity from venom of Daboia russelli russelli (Russell's viper): Evidence of distinct coagulant and haemorrhagic sites in RVBCMP. Toxicon 51, 923-933.

Nikai, T., Mori, N., Kishida, M. et al., 1984. Isolation and biochemical characterization of hemorrhagic toxin from the venom of *Crotalus atrox.* Arch. Biochem. Biophys. 231, 309-311.

Nolan, C.; Hall, L. S. and Barlow, G. H., 1976. Ancrod, the coagulating enzyme from Malayan pit viper (*Agkistrodon rhodostoma*) venom. Methods in Enzymology 45, 205-213.

Oliveira, F., Rodrigues, V.M., Borges, M.H., Soares, A.M., Hamaguchi, A., Giglio, Jr., Homsi-Brandeburgo, M.I., 1999. Purification and partial characterization of a new proteolytic enzyme from the venom of *Bothrops moojeni* (CAISSACA). Biochem. Mol. Biol. Int. 47, 1069-1077.

Otero, R., León, G., Gutiérrez, J.M., Rojas, G., Toro, M.F., Barona, J., Rodríguez, V., Díaz, A., Núñez, V., Quintana, J.C., Ayala, S., Mosquera, D., Conrado, L.L., Fernández, D., Arroyo, Y., Paniagua, C.A., López, M., Ospina, C.E., Alzate, C., Fernández, J., Meza, J.J., Silva, J.F., Ramírez, P., Fabra, P.E., Ramírez, E., Córdoba, E., Arrieta, A.B., Warrell, D.A., Theakston, R.D.G., 2006. Efficacy and safety of two whole IgG polyvalent antivenoms, refined by caprylic acid fractionation with or without b-propiolactone, in the treatment of *Bothrops asper* bites in Colombia. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 100, 1173-1182.

Pérez, A.V., Saravia, P., Rucavado, A., Sant'Ana, C.D., Soares, A.M., Gutiérrez, J.M., 2007. Local and systemic pathophysiological alterations induced by a serine

proteinase from the venom of the snake *Bothrops jararacussu*. Toxicon 49, 1063-1069.

Pérez, A.V., Rucavado, A., Sanz, L., Calvete, J.J., Gutiérrez, J.M., 2008. Isolation and characterization of a serine proteinase with thrombin-like activity from the venom of the snake *Bothrops asper*. Braz. J.Med.Biol. Res. 41: 12-17.

Reid, H.A., Chan, K.E., 1968. The paradox in therapeutic defibrination. Lancet 291, 485-486.

Ribeiro, L.A., Jorge, M.T., Lebrão, M.L., 2001. Prognostic factors for local necrosis in *Bothrops jararaca* (Brazilian pit viper) bites. Trans. Royal Soc. Trop. Med. Hyg. 95, 630-634.

Rodrigues, V.M., Soares, A.M., Andriao-Escarso, S.H., Franceschi, A.M., Rucavado, A., Gutierrez, J.M., Giglio, J.R., 2001. Pathological alterations induced by neuwiedase, a metalloproteinase isolated from *Bothrops neuwiedi* snake venom. Biochimie 83, 471–479.

Rojnuckarin, P., Muanpasitporn, C., Chanhome, L., Arpijuntarangkoon, J., Intragumtornchai, T., 2006. Molecular cloning of novel serine proteases and phospholipases A2 from green pit viper (*Trimeresurus albolabris*) venom gland cDNA library. Toxicon. 47, 279-287.

Samel, M., Subbi, J., Siigur, J., Siigur, E., 2002. Biochemical characterization of fibrinogenolytic serine proteinases from *Vipera lebetina* snake venom. Toxicon 40, 51-54.

Sanchez, E.E., Galan, J.A., Powell, R.L., Reyes, S.R., Soto, J.G., Russell,W.K., Russell, D.H., Perez, J.C., 2005. Disintegrin, hemorrhagic, and proteolytic activities of Mohave rattlesnake, *Crotalus scutulatus scutulatus* venoms lacking Mojave toxin. Comp. Biochem. Physiol. C 141, 124–132.

Sano-Martins, I.S., Santoro, M.L., Castro, S.C.B., Fan, H.W., Cardoso, J.L.C., Theakston, R.D.G., 1997. Platelet aggregation in patients bitten by the brazilian snake *Bothrops jararaca*. Thromb. Res. 87, 183-195.

Sant'Ana, C.D., Ticli, F.K., Oliveira, L.L., Giglio J.R., Recchia, C.G.V., Fuly, A.L., Selistre-de-Araújo, H.S., Franco, J.J, Stábile, R.G., Soares, A.M., Sampaio, S.V., 2008. BjussuSP-I: a new thrombin-like enzyme isolated from *Bothrops jararacussu* snake venom. Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol 151, 443-454.

Serrano, S.M.T., Maroun, R.C., 2005. Snake venom serine proteinases: sequence homology vs. substrate specificity, a paradox to be solved. Toxicon 45, 1115-1132.

Silva-Junior F.P., Guedes, H.L.M., Garvey, L.C., Aguiar, A.S., Bourguignon, S.C., Di Cera, E., Giovanni-de-Simone, S., 2007. BJ-48, a novel thrombin-like enzyme from the *Bothrops jararacussu* venom with high selectivity for Arg over Lys in P1: Role of N-glycosylation in thermostability and active site accessibility. Toxicon 50, 18-31.

Smolka, M.B., Marangoni, S., Oliveira, B., Novello, J.C., 1998. Purification and partial characterization of a thrombin-like enzyme, balterobin, from the venom of *Bothrops alternatus*. Toxicon 36, 1059–1063.

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

Stocker K., 1990. Snake venom proteins affecting hemostasis and fibrinolysis, In: Stocker KF. Ed. Medical Use of Snake Venom Proteins. Boca Raton, CRC Press, pp. 97-160.

Swenson S, Markland JR FS., 2005. Snake venom fibrin(ogen)olytic enzymes. Toxicon 45, 1021-1039.

Thomazini-Santos, I.A., Mendes-Giannini, M.J.S., Toscano, E., Machado P.E.A., Lima C.R.G., Barraviera, B., 1998. The evaluation of clotting time in bovine thrombin, reptilase, and thrombin-like fraction of *Crotalus durissus terrificus* venom using bovine, equine, ovine, bubaline and human cryoprecipitates, J. Venom. Anim. Toxins. 4, 120-136.

Vieira, D.F., Watanabe, L., Sant'ana, C.D., Marcussi, S., Sampaio, S.V., Soares, A.M., Arni, R.K., 2004. Purification and characterization of jararassin-I, a thrombin-like enzyme from *Bothrops jararaca* snake venom. Acta Biochim. Biophys. Sin. Shanghai 36, 798-802.

Vitorino-Cardoso, A.F., Ramos, O.H.P., Homsi-Brandeburgo, M.I., Selistre-de-Araujo, H.S., 2006. Insights into the substrate specificity of a novel snake venom serine peptidase by molecular modeling. Comp. Biochem. Physiol. B, Biochem. Mol. Biol. 144, 334–342.

Legends to Figures

Figure 1. Purification of Bhalternin from *Bothrops alternatus* snake venom. (A): Separation on DEAE-Sephacel: crude venom (200 mg) was applied on the column (1.7 x 15 cm) and elution was carried out at a flow rate of 20 mL/h with ammonium bicarbonate (Ambic) gradients buffer, pH 7.8, from 50 mM to 0.8 M. **(B):** Separation on Sephadex G-75: the active fraction (DS4) was applied on the column (1.0 x 100 cm) and elution with 50 mM ammonium bicarbonate buffer, pH 7,8 was achieved at a flow rate of 20 mL/h. **(C):** Separation on Benzamidine-Sepharose: the concentrated fraction (DS4G2) was applied on the column (1 x 10 cm) previously equilibrated with 50 mM Tris-HCl, 0.4 M NaCl, pH 7.4. After elution of the unbound fraction, 0.1 M glycine-HCl, pH 3.0, was applied to the column and the absorbance of the eluting material was monitored at 280 nm. Fractions of 3 mL were collected into tubes containing 0.5 mL of 0.5 M Tris buffer, pH 9.0. Pooled fractions are indicated by the closed circle. Concentration gradient:

Figure 2: (A): Chromatographic profile by HPLC. **(B):** SDS-PAGE in 14 % (w/v) gel. Lanes: 1- Standard proteins; 2- Reduced crude venom of *Bothrops alternatus*, 3- Reduced Bhalternin. **(C)** Lane 4: non-reduced Bhlaternin. **(D)** Lane 5: Native PAGE (10% gel) for acidic proteins in Tris-glycine buffer, pH 8.3, using 10 µg of Bhalternin. The gel was stained with coomassie blue R-250.

Figure 3. Sequence of cDNA and of deduced amino acid residues from Bhalternin. Amino acid residues directed sequenced from the protein (Aas underlined).

Figure 4. Comparison of the amino acid sequence of Bhalternin with other serine proteases from different snake venoms. Serine proteinase-like (*Bothrops asper*, gi: 123883733), LV-PA, (*Lachesis muta muta*, gi: 123891732), Serine proteinase isoform 4 (*Sistrurus catenatus edwardsii*, gi: 109254944), Haly-PA, (*Agkistrodon halys*, gi:156630858), Plasminogen activator (*Gloydius blomhoffi brevicaudus*, gi: 4102926), CL2 (*Viridovipera stejnegeri*, gi: 82239732), TSV-PA,

(*Trimeresurus stejnejeri*, gi:5821881), Serine proteinase 3 (*Trimeresurus flavoviridis*, gi: 13959616).

Figure 5. **Proteolysis of bovine fibrinogen by Bhalternin.** Lanes: 1-Control incubated without enzyme for 60 min; **(A):** 2-6: control incubated with Bhalternin for 5, 10, 15, 30 and 60 min, respectively. **(B):** Effect of the temperature on the stability of the Bhalternin. Lanes: 1-Control fibrinogen incubated without Bhalternin for 60 min; 2-7: control fibrinogen incubated with Bhalternin for 15 min at 30, 40, 50, 60, 80 and 100 ℃, respectively. **(C):** Effect of the pH on the stability of the Bhalternin. Lanes: 1-Control fibrinogen incubated without Bhalternin for 60 min; 2-6: control fibrinogen incubated with Bhalternin for 15 min in pH 3,0; 5,0; 7,0; 8,0 and 10,0; respectively. **(D):** Proteolysis of bovine fibrinogen by the Bhalternin and effect of inhibitors. Lanes: 1-Control fibrinogen incubated without Bhalternin for 60 min; 2- control fibrinogen incubated with Bhalternin for 60 min; 3-5: fibrinogen after incubation with Bhalternin and 5 mM benzamidine, 5 mM β-mercaptoethanol and 5 mM EDTA for 60 min, respectively.

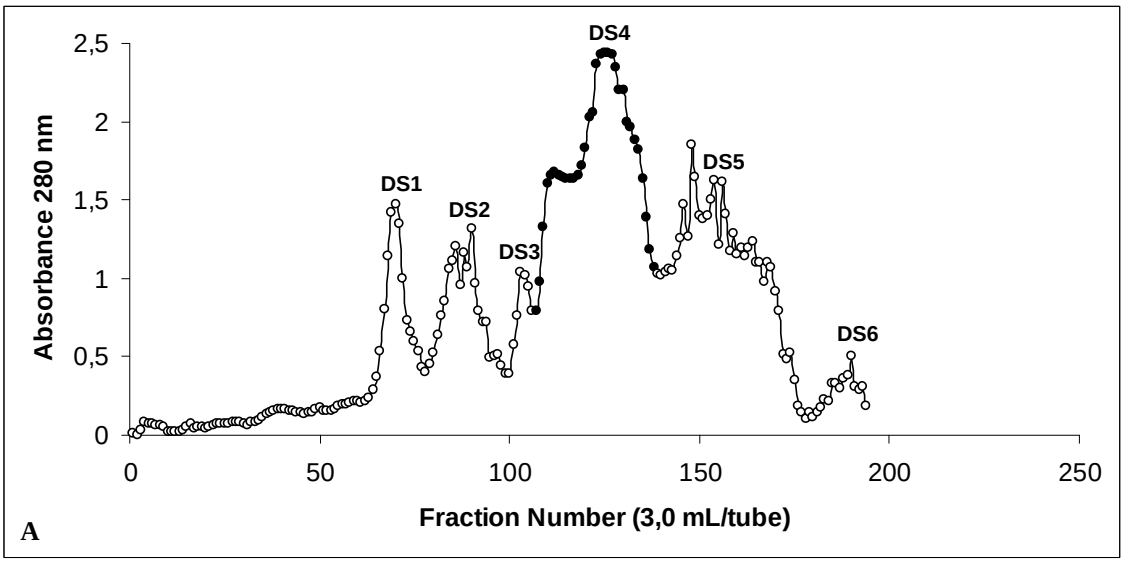
Figure 6. Light micrographs of section of mouse heart tissue 24 hours after i.p. injection of crude venom and Bhalternin. Stained with hematoxylin-eosin (H-E). (A) and (B): Control: normal heart tissue. **(C) and (D):** 50 µg of *Bothrops alternatus* crude venom: notice the presence of valve inflammation and inflammatory infiltrate in the conjunctive tissue. **(E) and (F):** 50 µg of Bhalternin caused hemolysis. Letters indicate the presence of hemolysis (H) and abundant inflammatory infiltrate (I).

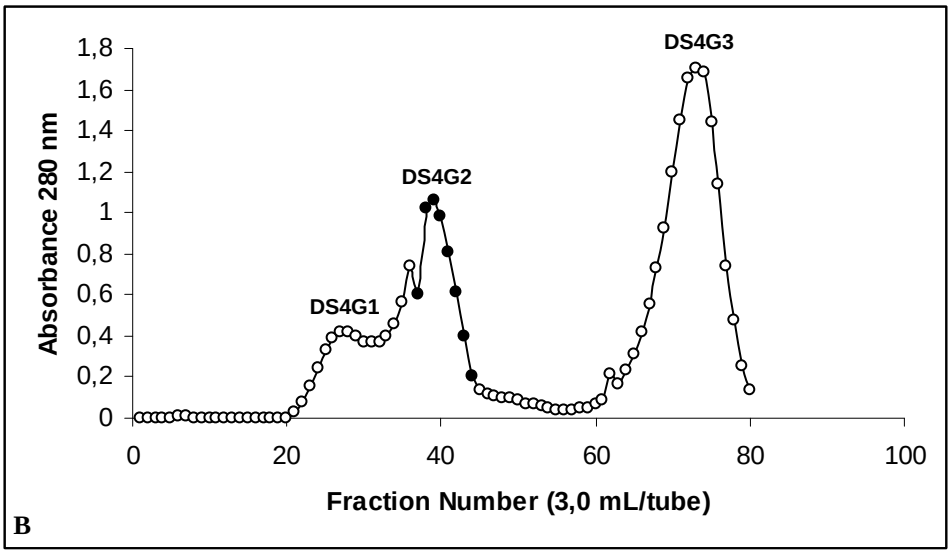
Figure 7. Light micrographs of section of mouse pulmonary tissue 24 hours after i.p. injection of crude venom and Bhalternin. Stained with hematoxylin-eosin (H-E). (A) and (B): Control: normal pulmonary tissue. **(C) and (D):** 50 µg of *Bothrops alternatus* crude venom: hyperemia (Hp). **(E) and (F):** 50 µg of Bhalternin caused hyperemia and lymphoid interstitial pneumonitis evidenced by dilatation of the alveolar septa due to moderate polymorphonuclear infiltrate and mononuclear cells. Letters indicate the presence of hyperemia (Hp) and abundant inflammatory infiltrate (I).

Figure 8. Light micrographs of section of mouse hepatic tissue 24 hours after i.p. injection of crude venom and Bhalternin. Stained with hematoxylin-eosin (H-E). (A) and (B): Control: normal hepatic tissue. **(C) and (D):** 50 µg of *Bothrops alternatus* crude venom: notice the presence of necrosis and inflammatory infiltrate. **(E), (F) and (G):** 50 µg of Bhalternin: notice the presence of necrosis and inflammatory infiltrate. Letters indicate the presence of necrosis (N) and abundant inflammatory infiltrate (I).

Figure 9. Histopathological analysis of myotoxicity induced by Bhalternin. Light micrographs of sections of mouse gastrocnemius muscle 24 h after injection of 50 µg of *Bothrops altenatus* crude venom and 50 µg of Bhalternin, dissolved in 100 µL saline, stained with hematoxylin–eosin. (A) and (B): Control mice were injected with saline alone: normal integer fibers are seen. **(C), (D) and (E), (F):** *Bothrops alternatus* crude venom and Bhalternin, respectively: notice the presence of a drastic myonecrosis, inflammatory infiltrate and extensive cellular destruction, displaying contracted and clumped fibers in different stages of degeneration. Letters indicate the presence of necrosis (N) and abundant inflammatory infiltrate (I).

Figure 1


DS1
DS2
DS3
DS4
DS5
DS6
Absorbance 280 nm
Fraction Number (3,0 mL/tube)
A


DS4G1
DS4G2
DS4G3
Absorbance 280 nm
Fraction Number (3,0 mL/tube)
B

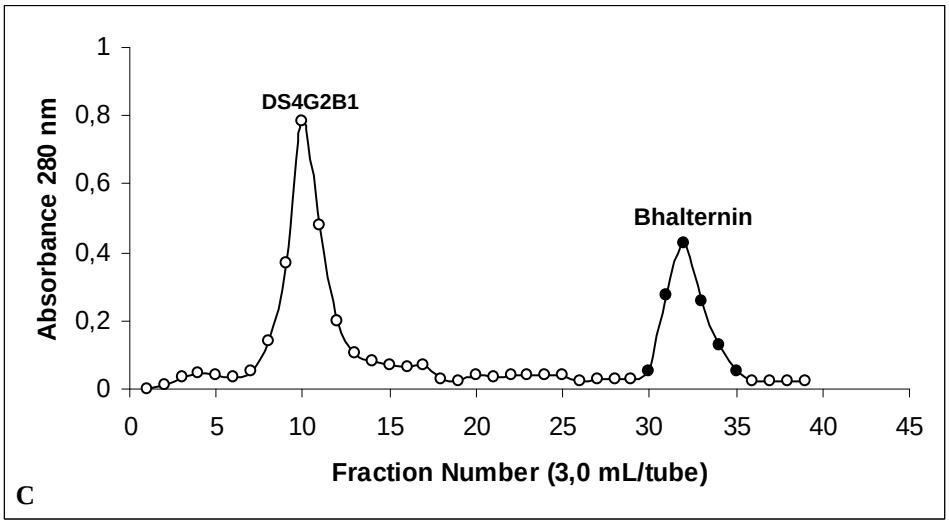
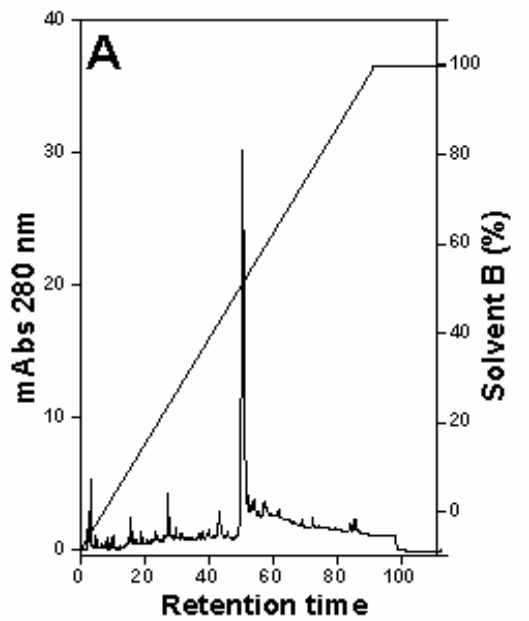

DS4G2B1
Bhalternin
Absorbance 280 nm
Fraction Number (3,0 mL/tube)
C

Figure 2


A
mAbs 280 nm
Solvent B (%)
Retention time
0
10
20
30
40
0
20
40
60
80
100

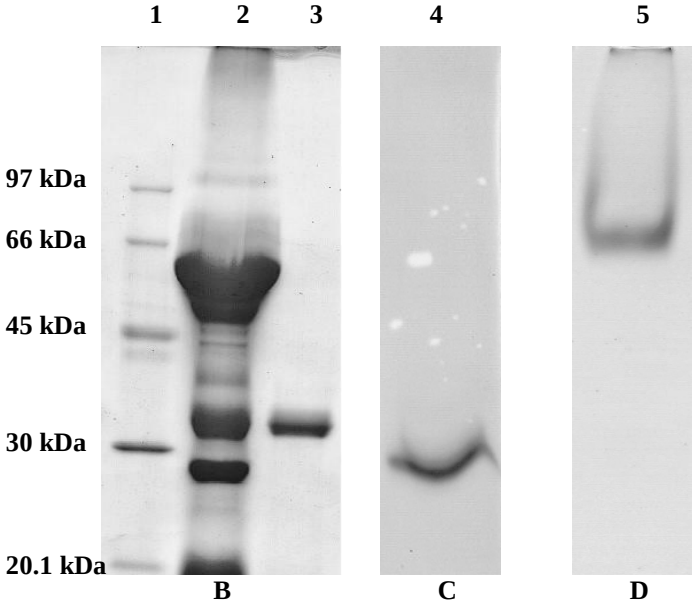

1
2
3
4
5
97 kDa
66 kDa
45 kDa
30 kDa
20.1 kDa
B
C
D

Figure 3

```
atggtgctgatcagagtactagcaaaccttctgatactacagctttcttacgcacaaaag
 M  V  L  I  R  V  L  A  N  L  L  I  L  Q  L  S  Y  A  Q  K
gcttctgaactggtcattggaggtgatgaatgtaacataaatgaacatcgttcccttgtt
 A  S  E  L  V  I  G  G  D  E  C  N  I  N  E  H  R  S  L  V
gtcttgtttaactccagcggttttctctgcgctgggactttgatcaaccaggaatgggtg
 V  L  F  N  S  S  G  F  L  C  A  G  T  L  I  N  Q  E  W  V
ctcactgctgcaaactgtgacaggaaaaatatccggataaagcttggtatgcatagcaaa
 L  T  A  A  N  C  D  R  K  N  I  R  I  K  L  G  M  H  S  K
aatgtaacaaatgaggacgagcagacaagagtcccaaaaagaagtacttttgtctcagta
 N  V  T  N  E  D  E  Q  T  R  V  P  K  R  S  T  F  V  S  V
gcaaaaacctcacaccaaacactgggcacaaggacatccatgttgatcaggctgaaaaga
 A  K  T  S  H  Q  T  L  G  T  R  T  S  M  L  I  R  L  K  R
cctgttaacgacagtccacacattgcgcctctcagcttgccttccagccctcccagtgtg
 P  V  N  D  S  P  H  I  A  P  L  S  L  P  S  S  P  P  S  V
ggctcagtttgccgtgttatgggatggggcacaatctctcctactaaagtgtcttatccc
 G  S  V  C  R  V  M  G  W  G  T  I  S  P  T  K  V  S  Y  P
gatgtccctcattgtgctaacattaacctactcgattatgaggtgtgtcgagaagctcac
 D  V  P  H  C  A  N  I  N  L  L  D  Y  E  V  C  R  E  A  H
ggagggttgccagcaacaagcagaacattgtgtgcaggtatcctggaaggaggcaaagat
 G  G  L  P  A  T  S  R  T  L  C  A  G  I  L  E  G  G  K  D
tcatgtcagggtgactctggcggacccctcatctgtaatggacaatttcagggcattcta
 S  C  Q  G  D  S  G  G  P  L  I  C  N  G  Q  F  Q  G  I  L
tcttgggggtgcatccttgtggccaaccgcataaacctggtgtctacaccaaggtctct
 S  W  G  V  H  P  C  G  Q  P  H  K  P  G  V  Y  T  K  V  S
gattatagtgagtggatccagagcattattgcaggaaatacagatgtgacctgccccccg
 D  Y  S  E  W  I  Q  S  I  I  A  G  N  T  D  V  T  C  P  P
```

Figure 4

```
Bhalternin                      VIGGDECNINEHRSLVVLFNSSGFLCAGTLINQEWVLTAANCDRKNIRIK
Serineproteinase-like           VIGGDECNINEHRSLVVLFNSSGFLCAGTLVQDEWVLTAANCDSKNFQMQ
LV-PA                           VFGGDECNINEHRSLVVLFNSSGFLCAGTLINKEWVLTAAHCDSENFQMQ
Serineproteinase isoform 4      VVGGEECNINEHRSLVVFFNSTNFLCAGTLINQEWVLTAAHCDSKNFQMQ
Haly-PA                         VVGGDECNINEHRSLVVLFNSSGLICSGTLINQEWVLTAAHCDSKNFQML
Plasminogen activator           VVGGDECNINEHRSLVVLFNSSGLICSGTLINQEWVLTAAHCDSKNFQML
CL2                             VIGGDECNINEHRSLVVLFNSSGALCGGTLINQEYVLAAAHCDMPNMQIL
TSV-PA                          VFGGDECNINEHRSLVVLFNSNGFLCGGTLINQDWVVTAAHCDSNNFQLL
Serineproteinase 3              VIGGDECNINEHRSLVVLFNSSGALCGGTLINQEWVLTAAHCDMPNMQIY
                                *.**:*************:***.. :*.***::.::*::**:**  *:::

Bhalternin                      LGMHSKNVTNEDEQTRVPKRSTFVSVAKTSHQTLGTRTSMLIRLKRPVND
Serineproteinase-like           LGVHSKKVLNEDEQTRDPKEEASLCPNRKKDDEV-DKDIMLIKLDSRVSN
LV-PA                           LGVHSKKVPNKDEETRDPKE-KFICPNRKKNDEK-DKDIMLIRLNRPVSN
Serineproteinase isoform 4      LGVHSKKVLNEDEQTRDPKE-KFICPNRKKDDEK-DKDIMLIRLDRPVSN
Haly-PA                         FGVHSKKILNEDEQTRDPKE-KFICPNKKKDDEK-DKDIMLIRLDSPVSN
Plasminogen activator           FGVHSKKILNEDEQTRDPKE-KFICPNKKKDDEK-DKDIMLIRLDSPVSN
CL2                             LGVHSASVLNDDEQARDPEE-KYFCLS-SNNDTKWDKDIMLIRLNRPVNN
TSV-PA                          FGVHSKKILNEDEQTRDPKE-KFFCPNRKKDDEV-DKDIMLIKLDSSVSN
Serineproteinase 3              LGVHSASVPNDDEQARDPEE-KYFCLS-SNNDTEWDKDIMLIRLNRSVRN
                                :*:** .: *.**::* *:.   ..   ...:    :  ***:*.  * :

Bhalternin                      SPHIAPLSLPSSPPSVGSVCRVMGWGTISPTKVSYPDVPHCANINLLDYE
Serineproteinase-like           SEHIAPLSLPSSPPSVGSVCRIMGWGTISPTKETYPDVPHCANINILDHA
LV-PA                           SEHIALLSLPSSPPSVGSVCRIMGWGTISPTKEIYPDVPHCADINILDHA
Serineproteinase isoform 4      SEHIAPLSLPSSPTSVGSVCRIMGWGINSPTKETYPDVPHCANINILHHE
Haly-PA                         SEHIAPLSLPSSSPTVDSVCRIMGWGTIKPADETYPDVPHCANINILDHT
Plasminogen activator           SEHIAPLSLPSSSPTVDSVCRIMGWGTIKPADETYPDVPHCANINILDHT
CL2                             SVHIAPLSLPSSPPSVGSVCRIMGWGKTIPTQETHPDVPHCANIKLFHYS
TSV-PA                          SEHIAPLSLPSSPPSVGSVCRIMGWGKTIPTKEIYPDVPHCANINILDHA
Serineproteinase 3              SKHIAPLSLPSSPPSVGSVCRIMGWGAITSPNETYPDVPYCANIKLLRYS
                                * *** ******..:*.****:****   ...  :****:**:*::: :

Bhalternin                      VCREAHGGLPATSRTLCAGILEGGKDSCQGDSGGPLICNGQFQGILSWGV
Serineproteinase-like           VCRAAYPWQPVSSTTLCAGILQGGKDTCWGDSGGPLICNGEFQGIVSWGA
LV-PA                           VCRAAYSGWLATSTTLCAGILEGGKDSCHGDSGGPLICNGQFQGIVSLGR
Serineproteinase isoform 4      VCQAAYPSLTATSGTLCAGILEGGKDACGGDSGGPLICNGEIQGIVSGGE
Haly-PA                         VCRAAYPVLLAGSSTLCAGTQQGGKDTCVGDSGGPLICNGQIQGIVSWGA
Plasminogen activator           VCRAAYPVLLAGSSTLCAGTQQGGKDTCVGDSGGPLICNGQIQGIVSWGA
CL2                             LCRAVYVGMPAQSRILCAGILQGGIGSCQGDSGGPLICNGQFQGIVSATS
TSV-PA                          VCRTAYSWRQVANTTLCAGILQGGRDTCHFDSGGPLICNGIFQGIVSWGG
Serineproteinase 3              LCR-VYQRMPAQSRILCAGILQGGKGICKGDSGGPLICNGQFQGIVHGGG
                                :*: .:    . .  ****  :** . *  ********** :***:

                                                                        Identity%
Bhalternin                      HPCGQPHKPGVYTKVSDYSEWIQSIIAGNTDVTCPP      --
Serineproteinase-like           HPCGQPHNPGVYTKVSDYTEWIKSIIAGNTAAACPP      72
LV-PA                           HPCGHPDEPGVYTKVFDYTDWIQSIIAGNTDAACPP      72
Serineproteinase isoform 4      HPCGQVLTPGFYTTVFDYIDWIQSIIAGNTDATCPP      70
Haly-PA                         HPCGQGSKPGVYTKVFDHLDWIKSIIAGNTAVTCPP      67
Plasminogen activator           HPCGQGSKPGVYTKVFDHLDWIKSIIAGNTAVTCPP      67
CL2                             KPCAHSLMPALYIKVFDYTDWIKSIIAGNTTVTCPP      66
TSV-PA                          HPCGQPGEPGVYTKVFDYLDWIKSIIAGNKDATCPP      66
Serineproteinase 3              KTCAQPYEPGLYIKVFDYTDWIQNIIAGNTTATCPP      65
                                :.*.:   *..* .* *: :**:.*****. .:***
```

Figure 5

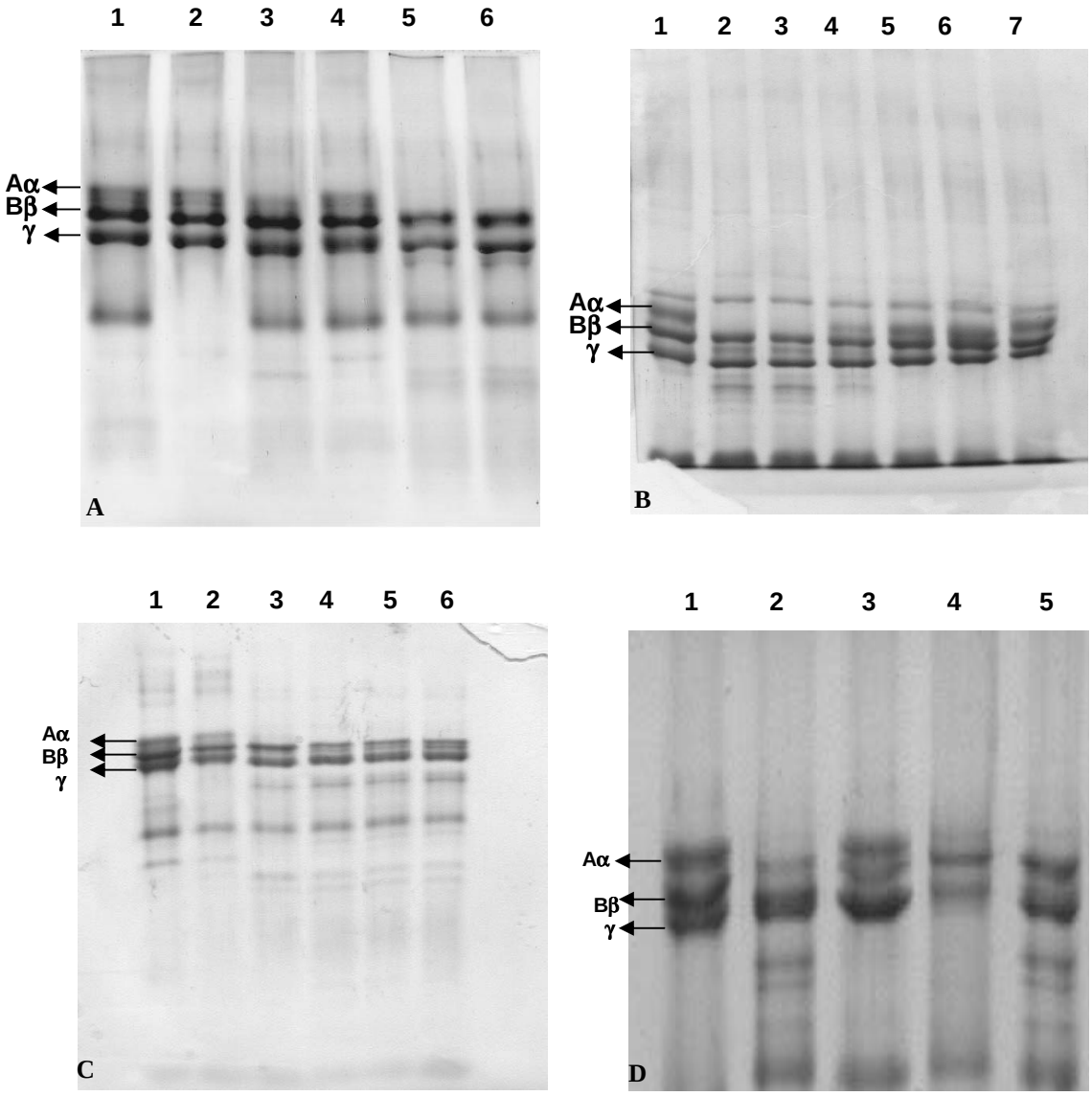
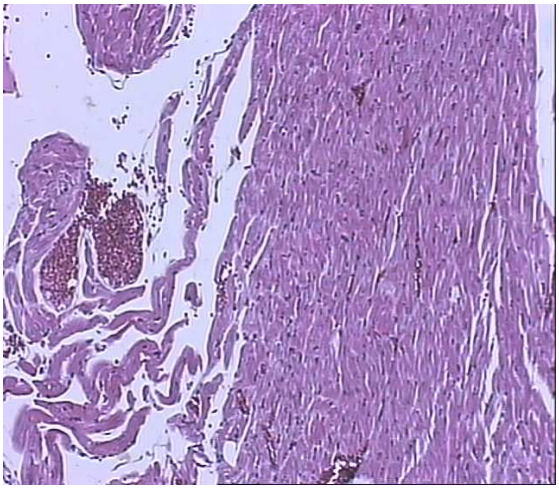
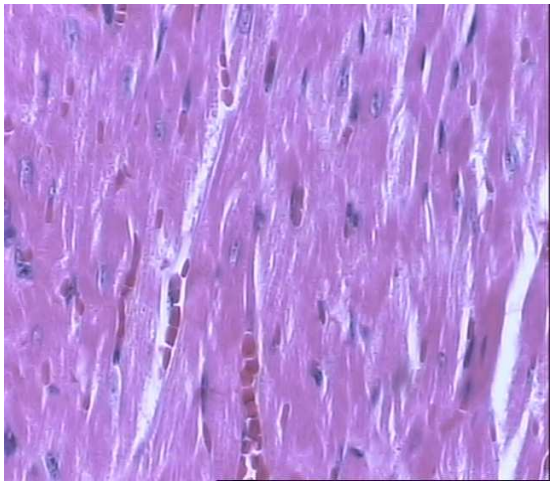


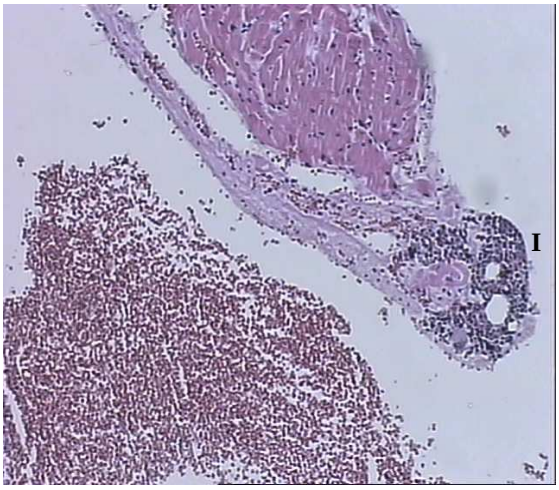
Figure 6



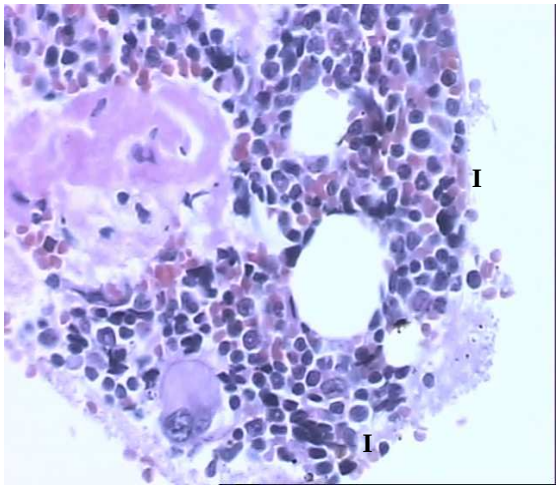
(A)



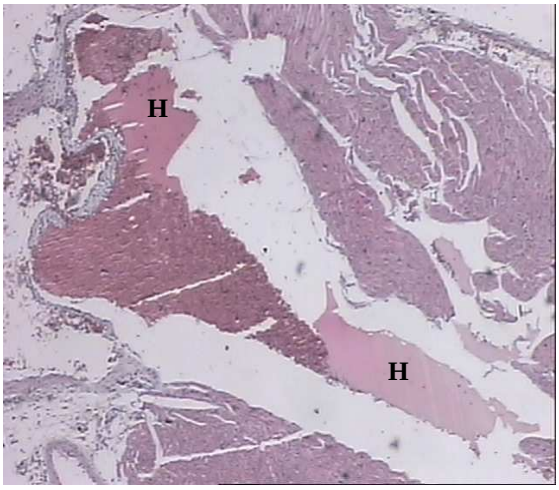
(B)



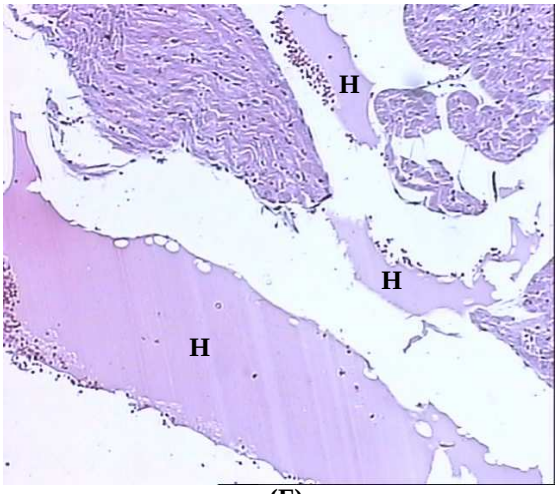
(C)



(D)

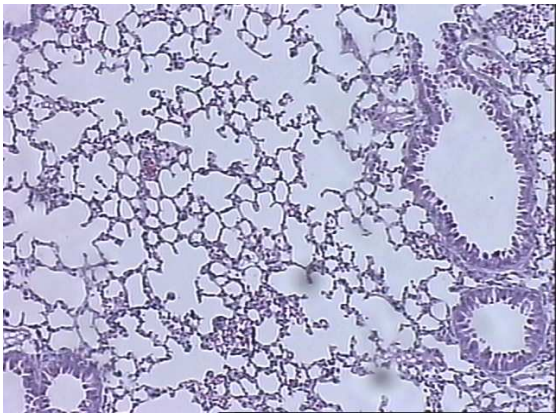


(E)

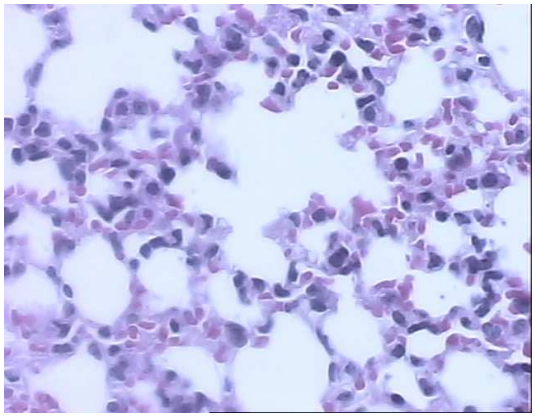


(F)

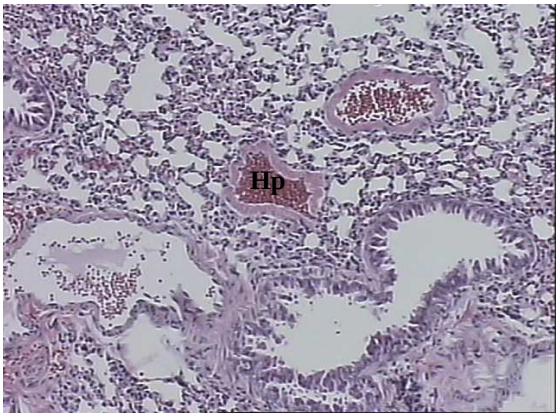
Figure 7



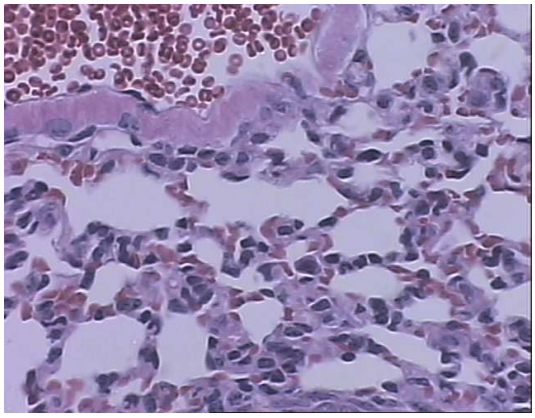
(A)



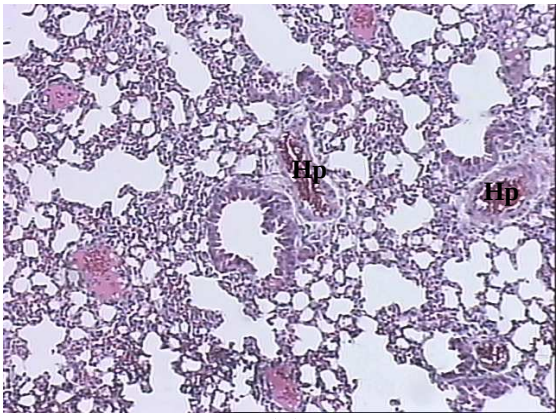
(B)



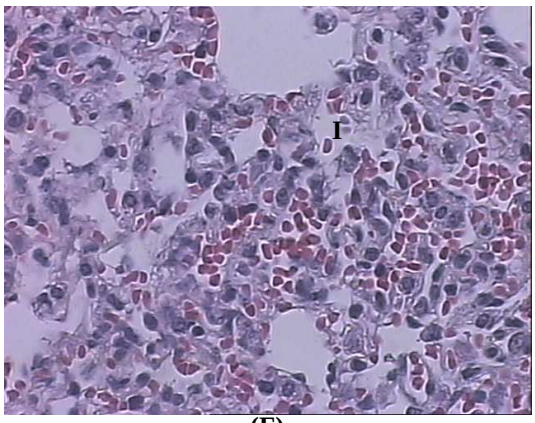
(C)



(D)



(E)



(F)

Figure 8

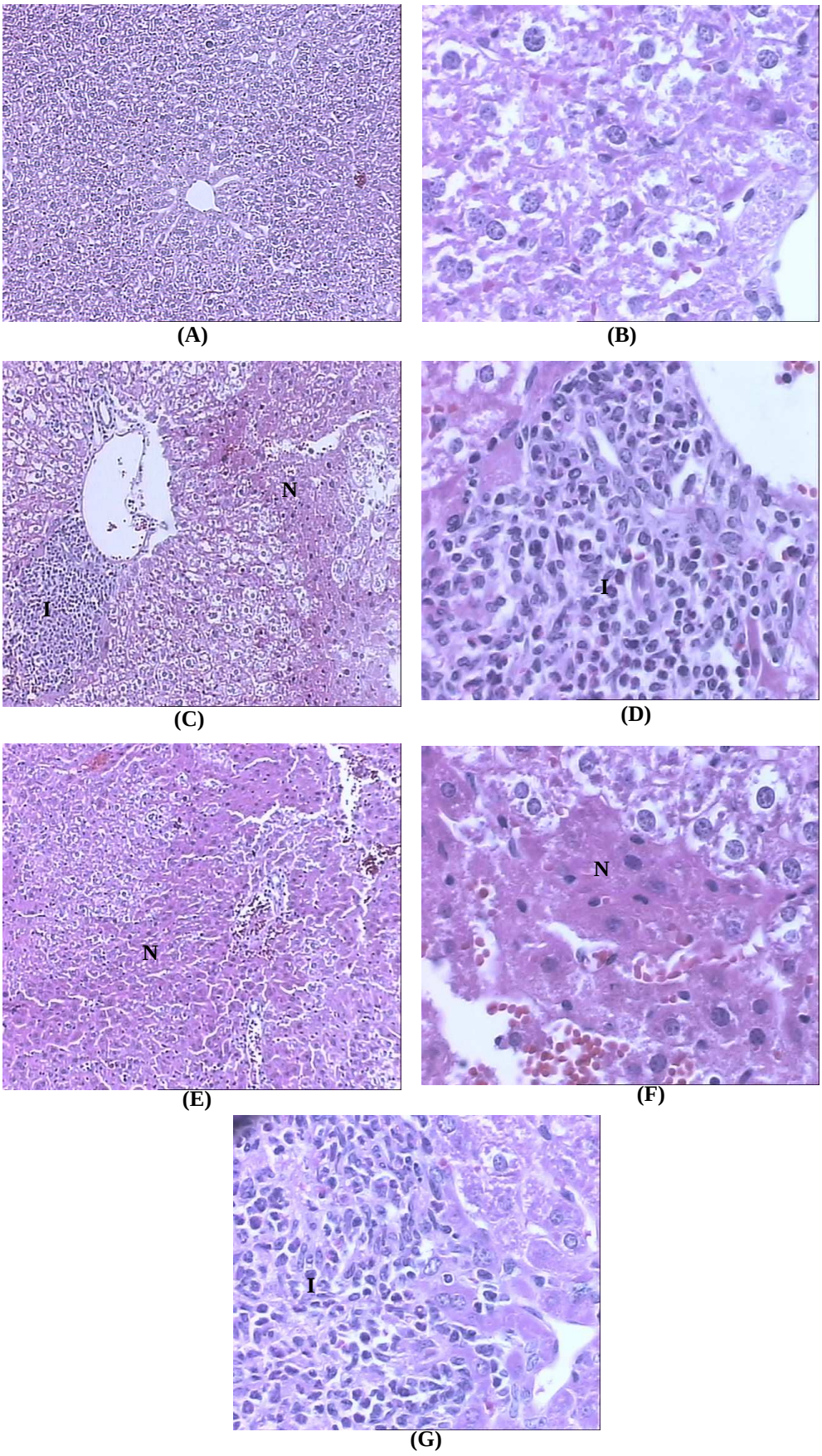
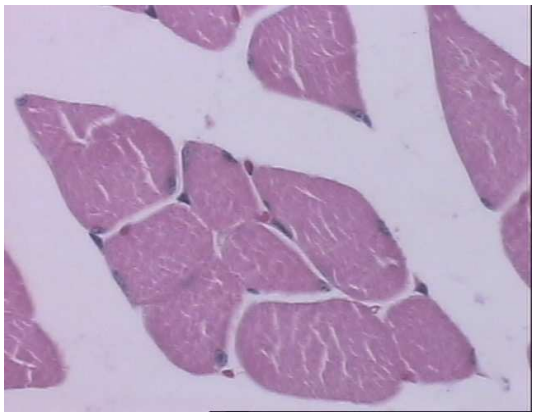
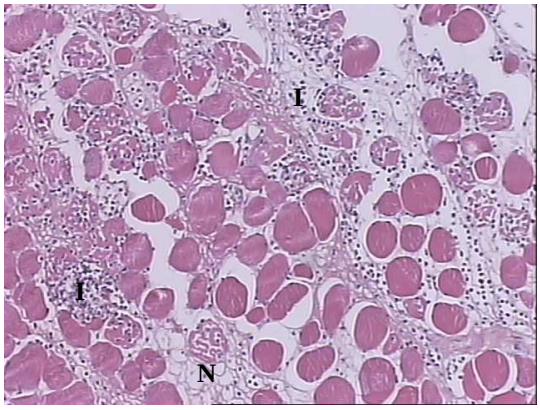


Figure 9

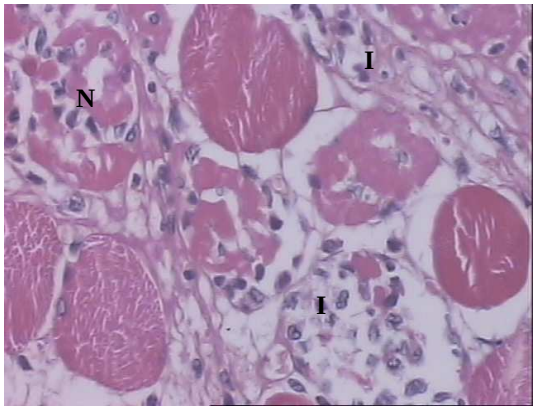
(A)



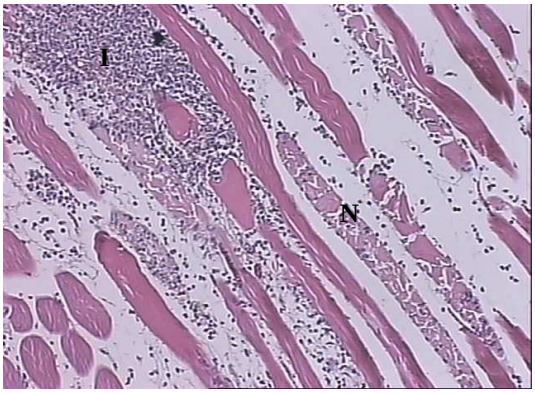
(B)



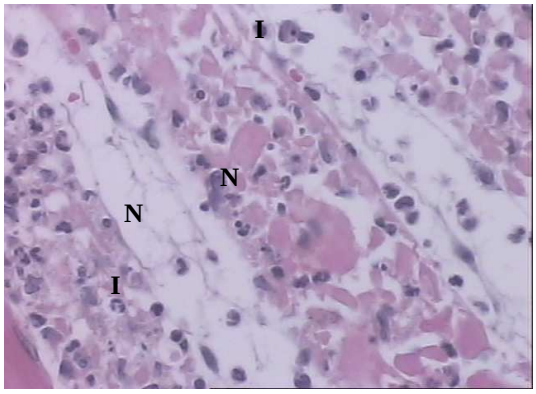
(C)



(D)



(E)



(F)

Capítulo III

Purification and biochemical characterization of Eumiliin from *Euphorbia milii* var. *hislopii* latex

Purification and biochemical characterization of Eumiliin from *Euphorbia milii* var. *hislopii* latex

K. C. Fonseca [a], N.C. G. Morais [a], M. R. Queiroz [a], M. C. Silva [a], M. S. Gomes [a], J. O. Costa[b,c] , C. C. N. Mamede [a], F. S. Torres [d], N. Penha-Silva [b], M. E. Beletti [a], H. A. N. Canabrava [a] , F. Oliveira [a]*

[a] *Institute of Biomedical Sciences, Federal University of Uberlândia, Uberlândia, MG, Brazil.*

[b] *Institute of Genetics and Biochemistry, Federal University of Uberlândia ,Uberlândia, MG, Brazil.*

[c] *Federal Institute of Education, Science and Technology of Triângulo Mineiro, Ituiutaba, MG, Brazil*

[d] *Institute of Biological Sciences, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, MG ,Brazil.*

* Corresponding author: Tel: +55 34 32182200; Fax: +55 34 32182200.

E-mail address: foliveira@umuarama.ufu.br (F. Oliveira)

Abstract

A protease, which we designate Eumiliin, was isolated from the latex of *Euphorbia milii* var. *hislopii* by a combination of ion-exchange chromatography using DEAE-Sephacel and gel filtration with Sephadex G-75. Eumiliin is a monomeric protein with an apparent molecular mass of 30 kDa by SDS–PAGE under reducing conditions and gave one main peak at 29814 kDa in MALDI-TOF/TOF mass spectrometry. Eumiliin has caseinolytic and fibrinogenolytic activities, but no hemorrhagic or defibrinating activities. The enzyme readily hydrolyzes the Aα-chain of fibrinogen and, more slowly, the Bβ-chain. Its fibrinogenolytic activity is inhibited by β-mercaptoethanol and leupeptin. In contrast, EDTA and benzamidine did not affect the activity of Eumiliin. The caseinolytic activity of Eumiliin had a pH optimum of 8.0 and was stable in solution at up to 40 ℃; activity was completely lost at ≥ 80 ℃. Intraplantar injection of Eumiliin (1–25 μg/paw) caused a dose- and time-dependent hyperalgesia, which peaked 1 - 5 h after enzyme injection. Intraplantar injection of Eumiliin (1–25 μg/paw) also caused an oedematogenic response that was maximal after 1 h. Morphological analyses indicated that Eumiliin induced an intense myonecrosis**,** with visible leukocyte infiltrate and damaged muscle cells 24 h after injection.

Keywords: *Euphorbia milii*; Crown-of-Thorns; Euphorbiaceae; cysteine protease; eumiliin.

Resumo

A protease, designada de eumilina, foi isolada do látex de *Euphorbia milii* var. *hislopii* pela combinação de duas etapas cromatográficas: troca iônica (DEAE-Sephacel) e filtração em gel (Sephadex G-75). A eumilina é uma proteína monomérica com massa molecular aparente de 30 kDa quando analisada em SDS-PAGE sob condições redutoras e apresentou um pico principal de 29,814 kDa em espectrometria de massa MALDI-TOF/TOF. A eumilina apresentou atividades caseinolítica e fibrinogenolítica, mas não desencadeou atividade hemorrágica ou desfibrinogenante. Esta protease hidrolisa preferencialmente a cadeia Aα do fibrinogênio e, mais lentamente, a cadeia Bβ. A atividade fibrinogenolítica foi inibida por β-mercaptoetanol e leupeptina. Em contraste, o EDTA e a benzamidina não afetaram a referida atividade. A ação proteolítica da eumilina sobre a caseína apresentou pH ótimo igual a 8,0 e foi estável em solução até 40 ℃; perdendo completamente a atividade em temperatura ≥ 80 ℃. A injeção Intraplantar de eumilina (1–25 µg/pata) causou hiperalgesia dose e tempo-dependente, com pico entre 1 a 5 h após injeção de enzima. Da mesma forma, causou resposta edematogênica máxima após 1 h. A análise morfológica indicou que a eumilina induziu mionecrose intensa, com infiltrado leucocitário e danos em células musculares cerca de 24 h após a injeção.

Palavras-chave: *Euphorbia milii*; Coroa-de-cristo; Euphorbiaceae; cisteíno-protease, Eumiliin.

1. Introduction

The Euphorbia genus comprises a large and diverse group of plants which are characterized by the presence of a milky white latex. Latex is an aqueous emulsion found in the vacuole of specialized secretory cells known as laticifers, which contain lipids, rubbers, resins, and sugars, as well as many proteins and enzymes (i.e., peroxidases, proteases, esterases, and phosphatases) (Moussaoui et al., 2001; Hasma and Subramanian, 1986; Lynn and Clevette-Radford, 1987). Due to its potential medical applications, the *Euphorbia* genus has been the subject of abundant phytochemical and pharmacological research. Indeed, extracts of numerous species have been found to demonstrate a number of interesting biological activities as antibacterial agents (Lirio et al., 1998), molluscicides (Jurberg et al., 1985; Tiwari et al., 2003), antiherpetics (Betancur-Galvis et al., 2002) and anti-mutagenics (Rezende et al., 2004). Extracts also exhibit co-carcinogenic (Gscwhenot and Hecker, 1969) and anticarcinogenic activities (Hecker, 1968). Some Euphorbia species are used in folk medicines to cure skin, ophthalmologic, and genitourinary diseases, gonorrhea, migraines, intestinal parasites, warts, rheumatism, snakebites and obstipation (Singla and Pathak, 1990; Vlietink, 1987; Jain, 1996; Bhatnagar et al., 2000).

A wide range of medicinally important applications have been reported for *Euphorbia milii*, a flowering plant native to Inselberge, located in the Central Plateau of Madagascar, Africa. *E. milii* is an exotic, decorative plant and its distribution is cosmopolitan (Baptista et al., 1992). In Brazil, where *E. milii* is popularly known as ‘Crown-of-Thorns’, there have been anecdotal reports on the use of its milky sap for cosmetic purposes (e.g. face skin peeling). The embryofeto-toxicity of the latex of this plant is useful for controlling mollusks, and it is frequently used in traditional medicine to treat liver fluke, as well as schistosomiasis in sheep, cattle, and even humans (Souza et al., 1997; Schall et al., 2001; Subhash and Jagannadham, 2008). Among Euphorbia species, the latex of *E. milii* was found to be the most effective (Vasconcellos and Schall, 1986; Mendes et al., 1997; Schall et al., 1998). In earlier work, Subhash et al. (2006) purified a highly stable glycosylated serine protease from *E. milii* with potential applications in food industry. However, the proteins and other biochemical

constituents of the latex have not been investigated in detail. In this paper, we report the isolation and biochemical characterization of a new protease from this medicinal plant.

2. Results and discussion

2.1 Purification and biochemical characterization of Eumiliin

Dialyzed crude latex from *E. milii* was fractionated using a DEAE Sephacel column, which resolved into ten peaks (Fig. 1A). All peaks were tested for proteolytic activity against bovine fibrinogen. Of these ten peaks, the second and sixth peaks showed potent fibrinogenolytic activity. The fraction corresponding to peak 6 (Ep6) was further analyzed using size-exclusion chromatography (Sephadex G-75), and four fractions (peaks) of proteins were observed (Fig. 1B). The third peak, which contains the protease designated Eumiliin, showed fibrinogenolytic and caseinolytic activities. However, no defibrinating or hemorrhagic activities were detected.

The purified protein which represents nearly 5% of *E. milii* crude latex, had an apparent molecular mass of ~28 kDa under non-reducing conditions and ~30 kDa under reducing conditions, as estimated by SDS-PAGE (Fig. 2A). The difference in apparent molecular mass suggests a partial unfolding of Eumiliin by reduction of the disulfide bonds. Analysis by MALDI-TOF MS indicated a molecular mass of the purified protein of 29814 kDa, in the range of 30000 m/z. (Fig. 2B). The amino terminal sequence of the first 12 residues of Eumiliin was determined by Edman degradation as ala-phe-leu-leu-gln-ile-ile-val-tyr-pro-pro-asn. This N-terminal sequence of Eumiliin was aligned with some other serine, cysteine and aspartic proteases from plants and presented in Table I. The N-terminal sequence of Eumiliin does not resemble with the sequences of any known plant protease. Similarly no homology with the sequences of similar proteases from the latex of the plants of other euphorbia family was found, making Eumiliin a unique protein.

Little information is available about proteases present in the latex of the *E. milii*. Subhash et al. (2006) and Moro et al. (2008) have reported other proteases

isolated from the same source with similar names: Milin (serine protease) and Miliin (thiol-dependent serine protease), respectively. The molecular mass of Eumiliin by SDS-PAGE was different to the 51 kDa and 79 kDa reported for Milin and Miliin, respectively. In agreement with those enzymes, Eumiliin also gave a single band in the presence of β-mercaptoethanol, as also reported for other high molecular mass protease purified from the latex of *Euphorbia supina* (Arima et al., 2000).

Eumiliin was active against bovine fibrinogen. Fibrinogen degradation by Eumiliin was determined by incubation for 5, 30, 60, 90 and 120 min. The products obtained from the reaction mixtures were analyzed by SDS-PAGE under reducing conditions. As the concentration of higher molecular mass protein decreased with increasing digestion time, the concentration of lower molecular mass products increased substantially. Among fibrinogen subunits, the Aα-chain, which contained no detectable carbohydrates, was found to be degraded preferentially. Fig. 3A shows that the enzyme degraded fibrinogen Aα-chain after 5 min of incubation. By contrast, the Bβ-chain, which contained carbohydrates, was degraded more slowly. However, the γ-chain, which also contained carbohydrates, was not degraded during the same incubation time. The fibrinogenolytic activity was used as a parameter for measuring the stability of the enzyme towards varying the temperature. The results demonstrated that the enzyme was active on the A-α and B-β chains of fibrinogen at temperatures between 30 and 70 ℃. Eumiliin was inactivated when subjected to a temperature greater than or equal to 80 ℃ (Fig. 3B). Milin and Miliin showed similar behavior, both with a temperature optimum around 60℃, but they are inactivated, when incubat ed of 80 ℃.

The mechanism of action of Eumiliin on the bovine fibrinogen is similar to several proteases from snake venom; it degrades the Aα-chain faster than the Bβ-chain, but does not degrade the γ-chain of fibrinogen. Snake venom contains a family of proteases that act upon different stages of blood coagulation (Stocker, 1990). Thrombin-like enzymes (Magalhães et al., 2007; Pan, 1999) and fibrino(geno)lytic enzymes (Matsui et al., 1998) can act on fibrinogen, leading to defibrinogenation of blood and a consequent decrease in blood viscosity (Chang and Huang, 1995) and increase in blood flow (Barrie and Schenk, 1976). Studies of the mechanism of action of snake venom thrombin-like enzymes have

established that they possess a fast and efficient antithrombotic activity, essentially reversing the fibrin clot formed when there is dysfunction of the haemostatic system. For this reason, these enzymes have been of great clinical interest, particularly for those enzyme preparations with a high degree of purity and devoid of other pharmacological effects. Paradoxically, purified snake venom fibrino(geno)lyitc enzymes have coagulant action *in vitro* and anticoagulant action *in vivo*.

Our results showed that Eumiliin hydrolyzed chains of the fibrinogen *in vitro* but not *in vivo*. In addition, Eumiliin did not cause defibrinogenation when administered i.p. to mice, making the plasma coagulable. This phenomenon may be explained by the possible inhibition *in vivo* of fibrinogenolytic activity by endogenous protease inhibitors present in the plasma of the mice.

Further characterization of proteolytic activities was performed in inhibitory assays using specific inhibitors of proteases. Figure 3C shows the effects of several inhibitors on the fibrinogenolytic activity of Eumiliin. Incubation of the purified enzyme for 15 min at 37 ℃ with leupeptin (1 mM) and β-mercaptoethanol (1 mM) completely abolished its fibrinogenolytic activity. These results suggest that Eumiliin belong to the cysteine protease family, although N-terminal sequence of Eumiliin does not resemble with the sequences of any known plant cysteine protease (Table I), and indicate that disulfide bonds seem to be essential for the full activity of the enzyme. EDTA did not affect the fibrinogenolytic activity of Eumiliin, indicating that Eumiliin is not a metalloprotease. Benzamidine is well known for inactivating trypsin, kallikrein, chymotrypsin, and plasmin; however, it did not affect the fibrinogenolytic activity of Eumiliin.

Most of the proteases isolated from latex are cysteine proteases, which resemble papaya proteases (Rowlings and Barrett, 1994) such as papain [EC3.4.22.2], chymopapain [EC 3.4.22.6], and caricain [EC3.4.22.30]. The latex of Moraceae and of some of the Euphorbiaceae, however, contain serine proteases (Lynn and Clevatte-Radford, 1986a, 1986b; Kaneda and Tominaga, 1975; Uchikoba et al., 1995).

The proteolytic activity of Eumiliin was also investigated using casein as a substrate at varying pH values. The enzyme effectively hydrolyzes substrates like casein over a broad pH range with an optimum activity of pH 8.0 (Fig. 4). Eumiliin

retains about 60% activity even at low pH (as low as 3.0). Further, the stability of Eumiliin is completely retained in the range of pH 3.0–10.0. Milin (Subhash et al., 2006) and Miliin (Moro et al., 2008) (proteases purified from the same latex) also retained their caseinolytic activities over a broad pH. Hydrolysis of casein indicated the presence of two pH optimum (pHs at 7.5 and 11) for the first enzyme and a maximum value around 8.0 for the second enzyme.

2.2 Characterization of effects *in vivo* induced by Eumiliin

We demonstrated that Eumiliin causes significant local hyperalgesia in the rat hind paw after intraplantar injection. In this study, the paw withdrawal reflex threshold following plantar mechanical stimulus was used to measure the noniceptive response stimulated with Eumiliin in rats. The threshold in the area of local tissue damaged created by Eumiliin was lower than the threshold of the contralateral paw injected with saline. The intraplantar injection of Eumiliin, therefore, caused a significant increase in sensitivity to pain. A conspicuous and similar hyperalgesic response was observed when doses of 1, 5 and 25 µg of Eumiliin were administered (Fig. 5A). The intensity of hyperalgesia induced by 25 µg/paw was higher than that induced by 1 or 5 µg/paw. The intensity of the hyperalgesia induced by 1 µg was not statistically different from that produced by 5 µg Eumiliin/paw. The peak of the hyperalgesic response occurred 1 - 5 h after enzyme injection, decreasing thereafter, and completely disappearing within 24 h. The injection of saline (control group) did not modify the pain threshold of the animals. Hyperalgesia was of a local nature, since the pain threshold measurements of non-injected, contralateral paws did not differ from pre-injection values (data not shown).

Eumiliin also induced footpad oedema, indicator of a local increase in vascular permeability. The intraplantar injection of Eumiliin (1, 5 and 25 µg/paw) in rats caused a dose- and time-dependent oedema. The maximum increase in hind-paw swelling occurred 1 h after enzyme injection, gradually decreased over the next 5 h, and completely disappeared within 24 h (Fig. 5B). Within this same period, a similar response was observed when doses of both 5 and 25 µg of Eumiliin were administered. The mechanism by which intraplantar injection of

Eumiliin causes pain and oedema is unknown. Additional studies are necessary to fully understand the oedema and hyperalgesic responses induced by Eumiliin.

Myonecrosis induced by Eumiliin injections (50 μg) was observed and followed by histopathological analysis of injected muscle sections, which were fixed for light microscopic examination 24 hr after injection. The control sample retained a normal appearance (Fig. 6AB). Exposure to Eumiliin extensively altered cellular morphology as denoted by hypercontracted and disorganized myofibrils, hallmarks of extensive myonecrosis. Inflammatory cells can be observed surrounding the altered striated muscle cells. Eumiliin induced an intense infiltration of inflammatory cells (predominantly polymorphonuclear leukocytes) and the degeneration of striated muscle cells, as characterized by the loss of myofibrils (Fig. 6CD). There was no evidence of vascular lesions or hemorrhage.

3. Conclusions

Little information is available regarding the biochemical activities present in the latex of the medicinal plant *Euphorbia milii*. In this work, we describe the isolation, general properties, and substrate specificity of a novel protease, Eumiliin, from the latex of the plant *Euphorbia milii.* The enzyme exhibits proteolytic activity and high stability over a broad range of pH and temperature. This protease was capable of provoking drastic degenerative events *in vivo*, including myonecrosis and inflammatory responses. Eumiliin caused formation of oedema and an increase in sensitivity to pain in mice.

Consistent with toxins isolated from snake venoms, Eumiliin presented fibrinogenolytic activity. Therefore, further characterization of potential pharmacological properties of Eumiliin may suggest therapeutically important applications as antithrombotic drugs.

4. Experimental

4.1 Materials

The DEAE Sephacel column and all chemicals used were of analytical reagent grade and purchased from Sigma Chemical Co. Sephadex G-75 matrix for

gel-filtration chromatography was purchased from Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden.

4.2 Latex preparation

The crude latex from *Euphorbia milii* was collected in a clean tube by breaking the twigs and petioles of the plant. This latex was diluted 4-fold with 0.05 M ammonium bicarbonate buffer, pH 7.8, mixed well, and stored at -20 ºC for 24 hours. The rubbery white material was removed, and the suspension was centrifuged at 5,000×*g* for 10 min at 4 ℃. The clear supernatant was dial yzed against the same buffer.

4.3 Estimation of protein concentration

Protein concentration was determined by the method of Itzhaki and Gill (1964), using bovine serum albumin as standard.

4.4 Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoreses (SDS-PAGE)

Electrophoresis using polyacrylamide gels (SDS–PAGE) was performed as described by Laemmli (1970) using 14% gels. Electrophoresis was carried out at 20 mA/gel in Tris–glycine buffer, pH 8.3, containing 0.01% SDS. The molecular mass standard proteins used were bovine serum albumin (66 kDa), egg albumin (45 kDa), carbonic anhydrase (30 kDa), soybean trypsin inhibitor (20.1 kDa) and α-lactoalbumin (14.4 kDa). The gels were stained with Coomassie blue. The relative molecular mass of the purified enzyme was estimated by Kodak 1D image analysis software.

4.5 Mass spectrometry analysis of Eumiliin

Mass spectrometry analyses (MALDI TOF/TOF MS) of Eumiliin were carried out using an Ultraflex II apparatus (Bruker Daltonics, Germany), controlled by the FlexControl 2.4.30.0 program (Bruker Daltonics, Germany). The samples were mixed with a saturated solution of matrix (α-cyano-4-hydroxycinnamic acid) (1:3) and were spotted (0.5 μL) on a plate of samples (MTP AnchorChip 600/ 384). The spectra of MS were obtained in positive/ reflected mode, and the frequency of the laser was adjusted to 50 Hz. The apparatus was calibrated with external

standards (Protein Calibration Standard I, Bruker Daltonics, Germany). The data were analyzed through the Flexnalysis 2.4 program (Bruker Daltonics, Germany). Alternatively, the data generated were converted to dta format and analyzed through the program PepSeq (Micromass, Great Britain).

4.6 Isolation of Eumiliin

The dialyzed latex from *Euphorbia milii* (200 mL) was clarified by centrifugation at 10,000 x*g* for 20 min. The supernatant solution was separated by chromatography on a DEAE-Sephacel column (1.7 x 15cm), initially equilibrated with 50 mM ammonium bicarbonate, pH 7.8 and eluted with a convex concentration gradient (50 mM – 1 M) of the same buffer. Fractions of 3.0 mL/tube were collected, their absorbencies at λ = 280 nm were read, and fractions those corresponding to peak Ep6 were pooled, lyophilized, dissolved in 50 Mm ammonium bicarbonate, pH 7.8. The pooled fractions were applied to a 1 x 100 cm Sephadex G-75 column, equilibrated with the same buffer. The flow rate was 20 mL/h and fractions of 3.0 mL were collected.

4.7 N-terminal sequencing

A PPSQ-33A (Shimadzu) automatic sequencer was used for the N-terminal sequencing (Santos-Filho et al., 2008). The phenylthyoidantoin (PTH) amino acids were identified by comparing their retention times with the 20 PTH-amino acid standard mixture. The peptides obtained were compared with the sequences of other related proteins in the SWISS-PROT/TREMBL databases using the FASTA and BLAST programs.

4.8 Proteolytic activity

4.8.1 Fibrinogenolytic activity

Fibrinogenolytic activity was assayed as described by Edgar and Prentice (1973), with slight modifications. Fibrinogen (5 µg) and enzyme were mixed 1:10 (w/w) and the mixture was incubated at 37℃, pH 8.0 , for different time intervals (5, 30, 60, 90 and 120 min). The reaction was stopped by the addition of an equal

volume of a denaturing buffer containing 2% sodium dodecyl sulfate (SDS) and 10% β-mercaptoethanol. Reaction products were analyzed by SDS–PAGE.

4.8.1.1 Heat and Inhibitor effects on fibrinogenolytic activity

The thermal stability of the Eumiliin was tested by incubating the enzyme in 0.1 M Tris–HCl buffer, pH 8.0 for 15 min at varying temperatures (30–80 ℃). Aliquots of the enzyme were taken at the end of specified time intervals and assayed for fibrinogenolytic activity at 37 ℃. Inhibition of fibrinogenolytic activity was assayed after pre-incubation of 5 μg of Eumiliin in 0.1 M Tris–HCl buffer, pH 8.0 for 30 min at 37 ℃ containing one of the following inhibitors: 8 mM ethylene diaminetetraacetic acid (EDTA), 4 mM benzamidine and 1 mM β-mercaptoethanol. Fibrinogenolytic activity was assayed as described above.

4.8.2 Caseinolytic activity

Proteolytic activity, using casein as substrate, was determined using procedures established by Lomonte and Gutiérrez (1983). One milliliter of protease solution (50 μg), was added to 1.0 mL of 1% casein solution in 0.1 M Tris–HCl buffer, pH 8.0. The mixture was incubated at 37 ℃ during for 30 min, and the reaction was stopped by addition of 5% Cl_3CO_2H (4mL). After a period of 30 min at room temperature, the tubes were centrifuged, the supernatant collected, and the absorbance determined by spectrophotometric measurement at 280 nm using a Speckol spectrophotometer. One unit of activity was defined as an increase of 0.01 absorbance units at 280 nm.

4.8.2.1 pH optimum

The caseinolytic activity of the Eumiliin was monitored at varying pH values, using the specified buffers in the respective pH range of 3–10. For pH 3–5: 0.2M sodium acetate buffer; pH 6–7: 0.2 M sodium phosphate buffer; pH 8–9: 0.2 M Tris (Cl^-) and for pH 10: 0.2 sodium borate buffer.

4.9 Hemorrhagic activity

Hemorrhagic activity was determined by the method of Nikai et al. (1984). Test solutions (50 μg) were subcutaneously injected into the dorsal skin of mice.

The skin was removed 5 hr later, and the diameters of the hemorrhagic spots were measured on the inside surfaces.

4.10 Defibrinating activity

Defibrinating activity was tested by the method of Gene et al. (1989), with slight modifications. Briefly, four Swiss mice (18 - 20 g) were injected i.p. with 5 μg of the Eumiliin, dissolved in 200 μL of saline. Control animals received 200 μL of saline. After one hour, animals were anesthetized with ether and bled by cardiac puncture. Whole blood was placed in tubes and kept at 25 - 30 ^{o}C until clotting occurred.

4.11 Histological examination of myonecrosis

Myotoxic activity was assayed on the basis of the morphologic alterations induced by i.m. injections of 50 μg Eumiliin in the right gastrocnemius skeletal muscle of Swiss male mice (18–22 g, n=4). After 24 h, the animals were sacrificed by deep anesthesia with ethyl ether, and a small section of the central region of the muscle was excised and soaked in fixing solution (10% HCHO in PBS, v/v). The material was then dehydrated with increasing concentrations of EtOH and processed for inclusion in paraffin. The resulting blocks were sliced in 2.5 μm thick sections, stained with 0.25% (w/v) hematoxin–eosin and examined under a light microscope (Rodrigues et al., 2001).

4.12 Evaluation of oedema formation

Eumiliin was dissolved in sterile saline solution (0.15 M NaCl), and 0.1 mL of the final solution containing various concentrations of Eumiliin (1, 5 and 25 μg) was injected into the subplantar surface of one hind paw of the groups of five Wister male rats. An equal volume of saline was injected into the contralateral paw (control). The volume increase (oedema) of both paws was measured with the aid of a low-pressure pachymeter (Mitutoyo, Japan), at several intervals following injection (0, 1, 2, 3, 4, 5 and 24 hours). Results were calculated as the difference between the values obtained in both paws and expressed as the percentage increase in paw volume.

4.13 Evaluation of hyperalgesia

The animals were injected with either 0.1 mL of sterile saline solution (0.15 M NaCl) (control group) or 0.1 mL of saline solution containing various concentrations of Eumiliin (1, 5 and 25 μg) into the subplantar surface of one hind paw. The contralateral paw was not injected. The pain threshold was measured at varying time points after Eumiliin or saline injection using an Insight pressure apparatus, essentially as described by Randall and Selitto (1957). Briefly, a force (in g) with increasing magnitude was applied to the paw. When the animals reacted by withdrawing the paw, the force needed to induce such response was recorded and represented the pain threshold. To reduce stress, the rats were habituated to the apparatus one day before the experiments. Carrageenin (200 μg/paw), a known hyperalgesic agent, was used as positive control.

Acknowledgments: This work was supported by the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) and Universidade Federal de Uberlândia.

References

Arima, K., Uchikoba, T., Yonezawa, H., Shimada, M., Kaneda, M., 2000a.Isolation and characterization of a serine protease from the sprouts of *Pleioblastus hindsii* Nakai. Phytochemistry 54, 559-565.

Arima,K., Uchihoba, T., Yonezawa,H., Shimada,M., Kaneda,M., 2000b. Cucumisin-like protease from the latex of *Euphorbia supine*. Phytochemistry 53, 639-644.

Baptista, D.F., Vasconcellos, M.C., Lopes, F.E.F., Silva, I.P., Schall, V.T., 1992. Evaluation of the molluscicidal property of *Euphorbia splendens* var. hislopii (N.E.B.) (Euphorbiaceae) – 2, Investigation in lotic habitat. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 87, 549-553.

Barrie W.W., Schenk, W.C., 1976. Improvement in blood flow through a critical arterial stenosis by defibrination with ancrod. Archives of Surgery 5, 561-. 563.

Betancur-Galvis, L.A., Morales, G.E., Forero, J.E., Roldan, J., 2002. Cytotoxic and antiviral activities of Colombian medicinal plant extracts of the *Euphorbia genus*. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 97, 541-546.

Bhatnagar, V.P., Anil, K., Srivastava, J.N., 2000. Wild medicinal herbs of Agra. Journal of Medicinal and Aromatic Plant Sciences 22, 464- 467.

Chang, M.C., Huang, T.F., 1995. The antiplatelet activity of ancrod on administration to rabbits. Journal of Laboratory and Clinical Medicine 125**,** 508-516.

Devaraj, K.B., Gowda, L.R., Prakash, V., 2008. An unusual thermostable aspartic protease from the latex of *Ficus racemosa* (L.). Phytochemistry 69, 647-655.

Domingos, A., Cardoso, P.C., Zhong-tian X., Clemente, A., Brodelius, P.E., Pais, M.S., 2000. Purification, cloning and autoproteolytic processing of an aspartic proteinase from *Centaurea calcitrapa*. European Journal of Biochemistry 267, 6824-6831.

Edgar, W., Prentice, C.R.M., 1973. The proteolytic action of ancrod on human fibrinogen and its polypeptide chains.Thrombosis Research 2, 85.

Gene, J.A., Roy, A., Rojas, G., Gutiérrez, J. M., Cerdas, L., 1989. Comparative study on coagulant, defibrinating, fibrinolyic and fibrinogenolytic activities of Costa Rican crotaline snake venoms and their neutralization by a polyvalent antivenom. Toxicon 27, 841-848.

Gscwhenot, M., Hecker, E., 1969. Tumor promoting compounds from *E. triangular*. Tetrahedron Letters 40, 3509- 3512 .

Hasma,H., Subramanian,A., 1986. Composition of lipids in the latex of *Hevea Brasiliensis* clone RRIM 501. Journal of Natural Rubber Research 1, 30- 40.

Hecker, E., 1968. Co-carcinogenic principles from seed oil of *Croton tiglium* and other Euphorbiaceae. Cancer Research 28, 2338- 2349.

Itzhaki, R.F., Gill,D.M., 1964. A microbiuret method for stimating proteins. Analytical Biochemistry 9, 401- 410.

Jain, S.K., 1996. Medicinal Plants, 6.ed. National Book Trust, New Delhi, India.

Jurberg, P., Cabral Neto, J.B., Schall, V.T., 1985. Molluscicide activity of the 'avelós' plant (*Euphorbia tirucalli*, L.) on *Biomphalaria glabrata*, the mollusk vector of schistosomiasis. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 80, 423- 427.

Kaneda, M., Tominaga, N., 1975. Isolation and characterization of a proteinase from the sarcocarp of melon fruit. Journal of Biochemistry 78, 1287-1296.

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

Liggieri, C., Arribére, M.C., Trejo, S.A., Canals, F., Avilés, F.X., Priolo, N., 2004. Purification and biochemical characterization of asclepain c I from the **latex** *Asclepias curassavica L*. Journal of Protein Chemistry 23**,** 403–411.

Liggieri, C., Obregón, W.D., Trejo, S.A., Priolo, N., 2009. Biochemical analysis of a papain-like protease isolated from the latex of *Asclepias curassavica L*., Acta Biochimica et Biophysica Sinica 41, 154–162.

Lirio, L.G., Hermano, M.L., Fontanilla, M.Q., 1998. Antibacterial activity of medicinal plants from the Philippines. Pharmaceutical Biology 36, 357-359.

Lomonte,B., Gutiérrez, J.M., 1983. La actividad proteolítica de los venenos de serpientes de Costa Rica sobre la caseína. Revista de Biología Tropical 31, 37-40.

Lynn, K. R., Clevatte-Radford, N., 1986a. Ficin E, a serine-centred protease from *Ficus elástica.* Phytochemistry 25, 1559-1561.

Lynn, K. R., Clevatte-Radford, N. A., 1986b. Hevains: Serine-centred proteases from the latex of *Hevea brasiliensis*. Phytochemistry, 25, 2279-2282.

Lynn,K.R., Clevatte-Radford, N. A., 1987. Biochemical properties of latices from the Euphorbiaceae. Phytochemistry 26, 939-944.

Magalhães, A., Magalhães, H.P.B., Richardson, M., Gontijo, S., Ferreira, R.N., Almeida, A.P., Sanchez, E.F., 2007. Purification and properties of a coagulant thrombin-like enzyme from the venom of *Bothrops leucurus*. Comp. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular and Integrative Physiology 146, 565-575.

Matsui, T., Sakurai,Y., Fujimura,Y., Hayashi,I., Oh-Ishi,S., Suzuki,M., Hamako, J., Yamamoto, Y., Yamazaki, J., Kinoshita, M., Titani, K., 1998. Purification and amino acid sequence of halystase from snake venom of *Agkistrodon halys blomhoffii*, a serine protease that cleaves specifically fibrinogen and kininogen. European Journal of Biochemistry 252**,** 569-575.

Mendes, N.M., Vasconcellos, M.C., Baptista, D.F., Rocha, R.S., Schall, V.T., 1997. Evaluation of the molluscicidal properties of *Euphorbia splendens* var. hislopii (N.E.B.) latex. Experimental test in an endemic area in the State of Minas Gerais, Brazil. Memórias do Insituto Oswaldo Cruz 92, 719-724.

Moussaoui, A.El., Nijs,M., Paul,C., Wintjens,R., Vincentelli,J., Azarkan,M., Looze,Y., 2001. Revisiting the enzymes stored in the laticifers of *Carica papa*ya in the context of their possible participation in the plant defence mechanism. Cellular and Molecular Life Sciences 58, 556-570.

Nikai, T., Mori, N., Kishida, M., Sugihara, H., Tu, A.T., 1984. Isolation and biochemical characterization of hemorrhagic toxin from the venom of *Crotalus atrox* (Western Diamondback Rattlesnake). Archives of Biochemistry and Biophysics 321, 309-319.

Pan, H., Du, X., Yang, G., Zhou, Y., Wu, X., 1999. cDNA cloning and expression of acutin. Biochemical and Biophysical Research Communications 255, 412- 415.

Randall,L.O., Selitto, J.J., 1957. A method for measurement of analgesia activity on inflamed tissue. Archives Internationales de Pharmacodynamie 3, 209-219.

Rezende, J.R., Rodrigues, S.B., Jabor, I.A.S., Pamphile, J.A., Rocha, C.L.M.S.C., 2004. Efeito antimutagênico do látex de *Euphorbia tirucalli* no sistema metionina em *Aspergillus nidulans.* Acta Scientiarum Biological Sciences 26, 481- 484.

Rodrigues, V.M., Soares, A.M. Andriao-Escarso, S.H. Franceschi, A.M. Rucavado, A. Gutierrez, J.M. Giglio, J.R., 2001. Pathological alterations induced by neuwiedase, a metalloproteinase isolated from *Bothrops neuwiedi* snake venom, Biochimie 83, 471- 479.

Rowlings, N. D., & Barrett, A. J.,1994. In A. J. Barrett, Methods in Enzymology (pp.19-61). New York: Academic Press.

Schall, V.T., de Vasconcellos, M.C., de Souza, C.P., Baptista, D.F., 1998. The molluscicidal activity of Crown of Christ (*Euphorbia splendens* var. hislopii) latex on snails acting as intermediate hosts of *Schistosoma mansoni* and *Schistosoma haematobium*. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 58, 7-10.

Schall, V.T., Vasconcellos, M.C., Rocha, R.S., Souza, C.P., Mendes, N.M.., 2001.The control of the scistosome-transmitting snails *Biomphalaria glabrata* by the plant molluscicide *Euphorbia splendense* var. hislopii (syn milii Des. Moul): a longitudinal field study in an endemic area in Brazil. Acta Tropica 79, 165-170.

Singla, A.K., Pathak, K.,1990. Phytoconstituents of Euphorbia species. Fitoterapia 61, 483-516.

Souza, C.A.M., de-Carvalho, R.R., Kuriyama, S.N., Araujo, I.B., Rodrigues, R.P., Vollmer, R.S., Alves, E.N., Paumgartten, F.J.R., 1997. Study of the embryofeto-toxicity of crown of thorns (*Euphorbia milii*) latex, a natural molluscicide. Brazilian Journal of Medical and Biological Research 30, 1325-1332.

Stocker, K.F., 1990. Snake venom proteins affecting hemostasis and fibrinolysis. In: Stocker, K.F., Editor, Medical Use of Snake Venom Proteins, CRC Press, Boca Raton, 97-160.

Subhash C. Y., Monu P., Jagannadham,M.V., 2006. Highly stable glycosylated serine protease from the medicinal plant *Euphorbia milii*. Phytochemistry 67, 1414-1426.

Subhash C. Y., Jagannadham,M.V., 2008. Physiological changes and molluscicidal effects of crude latex and Milin on *Biomphalaria glabrata*. Chemosphere 71, 1295-1300.

Tiwari, S., Singh, P., Singh, A., 2003. Toxicity of *Euphorbia tirucalli* plant against freshwater target and non-target organisms. Pakistan Journal of Biological Sciences 6, 1423-1429.

Trejo, S.A., López, L.M., Caffini, N.O., Natalucci, C.L., Canals, F., Avilés, F.X., 2009. Sequencing and characterization of asclepain f: the first cysteine peptidase cDNA cloned and expressed from *Asclepias fruticosa* latex, Planta 230, 319–328.

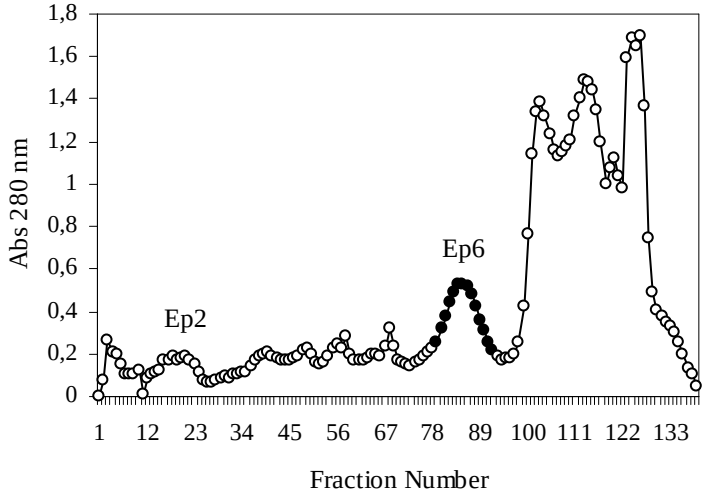
Uchikoba, T., Yonezawa, H., Kaneda, M., 1995. Cleavage specificity of cucumisin, a plant serine protease. Journal of Biochemistry, 117, 1126-1130.

Vasconcellos, M.C., Schall, V.T., 1986. Latex of ‘‘crown of Christ” (*Euphorbia splendense*): an effective molluscicide. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 81, 475-476.

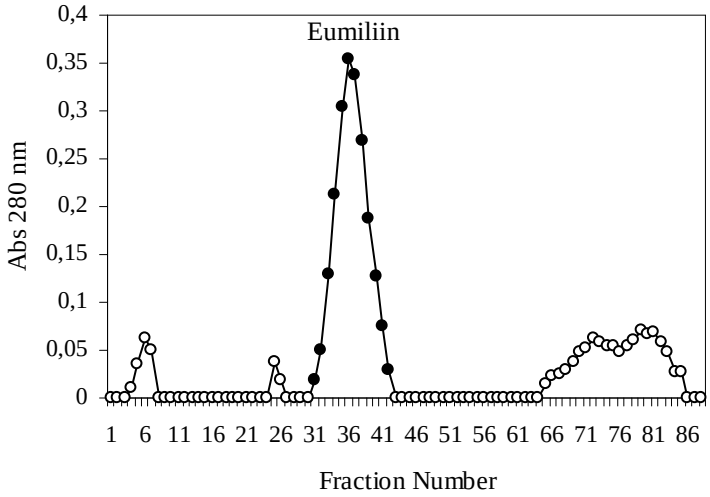
Vlietink, K.J., 1987. In: Hostettmann, K., Lea, P.J. (Eds.), Biologically active substances from traditional drug Biologically active natural product. Oxford Science Publications, Oxford.

Wilcoxon, F., 1945. Individual comparisons by ranking methods. Biometrics 1, 80-83

Yamagata, H., Masuzawa, T., Nagaoka, Y., Ohnishi, T., Iwasaki, T., 1994. Cucumisin, a serine protease from melon fruit, shares structual homology with subtilisin and is generated from a large precursor. Journal of Biological Chemistry 269, 32725–32731



A



B

Figure 1. Purification of Eumiliin from *Euphorbia milii* latex: (A) Separation on DEAE-Sephacel: Dialyzed latex from *Euphorbia milii* (200 mL) was applied to the column (1.7 x 15 cm) with elution carried out at a flow rate of 20 mL/h with ammonium bicarbonate gradient buffer, pH 7.8, from 50 mM to 1 M. **(B)** Separation on Sephadex G-75: the active fraction (Ep6) applied on the column (1.0 x 100 cm) and elution with 50mM ammonium bicarbonate buffers at pH 7,8 was achieved at a flow rate of 20 mL/h. Fractions pooled are indicated by the closed circle. The second (Ep2) and sixth (Ep6) peaks and Eumiliin showed potent proteolytic activity on bovine fibrinogen.

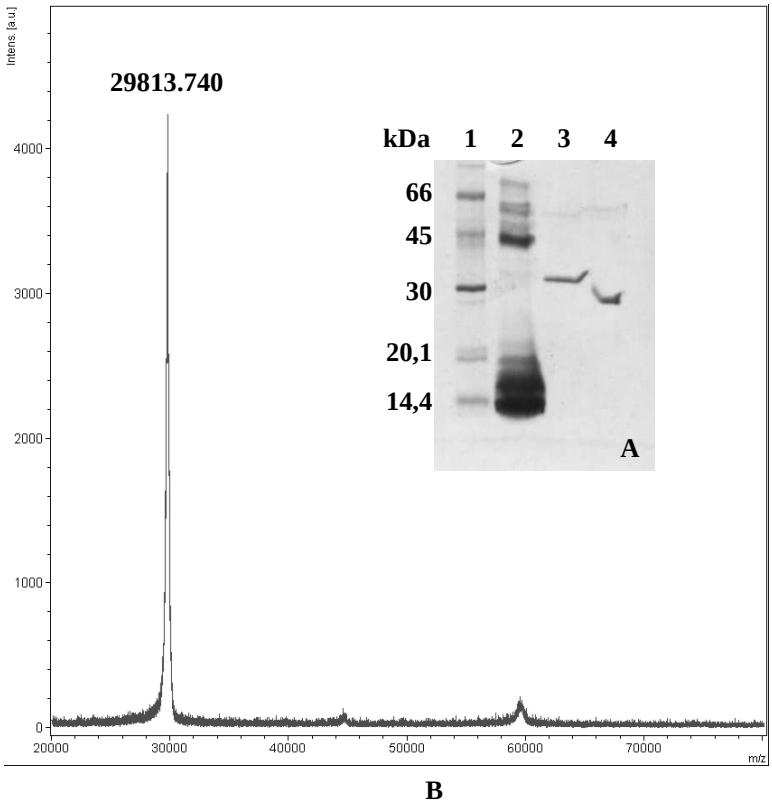


Figure 2. Molecular mass estimation using electrophoresis and mass spectrometry. **(A)** SDS-PAGE in 14 % (w/v) polyacrylamide, Tris- glycine buffer, pH 8.3, and 20 mA. Lanes: 1- Standard proteins (bovine serum albumin, 66 kDa; egg albumin, 45 kDa; carbonic anhydrase, 30 kDa; soybean trypsin inhibitor, 20.1 kDa and α-lactoalbumin, 14.4 kDa), 2- Reduced crude *Euphorbia milii latex*, 3- Reduced Eumiliin, 4 – Non - reduced Eumiliin. The gel was stained with Coomassie blue R-250. **(B)** Mass determination of Eumiliin by MALDI TOF/TOF mass spectrometry.

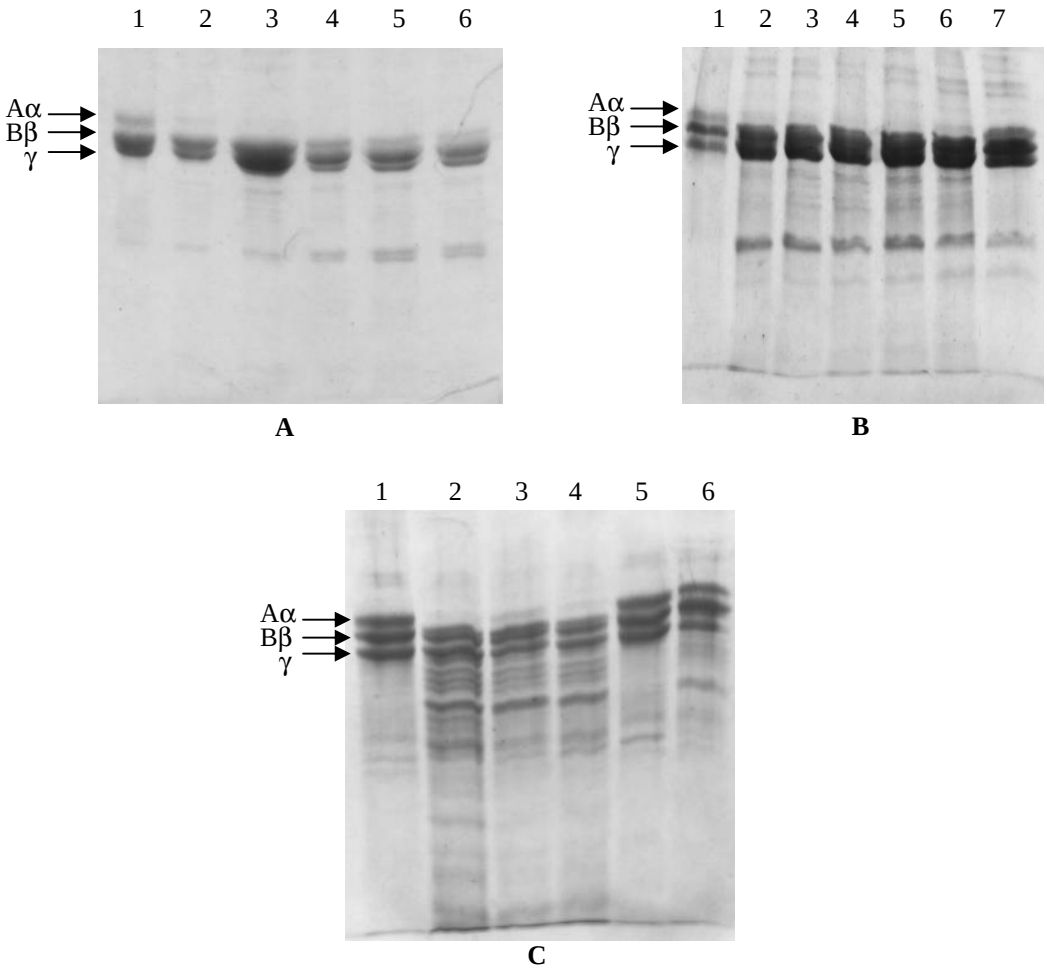


Figure 3. **Proteolysis of (A) bovine fibrinogen by Eumiliin.** Lanes: 1 - Control incubated without Eumiliin for 120 min; 2-6: control incubated with Eumiliin for 5, 30, 60, 90 and 120 min, respectively. **(B):** Effect of temperature on the stability of the Eumiliin. Lanes: 1-Control fibrinogen incubated without enzyme for 15 min; 2-7: control fibrinogen incubated with enzyme for 15 min at 30, 40, 50, 60, 70 and 80 ℃, respectively. **(C):** Effect of inhibitors on fibrinogenolytic activity of Eumiliin. Lanes: 1-Control fibrinogen incubated without enzyme for 60 min; 2 - control incubated with enzyme 120 min, 3-6: fibrinogen after incubation with Eumiliin and 8 mM EDTA, 4 mM benzamidine, 1 mM β-mercaptoethanol and 1 mM leupeptin for 120 min, respectively.

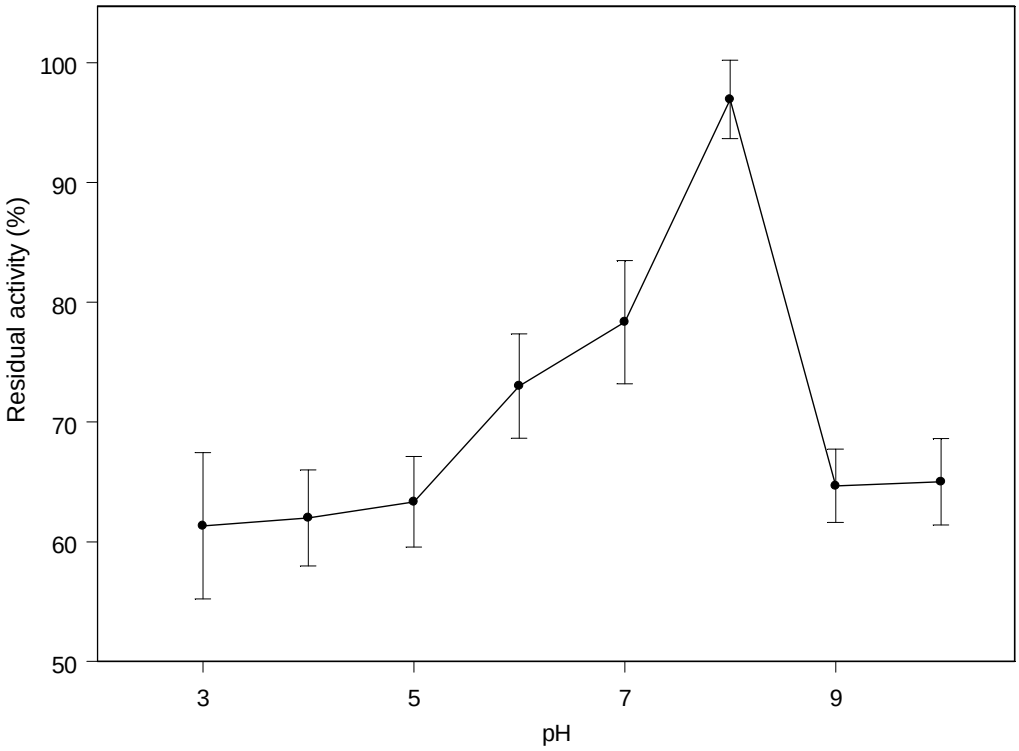


Figure 4. pH-dependence of proteolytic activity of Eumiliin. The caseinolytic activity of Eumiliin was determined over the pH range of 3–10 using a standard proteolytic assay. The points are the mean±std of three determinations.

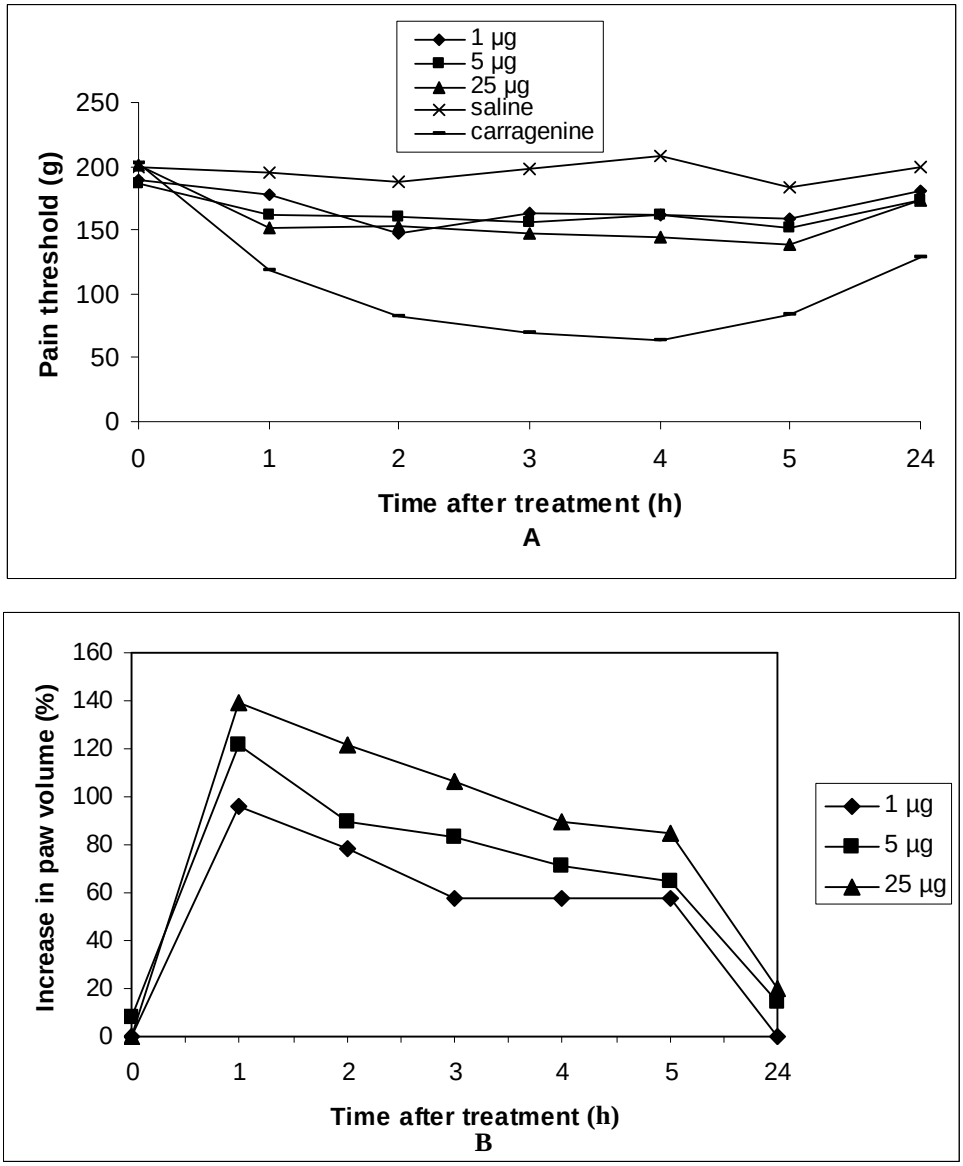


Figure 5. **(A)** Hyperalgesia induced by Eumiliin in rat hind paws. Decrease in threshold response was determined in hind paws before and at different times after either intraplantar injection of saline (control group) or of Eumiliin (1, 5 and 25 µg/paw). Sensitivity to pain was measured as the threshold response to pressure and expressed as g. When it was injected 1 µg/paw there is statistic difference between saline and Eumiliin with 2, 3 and 4 hours after injection. When 5 and 25 µg/paw were injected there are difference at all times tested (Wilcoxon Rank Test, $\alpha \leq 0.05$). **(B)** Oedema-forming activity of Eumiliin in mice. Induction of oedema by variable Eumiliin doses, injected s.c. in the footpad of mice. At various time intervals the increase in footpad weight, as compared to controls, was expressed as percent oedema. Each point represents the mean of five animals. All values were statistically different when compared three dosages with control group, returning to normal after 24 hours (Wilcoxon Rank Test, $\alpha \leq 0.05$).

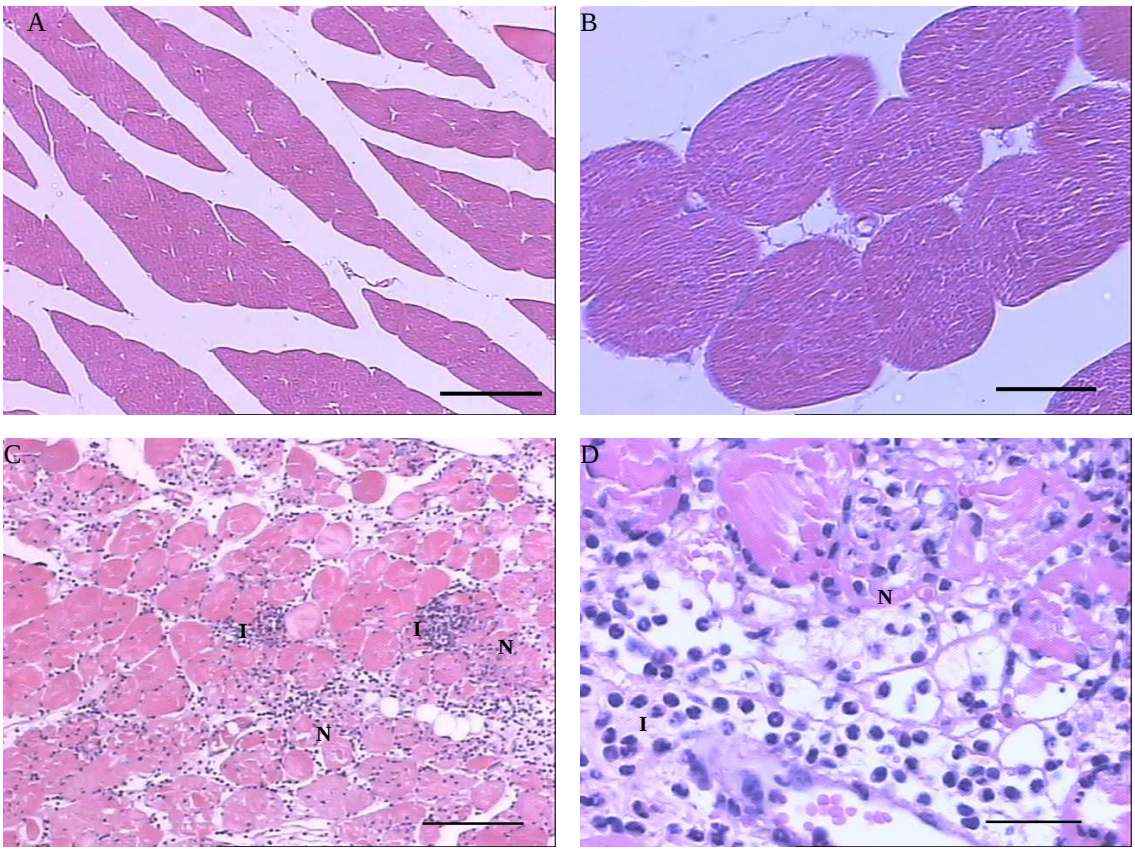


Figure 6. Histopathological analysis induced by Eumiliin. Light micrographs of sections of mouse gastrocnemius muscle 24 h after injection of 50 µg Eumiliin, dissolved in 100 µL saline, stained with hematoxin–eosin. (A and B) Control mice were injected with saline alone: normal integer fibers are seen. (C and D) Eumiliin: Necroses of muscle fibers are observed. Notice the presence of necrosis (N) and an abundant inflammatory infiltrate (I) (bar = 500 µm in A and C; bar = 100 µm in B and D).

Table I.

Amino terminal sequence of Eumiliin as compared to other proteases from plants

Plant source/enzymes	N-Terminal sequence												References
Eumiliin (*Euphorbia milii*)	A	F	L	L	Q	I	I	V	T	P	P	N	This work
Milin (*Euphorbia milii*)[a]	D	V	S	Y	V	G	L	I	L	E	T	D	Subhash et al. (2006)
Bamboo (*Pleioblastus hindsii* Nakai)[a]	T	T	R	T	P	N	F	L	G	L	V	D	Arima et al. (2000a)
Proteases B *(Euphorbia supina)* [a]	T	T	R	T	P	N	F	L	G	L	V	D	Arima et al. (2000b)
Melon fruit (Cucumisin)[a]	T	T	R	S	W	D	F	L	G	F	P	L	Yagmata et al. (1994)
White gourd protease[b]	T	T	R	S	W	D	F	L	N	F	P	Q	Uchikoba et al. (1998).
Asclepain c I (*Asclepias curassavica L.*) [b]	L	P	N	S	V	D	W	R	Q	K	G	V	Liggieri et al. (2004)
Asclepain f (*Asclepias fruticosa*) [b]	V	E	L	P	D	S	V	D	W	R	E	K	Trejo et al. (2009)
Ficus racemosa protease[c]	E	Q	E	L	E	Q	A	G	G	Y	L	A	Devaraj et al. (2008)
Chlapsin (*C. reinhardtii*) [c]	S	S	D	Q	G	Q	V	T	L	K	N	G	Domingos et al. (2000)
At-Asp 1 (*A. thaliana*) [c]	G	G	D	A	D	V	V	V	L	K	N	Y	Domingos et al. (2000)
Cardosin A (*C. cardunculus* L.) [c]	D	S	G	G	A	V	V	A	L	T	N	D	Domingos et al. (2000)

[a] Serine protease; [b]Cysteine protease; [c]Aspartic proteases

Capítulo IV

Análise comparativa das estabilidades da balternina e da eumilina

Resumo

A balternina e a eumilina são proteases extraídas da peçonha da serpente *Bothrops alternatus* e do látex de *Euphorbia milii* var. *hislopii*, respectivamente. As estabilidades da balternina e da eumilina contra a desnaturação pelo calor e por uréia foram determinadas e comparadas entre si. A protease vegetal mostrou-se mais resistente quando aquecida em altas temperatutas e também quando submetida à ação da uréia como desnaturante. Novos estudos serão importantes para melhor caracterizar as condições necessárias para estabilização dessas enzimas, especialmente aquelas relacionadas com as estratégias de proteção relacionadas ao transporte e estocagem nos processos comercial, terapêutico e biotecnológico.

Palavras-chave: estabilidade, proteases, titulação espectrofotométrica, temperatura, uréia.

Abstract

Bhalternin and Eumiliin are proteases extracted from the venom of *Bothrops alternatus* and latex of *Euphorbia milli* var. *hislopii*, respectively. The stabilities of Bhalternin and Eumiliin against denaturation by heat and urea were determined and compared. The plant protease proved to be tougher when heated at high temperatures and also when subjected to the action of urea as denaturant. Further studies are needed to better characterize the conditions for stabilization of these enzymes, especially those related to the strategies needed to protect the transport and storage in the commercial, therapeutic and biotechnological processes.

Keywords: stability, proteases, spectrophotometric titration, temperature, urea.

1. INTRODUÇÃO

O mecanismo de enovelamento protéico a partir de conformações desordenadas tem sido estudado há várias décadas. O estudo desse processo envolve todas as etapas que contribuem para que a biomolécula se enovele, possibilitando relacionar sua estrutura com a função que desempenha (KUMAR, YU, 2004).

A estrutura de uma proteína pode apresentar diferentes conformações, embora poucas correspondam a uma proteína funcional, representando o seu estado nativo. Já as conformações que correspondem a proteínas com pouca ou nenhuma funcionalidade pertencem ao estado desnaturado (BASKAKOV, BOLEN, 1998; TIMASHEFF, XIE 2003). A manutenção de uma proteína no estado nativo é de fundamental importância para a vida (FIELDS, 2001; SOMERO, 2003; YANCEY, 2004).

Seria de se esperar que uma proteína se mantivesse predominantemente no estado desnaturado, já que esse estado possui maior quantidade de possíveis conformações do que o estado nativo. Entretanto, há diversos fatores que asseguram a manutenção de uma proteína no estado nativo, como é o caso da presença de aminoácidos hidrofóbicos e ligações dissulfeto (BRANDEN, TOOZE, 1991).

Para que uma proteína permaneça estrutural- e funcionalmente ativa, o conteúdo de energia livre no seu estado nativo deve ser menor do que no estado desnaturado. Em relação aos seres vivos, a diferença de energia livre entre os estados (nativo e desnaturado) é muito pequena (BRANDEN, TOOZE, 1991), o que facilita a transição de uma proteína do estado nativo para o estado desnaturado e vice-versa. Portanto, ocorrerá um equilíbrio químico entre esses dois estados quando a transição de proteínas de um estado para outro for um processo reversível (TIMASHEFF, ARAKAWA, 1989; FONSECA et al., 2006).

É interessante destacar que no caso de proteínas globulares em água, os aminoácidos hidrofóbicos tendem a interagir mais intensamente entre si de modo a se protegerem do contato com o solvente aquoso. Isso caracteriza a interação hidrofóbica, que tem como conseqüência a formação de uma camada de água ao redor da proteína. Essa camada de água é menor quando esses aminoácidos se

escondem no interior da proteína, formando um núcleo hidrofóbico (TIMASHEFF, ARAKAWA, 1989; TIMASHEFF, XIE 2003; DIAS et al., 2010).

Em geral, as enzimas apresentam elevada atividade catalítica, embora sejam em sua maioria lábeis e, portanto, sensíveis às mudanças celulares e ambientais como extremos de temperatura, pH, pressão, presença de sais e solventes desnaturantes (YANCEY et al., 1982; KUMAR, 2009).

Os solventes desnaturantes, também conhecidos como agentes caotrópicos, são assim definidos pois favorecem o desenovelamento de proteínas, diminuindo a rigidez da camada de hidratação ao redor da mesma e, portanto, enfraquecendo as interações hidrofóbicas. Estudos de desenovelamento utilizando caotrópicos como hidrocloreto de guanidina e uréia são empregados na determinação da estabilidade conformacional protéica (PACE, 1986; YAO, BOLEN, 1995).

Estudos envolvendo dinâmica molecular mostram que a uréia é capaz de deslocar moléculas de água da camada de hidratação que se formaria ao redor de aminoácidos hidrofóbicos **(Figura 1).** Isso diminuiria o custo energético envolvido na formação dessa camada, e resultaria em uma diminuição de energia livre do estado desnaturado em relação ao estado nativo, o que favoreceria o processo de desnaturação de uma proteína (TSAI, GERSTEIN, LEVITT, 1996).

Por outro lado, a literatura também relata que a uréia é capaz de interagir com regiões polares da proteína. Sabe-se que o estado nativo também é mantido pelas interações de hidrogênio entre os componentes encontrados na estrutura protéica. Ao interagir com esses componentes, a uréia diminuiria a quantidade de pontes de hidrogênio, enfraquecendo a estrutura como um todo, favorecendo a transição para o estado desnaturado (TSAI, GERSTEIN, LEVITT, 1996; ZHANG, ZHU, SHI, 2001; SOPER, CASTNERB, LUZARC, 2003).

A uréia também poderia atuar na formação de estruturas organizadas na água denominadas clatratos. Tais estruturas seriam como cavidades na água nas quais regiões hidrofóbicas de uma proteína ou peptídeo poderiam se encaixar, com baixo custo energético (SOPER, CASTNERB, LUZARC, 2003; DIAS et al., 2010).

A ação caotrópica da uréia sobre uma proteína pode ser avaliada pela dependência da absorvância em torno de 280 nm com a concentração da uréia.

Essa curva apresenta uma forma sigmoidal **(Figura 2)** e sua análise constitui uma relevante ferramenta para a medida da estabilidade conformacional da proteína.

No meio natural fisiológico, as proteínas precisam se adaptar às condições termodinâmicas naturais para evitar alterações em suas estruturas secundárias e terciárias (BOLEN, BASKAKOV, 2001). Proteínas que não se adaptam a tais circunstâncias podem perder parcial ou totalmente sua atividade funcional (YANCEY et al., 1982). Para adaptar-se a tais perturbações devido às condições extremas, a natureza criou determinados mecanismos como o acúmulo de pequenos solutos orgânicos conhecidos como osmólitos ou osmoprotetores (BOLEN, BASKAKOV, 2001; VIANA, GARROTE-FILHO, PENHA-SILVA, 2005; VENKATESU, LEE, LIN, 2008), os quais são moléculas orgânicas pequenas de ocorrência natural frequentemente referidas como chaperonas químicas. Estes solutos são tipicamente acumulados no ambiente intracelular em concentrações relativamente elevadas que podem aumentar a estabilidade termodinâmica de proteínas enoveladas sem perturbar suas funções e outros processos celulares (YANCEY et al., 1982; KUMAR, 2009).

Os osmólitos de ocorrência natural podem ser poliálcoois (glicerol e sorbitol), aminoácidos (glicina) e derivados (metilglicina, dimetilglicina e trimetilglicina), açúcares (sacarose e trealose) e combinação de metilaminas e uréia (YANCEY et al., 1982). Funcionalmente, eles podem ser solutos compatíveis (glicina, sacarose, glicerol e sorbitol), quando exercem pequenos efeitos sobre a função protéica, e solutos neutralizantes (aminoácidos básicos livres), quando inibem efeitos que solutos adversos desempenham sobre as proteínas (YANCEY et al., 1982).

A **Figura 3** mostra um diagrama esquemático do equilíbrio de diálise. À esquerda, o co-soluto está presente em excesso na solução protéica quando comparado à concentração do lado externo da membrana de diálise. Isto representa a ligação preferencial de co-solutos à proteína, como observado para caotrópicos como GdnHCl e uréia.

Este capítulo teve como objetivo analisar as estabilidades de duas proteases isoladas respectivamente da peçonha de *B. alternatus* (balternina) e do látex de *E. milii* var. *hislopii* (eumilina).

2. MATERIAL E MÉTODOS

Os reagentes de eletroforese, os caotrópicos e os osmólitos foram obtidos da Sigma (St Louis, MO, USA) e da Amersham. Os demais reagentes utilizados foram de grau analítico.

As enzimas balternina e eumilina foram isoladas e caracterizadas de acordo com Costa et al. (2010) e Fonseca et al. (2010), respectivamente.

O equilíbrio de desnaturação foi realizado com as proteases (balternina e eumilina) em solução a 0,0020 g/mL, contendo KCl a 0,050 $mol.L^{-1}$, por espectrofotometria ultravioleta (SCHIMID, 1990) no comprimento de onda de 280 nm (LI et al., 1998) em espectrofotômetro UV/Vis, à temperatura ambiente de 25 ºC, em duas cubetas de quartzo com caminho óptico de 1 cm. A uma das cubetas foi adicionado 1 mL de solução protéica e à outra cubeta (controle) foi adicionado 1 mL de KCl 0,050 $mol.L^{-1}$. Após a leitura da absorvância a 280 nm em cada cubeta, foram feitas adições sucessivas de solução de uréia a 6 $mol.L^{-1}$, com leitura ponto a ponto das absorvâncias em cada cubeta. Os dados de absorvância da cubeta controle foram utilizados para cálculo da absorvância das enzimas sem as contribuições determinadas pela incorporação do solvente (diluição).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Algumas enzimas presentes em látices vegetais comportam-se de forma similar a enzimas encontradas em peçonhas de serpentes. Neste trabalho, foi realizado um perfil comparativo entre as estabilidades de duas proteases purificadas respectivamente da peçonha de *Bothrops alternatus* e do látex de *Euphorbia milii* var. *hislopii.*

As enzimas balternina (*B. alternatus*) e eumilina (*E. milii* var. *hislopii.)* foram isoladas e suas propriedades funcionais e estruturais foram caracterizadas por Costa et al. (2010) e Fonseca et al. (2010), respectivamente.

Ambas as proteases foram submetidas a ensaios de estabilidade quando incubadas em diferentes pHs (3,0 a 10,0), temperaturas (30 a 100 ºC), inibidores

(EDTA, benzamidina, β-mercaptoetanol e leupeptina) e, ainda, quando submetidas à titulação espectrofotométrica com uréia.

A atividade proteolítica sobre o fibrinogênio bovino foi realizada como parâmetro para mensurar a estabilidade das enzimas em diferentes temperaturas e pH.

A balternina apresenta atividade máxima em uma estreita faixa de pH alcalino (7,0 a 8,0) e é ativa entre 30 e 40 ºC. Quando aquecida a 60 ºC, durante 15 minutos e acima de 80 ºC perde, respectivamente, de forma parcial e total, sua atividade fibrinogenolítica.

Em contrapartida, a eumilina mostrou-se mais termoestável, pois manteve-se totalmente ativa entre 30 e 70 ºC. Embora a atividade proteolítica em diferentes pHs tenha sido realizada sobre o substrato caseína, sugere-se que o pH ótimo encontrado para a referida atividade também o seja para a atividade fibrinogenolítica.

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

Em relação à inibição enzimática, a benzamidina inibiu completamente a atividade fibrinogenolítica da balternina, o que sugere que ela é uma serinoprotease, ao passo que a leupeptina e o β-mercaptoetanol inibiram a mesma atividade da eumilina, o que deve significar que ela é uma cisteinoprotease, embora a sua sequência N-terminal não se assemelhe às sequências de algumas cisteinoproteases isoladas de plantas. Estes resultados também sugerem a importância das ligações dissulfeto para a atividade catalítica desta protease vegetal.

Foram feitas titulações espectrofotométricas das duas enzimas com uréia. A **Figura 4** mostra as curvas de regressão sigmoidal obtidas a partir dos dados originais (PACE, SHIRLEY, THOMSON, 1989; GALANI, APENTEN, 1999; YELAMOS et al., 2001). A título de uniformização dos resultados, os valores de absorvância foram convertidos em fração desenovelada da proteína. Esses resultados foram mostrados na **Figura 5.**

Com base nos dados apresentados na **Figura 5** foram calculados os valores de concentração de uréia na qual cada uma das proteases estudadas apresenta 50% de desnaturação ($D_{50\ (uréia)}$). Para a balternina, o valor encontrado de $D_{50\ (uréia)}$ foi de 0,39642 $\pm$ 0,05735. Para a eumilina esse valor foi de 0,59519 $\pm$ 0,14202. Isso indica que a eumilina apresenta maior resistência à ação desnaturante da uréia.

Em relação à estratégia de proteção, os osmólitos podem ser utilizados para restaurar a atividade de enzimas purificadas, como as proteases balternina e eumilina. Isso se justifica pelo fato de que muitas destas biomoléculas possuem estabilizantes naturais que podem ser removidos durante o processo de purificação. Desta forma, acredita-se que os osmólitos de alguma forma podem compensar a perda desses estabilizadores de ocorrência natural (ARAKAWA et al., 2006).

Estes solutos protetores podem ser usados na estabilização de enzimas para que as mesmas possam manter-se funcionais em altas temperaturas, nas quais normalmente sofreriam desnaturação e, consequentemente, perda de atividade catalítica, favorecendo inúmeros procedimentos biotecnológicos que requerem a utilização de temperaturas elevadas (ZANCAN, SOLA-PENNA, 2005). Sendo assim, os osmólitos glicerol (poliálcool) e sacarose (açúcar), classificados como compatíveis, pois exercem pequenos efeitos sobre a função protéica, foram incubados em diferentes concentrações com as proteases purificadas em diferentes temperaturas e, posteriormente, as atividades proteolíticas foram determinadas. De forma preliminar, constatou-se que ambos os osmólitos protegeram as respectivas enzimas quando submetidas à altas temperaturas, principalmente na concentração de 1 $mol.L^{-1}$ (resultado não mostrado). Outros testes experimentais deverão ser realizados para melhor caracterizar a ação protetora destes osmólitos.

A sequência completa de aminoácidos foi deduzida para a balternina e o N-terminal para a eumilina. No entanto, tendo em vista a maior resistência da eumilina à temperatura e à uréia, acredita-se que esta protease vegetal apresenta maior número de resíduos de aminoácidos que conferem estabilização à estrutura protéica, como por exemplo, a presença de resíduos de cisteína. No entanto, para confirmar tal hipótese é necessário o sequenciamento completo desta enzima.

A sequência completa de aminoácidos da balternina, determinada por cDNA, apresentou 708 pb que codificam para uma proteína madura com 236 resíduos de aminoácidos. A referida protease apresentou similaridade estrutural entre 72 e 65% quando comparada com a sequência de outras serinoproteases pertencentes a diferentes gêneros de serpentes. A região N-terminal da balternina foi iniciada pela valina, característica essa presente na maioria das serinoproteases. Em alguns casos, este resíduo pode ser substituído pela isoleucina, como ocorre com a halystase, isolada da peçonha de *Agkistrodon halys blomhoffii* (MATSUI et al. 1998) e a flavoxobina, isolada da peçonha de *Trimeresurus flavoviridis* (YAMAMOTO et al., 2002).

Normalmente, as serinoproteases contêm cerca de 12 resíduos de cisteína e os resíduos de aminoácidos altamente conservados de histidina, aspartato e serina dos sítios catalíticos, como a KN-BJ, isolada da peçonha de *Bothrops jararaca* (SERRANO et al., 1998), a ancrode, isolada de *A. rodhostoma* (NOLAN, HALL, BARLOW, 1976) e a bilineobina, isolada da peçonha de *Agkistrodon bilineatus* (KOMORI et al., 1993). É interessante destacar a enzima Dav-KN, isolada de *Agkistrodon acutus* (WANG, WANG, TSAI, 2001), em que o resíduo de cisteína da posição 201 é trocado por uma serina, caracterizando, portanto, uma exceção. Com a ausência de grupamento tiol (S-H) livre nas enzimas ‘thrombin-like’, acredita-se que os resíduos de cisteína encontrados sejam responsáveis por ligações dissulfetos importantes na estabilização da estrutura nativa destas moléculas, onde geralmente constituem 6 pares deste tipo de ligação. Pela estrutura cristalográfica de TSV-PA (ativador de plasminogênio), isolado da peçonha de *Trimeresurus stejnegeri* (ZHANG et al., 1998), e da crotalase, isolada da peçonha de *Crotalus adamanteus* (MARKLAND Jr, 1976), detecta-se a presença de seis pares de cisteína, entre os quais a ligação dissulfeto da posição 136-201 é indicada como fundamental na estabilidade dessas serinoproteases (CASTRO et al., 2004). Possivelmente para a balternina deve ocorrer a formação de seis pares de pontes dissulfeto, pelo fato de os 12 resíduos de cisteína também serem encontrados em sua estrutura (COSTA et al., 2010).

Os aminoácidos ao redor do sítio catalítico também são importantes na especificidade funcional enzimática, uma vez que a estrutura secundária, por

meio de suas α-hélices e folhas β, têm papel fundamental nesta especificidade, como é citado para a batroxobina e para TSV-PA (CASTRO et al., 2004).

Neste capítulo, as enzimas proteolíticas balternina e eumilina foram comparativamente analisadas quanto à estabilidade contra a uréia, verificando que ambas apresentaram características e ações semelhantes, embora haja uma diferença considerável em relação a suas origens, que foram uma peçonha ofídica (balternina) e um látex vegetal (eumilina). Quando submetidas a temperaturas elevadas e à ação da uréia como agente desnaturante, a eumilina mostrou-se mais resistente do que a balternina.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Estudos complementares tornam-se necessários para a completa elucidação dos perfis de estabilização das referidas proteases que, possivelmente, poderão:

- Favorecer no futuro os processos de transporte e armazenamento enzimáticos,
- Destacar a importância clínica de enzimas, como é o exemplo da balternina, que de acordo com suas propriedades estruturais e funcionais, pode ser de interesse terapêutico não só para o tratamento como também na prevenção de desordens relacionadas a alterações nos mecanismos hemostáticos.

5. REFERÊNCIAS

ARAKAWA, T.; EJIMA, D.; KITA, Y.; TSUMOTO, K. Small molecule pharmacological chaperones: From thermosynamic stabilization to pharmaceutical drugs. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1764, p. 1677-1687, 2006.

BASKAKOV, H.; BOLEN, D. W. Forcing termodynamically unfolded proteins to fold. **The Journal of Biology Chemistry**, v. 273, p. 4831-4834, 1998.

BOLEN, D. W.; BASKAKOV, I. V. The osmophobic effect: natural selection of a thermodynamic force in protein folding. **Journal of Molecular Biology**, v. 310, p. 955-963, 2001.

BRANDEN, C.; TOOZE, J. Prediction, enginneering, and design of protein structures. In: **Introduction to Protein Structure**. Nova York e Londres: Garland Publisching, 1991, p. 247-266.

CASTRO, H. C.; ZINGALI, R.B.; ALBUQUERQUE, M.G.; PJOL-LUZ, M.; RODRIGUES, C.R. Snake venom thrombin-like enzymes: from reptilase to now. **CMLS**, v. 61, p. 843-856, 2004.

COSTA, J. O.; FONSECA, K. C.; MAMEDE, C. C. N.; BELETTI, M. E.; SANTOS-FILHO, N. A.; SOARES, A. M.; ARANTES, E. C.; HIRAYAMA, S. N. S.; SELISTRE-DE-ARAÚJO, H. S.; FONSECA, F.; HENRIQUE-SILVA, F.; PENHA-SILVA, N.; OLIVEIRA, F. Bhalternin: Functional and Structural Characterization of a new Thrombin-like enzyme from *Bothrops alternatus* snake venom. **Toxicon**, v. 55, p. 1365-1377, 2010.

DIAS, C. L.; ALA-NISSILA, T; WONG-EKKABUT, J.; VATTULAINEN, I; GRANT, M.; KARTTUNEN, M. The hydrophobic effect and its role in cold denaturation. **Cryobiology**, v. 60, p. 91–99, 2010.

FIELDS, P. A. Protein function at thermal extremes: balancing stability and flexibility. **Comparative Biochemistry and Physiology**,v. 129, p. 417-431, 2001.

FONSECA, L. C.; CORRÊA, N. C. R.; GARROTE-FILHO, M. S.; CUNHA, C. C.; PENHA-SILVA, N. Efeito da composição do solvente sobre a estabilidade de proteínas em soluções aquosas. **Química Nova**, v. 29, p. 543-548, 2006.

FONSECA, K. C.; MORAIS, N. C. G.; QUEIROZ, M. R.; SILVA, M. C.; GOMES, M. S.; COSTA, J. O.; MAMEDE, C. C. N.; TORRES, F. S.; PENHA-SILVA, N.; BELETTI, M. E.; CANABRAVA, H. A. N.; OLIVEIRA, F. Purification and biochemical characterization of Eumiliin from *Euphorbia milii* var. *hislopii* latex. **Phytochemistry**, v. 71, p. 708-715, 2010.

GALANI, D.; APENTEN R. K. Beta-lactoglobulin denaturation by dissociation-coupled unfolding. **Food Research International**, v. 32, p. 93-100, 1999.

KOMORI, Y.; NIKAI, T.; OHARA, A.; YAGIHASHI, S.; SUGIHARA, H. Effect of bilineobin, a thrombin-like proteinase from the venom of common cantil (*Agkistrodon bilineatus*). **Toxicon**, v. 31, p. 257-270, 1993.

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

KUMAR, T. K.; YU, C. Monitoring protein folding at atomic resolution. **Accounts of Chemical Research**, v. 37, p. 929-936, 2004.

KUMAR, R. Role of naturally occurring osmolytes in protein folding and stability. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 491, p. 1-6, 2009.

MARKLAND JR, F. S. Crotalase. **Methods in Enzymology**, v. 45, p. 223-236, 1976.

MATSUI, T.; YOSHIHIKO, S.; YOSHIHIKO, F.; IZUMI, H.; SACHIKO, O.I.; MASAMI, S.; JIHARI, H.; YAMAMOTO, Y.; YAMAZAKI, J.; KINOSHITA, M.; TITANI, K. Purification and amino acid sequence of halystase from snake venom of *Agkistrodon halys blomhoffi*, a serine protease that cleaves specifically fibrinogen and kininogen. **European Journal of Biochemistry/ FEBS**, v. 252, p. 569-575, 1998.

NOLAN, C.; HALL, L.S.; BARLOW, G.H. Ancrod, the coagulating enzyme from Malayan pit viper (*Agkistrodon rhodostoma*) venom. **Methods in Enzymology**, v. 45, p. 205-213, 1976.

PACE, C. N. Determination and analysis of urea and guanidine hydrochloride denaturation curves. **Methods in Enzymology**, v. 131, p. 266–279, 1986.

PACE, C. N.; SHIRLEY, B. A.; THOMSON, J. A. Measuring the conformational stability of a protein. In: **Protein structure: a practical approach.** Oxford: IRL Press, 1989, p. 311-330.

SCHIMID, F. X. Spectral methods of characterizing protein conformation and conformation changes. In: **Protein structure a practical approach.** (Creighton, TE, ed.), Oxford: IRL Press, 1990, p. 251-285.

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, p. 1135-1144, 1987.

SERRANO, S.M.; HAGIWAHA, Y.; MURAYAMA, N.; NIGUCHI, S.; MENTELE, R.; SAMAPIO, C.A.; CAMARGO, A.C.; FINK, E. Purification and characterization of a kinin-releasing and fibrinogen-clotting serine proteinase (KN-BJ) from the venom of *Bothrops jararaca*, and molecular cloning and sequence analysis of its cDNA. **European Journal of Biochemistry/FEBS**, v. 251, p. 845-53, 1998.

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

SOMERO, G. N. Protein adaptations to temperature and pressure: complementary roles of adaptive changes in amino acids sequence and internal melieu. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B**, v. 136, p. 577-591, 2003.

SOPER, A. K.; CASTNERB, E. W.; LUZARC, A. Impact of urea on water structure: a clue to its properties as a denaturant? **Biophysical Chemistry**, v. 105, p. 649–666, 2003.

TIMASHEFF, S. N.; ARAKAWA, T. Stabilization of protein structure by solvents. In: **Protein structure: a practical approach**. Oxford: IRL Press, 1989, p. 331-345.

TIMASHEFF, S. N.; XIE, G. Preferential interactions of urea with lysozyme and their linkage to protein denaturation. **Biophysical Chemistry**, v. 105, p. 421-448, 2003.

TSAI, J.; GERSTEIN, M.; LEVITT, M. Keeping the shape but changing the charges: A simulation study of urea and its iso-steric analogs. **The Journal of Chemical Physics**, v. 104, p. 9417-9430, 1996.

VENKATESU, P.; LEE, M-J; LIN, H-M. Effect of osmolyte or GdnHCl on volumetric properties of aqueous solutions containing cyclic dipeptides. **Biochemical Engineering Journal**, v. 38, p. 326-340, 2008.

VIANA, Y. A.; GARROTE-FILHO, M. S.; PENHA-SILVA, N. Estabilização de proteínas por osmólitos. **Bioscience Journal**, v. 21, p. 83-88, 2005.

YAMAMOTO, C.; TSURU, D.; ODA-UEDA, N.; OHNO, M.; HATTORI, S.; KIM, S.T.; Flavoxobin, a serine protease from *Trimeresurus flavoviridis* (habu snake) venom, independently cleaves Arg726-Ser727 og human C3 and acts as a novel, heterologous C3 convertase. **Immunology**, v. 107, p.111-117, 2002.

YANCEY, P. H.; CLARK, M. E.; HAND, S. C.; BOWLUS, R. D.; SOMERO, G. N. Living with whater stress: evolution of osmolyte system. **Science,** v. 217, p. 1214-1222, 1982.

YANCEY, P. H. Compatible and counteracting solutes: protecting cells from the Dead Sea to the deep sea. **Science progress**, v. 87, p. 1-24, 2004.

YAO, M.; BOLEN, D. W. How valid are denaturant induced unfolding free energy measurment? Level of conformance to common assumptions over an extended range of Ribonuclease stability. **Biochemistry,** v. 34, p. 3771– 3781, 1995.

YELAMOS, B.; NUNEZ, E.; GOMEZ-GUTIERREZ, J.; DELGADO, C; PACHECO, B.; PETERSON, D. L.; GAVILANES, F. Urea equilibrium unfolding of the major core protein of the retrovirus feline immunodeficiency virus and its tryptophan mutants. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1546, p. 87-97, 2001.

WANG, Y. M.; WANG, S. R.; TSAI, I. H. Serine protease isoforms of *Deinagkistrodon acutus* venom: cloning, sequencing and phylogenetic analysis. **The Biochemical journal**, v. 354, p. 161-168, 2001.

ZANCAN, P.; SOLA-PENNA, M. . Trehalose and gycerol stabilize and renature yeast inorganic pyrophosphatase inactivated by very high temperatures. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 444, p. 52-60, 2005.

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

ZHANG, Z.; ZHU, Y.; SHI, Y. Molecular dynamics simulations of urea and thermal-induced denaturation of S-peptide analogue. **Biophysical Chemistry**, v. 89, p. 145-162, 2001.

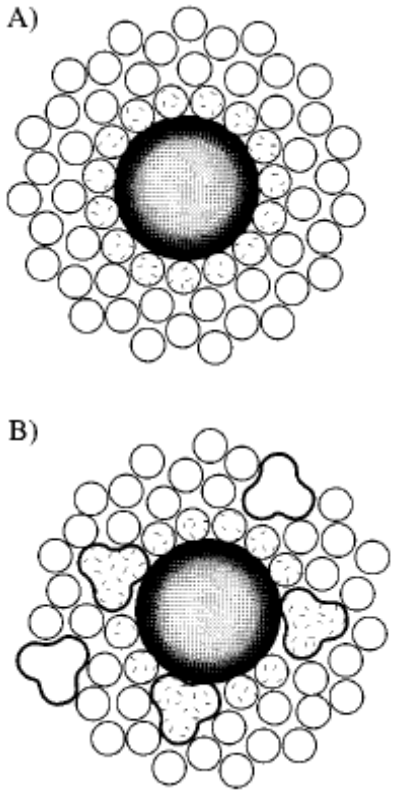


Figura 1. Representação bidimensional de moléculas de água ao redor de uma esfera hidrofóbica. **A)** Esquema mostrando em duas dimensões uma esfera hidrofóbica (círculo maior ao centro) em solução aquosa. Os círculos menores são moléculas de água. Os pequenos círculos pontilhados representam 15 moléculas de água em contato com a esfera hidrofóbica. **B)** Esquema mostrando a mesma esfera hidrofóbica, mas desta vez, em solução aquosa de uréia. As formas em trevo representam as moléculas de uréia. Assim como em (A), o pontilhado representa as moléculas em contato com a esfera hidrofóbica. Soluções de uréia podem deslocar moléculas de água da superfície hidrofóbica. Como resultado, em (B) a esfera interage com um número menor de moléculas, das quais 9 são moléculas de água e 3 são moléculas de uréia contra a interação com 15 moléculas em (A). Desta forma, a esfera hidrofóbica é menos compactada na presença da solução aquosa de uréia do que na presença de água pura (TSAI, GERSTEIN, LEVITT, 1996).

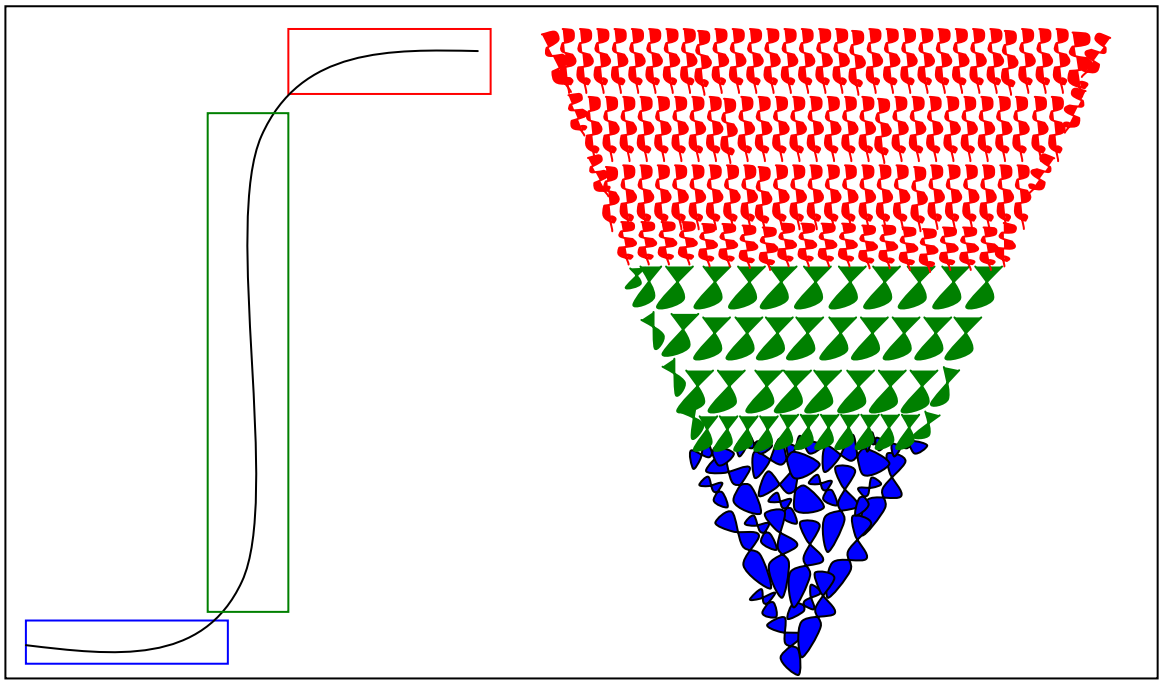


Figura 2: Curva sigmoidal típica resultante da titulação enzimática com agentes caotrópicos. Em **azul**: proteínas totalmente enoveladas (estado de pré-transição). Em **verde**: proteínas parcialmente enoveladas (estado transição). Em **vermelho**: proteínas totalmente desenoveladas (estado de pós-transição).

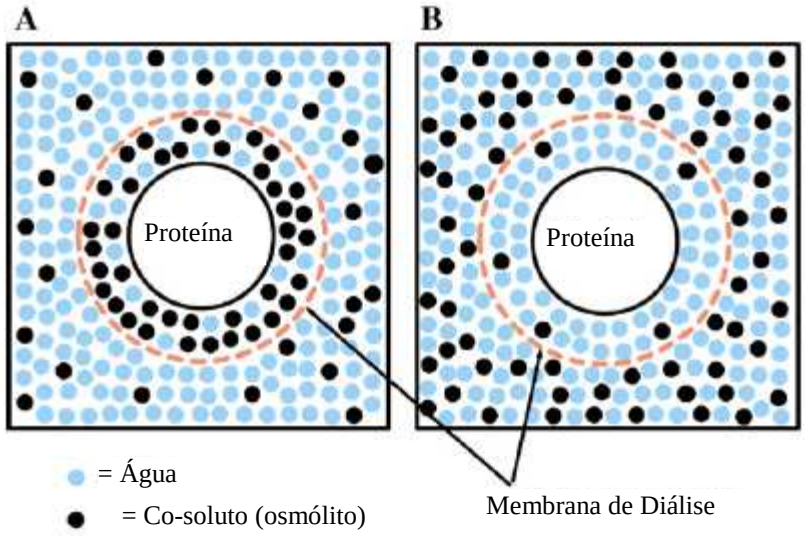


Figura 3: Representação esquemática para a interação preferencial da água com o co-soluto. **A)** Ligação preferencial do co-soluto. **B)** Hidratação preferencial (ARAKAWA et al., 2006).

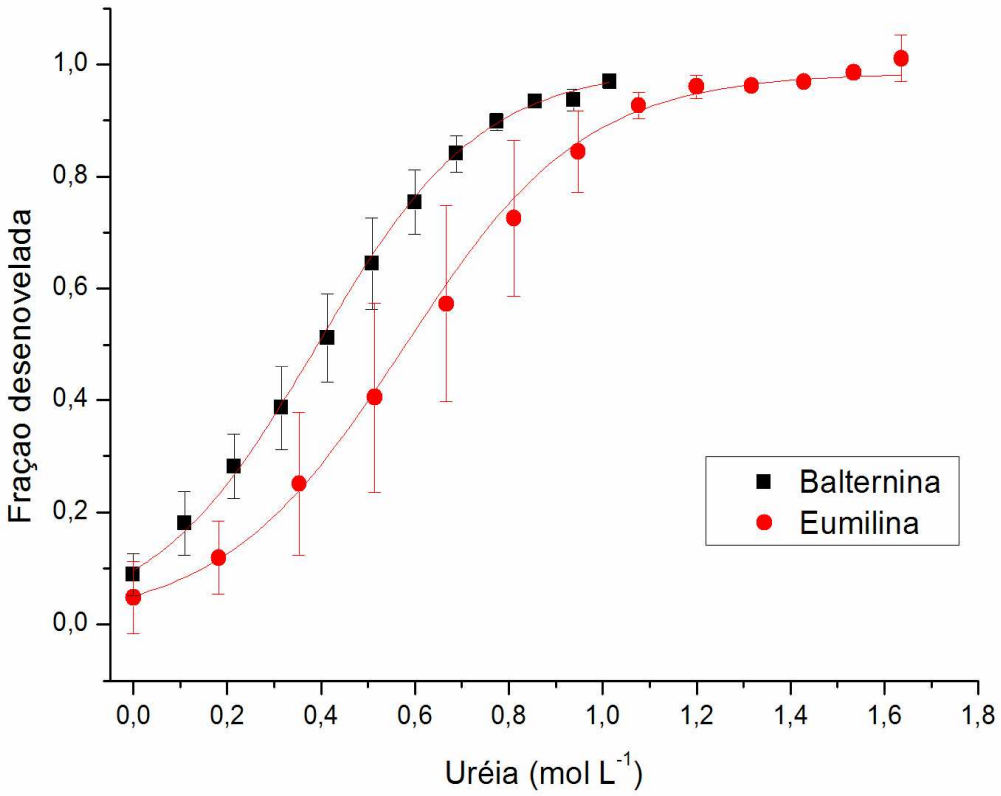


Figura 4: Mecanismo de desenovelamento das enzimas balternina e eumilina em concentrações crescentes de uréia. Curva obtida a partir dos dados originais.

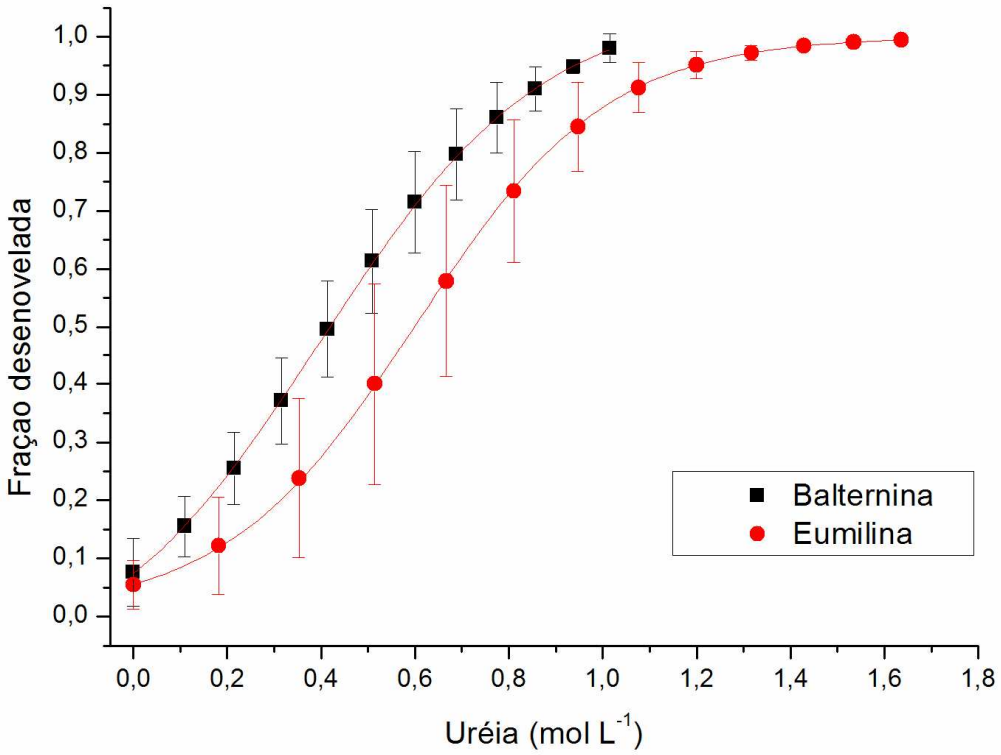


Figura 5: Mecanismo de desenovelamento das enzimas balternina e eumilina em concentrações crescentes de uréia. Os parâmetros das sigmóides foram usados para o cálculo dos valores de absorvância por meio de interpolação.