

Alessandra Stroka

**PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE UMA
HEMORRAGINA DA PEÇONHA DE
BOTHROPS LANCEOLATUS (FER DE LANCE)**

Este exemplar corresponde à versão final da Dissertação de Mestrado, apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas - UNICAMP, para obtenção do título de Mestre em Farmacologia da Farmacêutica – Alessandra Stroka

Campinas, 20 de fevereiro de 2004.

Albetiza Lobo de Araújo
Profa. Dra. Albetiza Lobo de Araújo
- Orientadora -

**Campinas
2004**

**UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE**

Alessandra Stroka

**PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE UMA
HEMORRAGINA DA PEÇONHA DE
BOTHROPS LANCEOLATUS (FER DE LANCE)**

Dissertação de Mestrado apresentada à
Pós-Graduação da Faculdade de Ciências
Médicas da Universidade Estadual de
Campinas, para obtenção do título de Mestre
em Farmacologia.

Orientadora: Profa. Dra. Albetiza Lôbo de Araújo

Campinas
2004

IDADE	BC
CHAMADA	
	UNICAMP
	887p
EX	
MBD BC/	59185
OC.	16-117-04
C	☐
D	☒
REÇO	R\$ 11,00
ATA	22/07/04
CPD	

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP**

000198263-B

BID 318238

887p

Stroka, Alessandra

Purificação e caracterização de uma hemorragina da peçonha de Bothrops Lanceolatus (fer de lance) / Alessandra Stroka. Campinas, SP : [s.n.], 2004.

Orientador : Albetiza Lobo de Araújo

Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas.

1. Venenos de cobra. 2. Hemorragia. 3. Metaloproteínas. I.
Albetiza Lobo de Araújo. II. Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.



Banca Examinadora da Dissertação de Mestrado

Orientador:

Profa. Dra. Albetiza Lôbo de Araújo

Membros:

Profa Dra. Albetiza Lôbo de Araújo

Prof. Dra. Heloisa Helena de Araújo Ferreira

Profa. Dr. Sérgio Marangoni

**Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas
da Universidade Estadual de Campinas.**

Data: 20/02/2004

*“ Nem olhos viram, nem ouvidos ouviram,
nem jamais penetrou em coração humano
o que Deus tem preparado para aqueles
que o amam.”*

1Coríntios 2.9

*“... somos mais que vencedores, por meio
daquele que nos amou.”*

Romanos 8.37

*“ Que a integridade e a retidão me
protejam, porque a minha esperança está
em ti.”*

Salmo 25.21

*“ Ando devagar porque já tive pressa e levo esse sorriso porque já chorei demais. Hoje me sinto mais forte, mais feliz, quem sabe eu só levo a certeza de que muito pouco eu sei ou nada sei...
... Todo mundo ama um dia, todo mundo chora. Um dia a gente chega no outro vai embora, cada um de nós compõe a sua história e cada ser em si carrega o dom de ser capaz e ser feliz...”*

(Almir Sater)

A Deus

meu Pai e Mestre, agradeço pela oportunidade da vida, pela presença constante em todos os momentos da minha vida e pelas pessoas maravilhosas que colocou em meu caminho. Que a luz divina continue a iluminar meu caminho.

À minha mãe

Por mais que o tempo e a distância insistam em me fazer te esquecer, sei que o amor verdadeiro nunca morrerá. E por todo o tempo que ainda viver perpetuarei tua memória e hei de ser fiel aos teus princípios, pois tudo que me ensinaste é fruto de amor e boas lembranças.

À minha família

pelos esforços não poupados durante minha formação pessoal e profissional. São poucas as palavras para expressar tanto agradecimento, obrigada porque nos momentos difíceis deram seus ombros para eu chorar e nos momentos alegres compartilharam comigo os sorrisos.

Ao meu marido, Fabiano

Pelo amor, incentivo, compreensão e paciência. Ficaste ao meu lado nos momentos de sonhos, tristezas e alegrias. Foste meu apoio em minhas quedas, teu ombro, meu alento; teus olhos, minha luz; teu abraço, meu abrigo... Tua espera paciente ao me ver distante. Agora tua paz ao me ver presente em plena realização.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Albetiza Lôbo de Araújo, agradeço pela oportunidade, orientação, confiança, amizade e por ter participado de perto do meu crescimento científico e pessoal.

Ao Prof. Dr. Stephen Hyslop, pela co-orientação, pelas sugestões valiosas, pela amizade e pela oportunidade de trabalhar em seu laboratório, fundamental para a realização deste trabalho.

Aos docentes do Departamento de Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp, pelo convívio e pela utilização dos recursos deste Departamento.

A todos os funcionários do Departamento de Farmacologia pelo apoio e dedicação.

Ao José Ilton e à Alessandra Priscila pelo apoio técnico e amizade.

Aos amigos da pós-graduação Chris, Lu, Carol, Paula, Renata, Vanessa, Alessandra Guimarães, Raquel, Ana, Deise, Valéria, Priscila, Yoko e Charistón pela amizade e pelos bons momentos compartilhados nesta jornada do mestrado.

Aos amigos do Laboratório do Dr. Stephen, Amanda, Patrícia, Agatha, Alessandra Linardi, Christiane, Pamela, Ericleison, Gustavo, Sueli e Emanuela por me

adotarem como parte da família do laboratório e pelas valiosas colaborações em vários momentos.

À amiga Cida Andrade pelo fundamental apoio desde o início da graduação e pela amizade.

Às minhas amigas do coração desde a muito tempo Dani, Ma e Nessa.

Aos meus pais Márcia e Wilson, ao meu irmão Vitor, aos meus segundos pais Ana Lúcia e Sebastião, à Michele, ao Ni, às minhas Vó Pê e Vó Mélinha, ao meu avô Irineu, aos meus tios Luiz e Edna, aos priminhos Du e Lê, que fazem tudo valer a pena.

À todos que colaboraram, de alguma forma, para a realização deste trabalho.

À FAPESP, pelo apoio financeiro.

À Deus, por tudo!

“... pois cada um de nós leva um pouco do outro e deixa um pouco de si mesmo...”

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	<i>xiv</i>
LISTA DE FIGURAS	<i>xvi</i>
LISTA DE TABELAS	<i>xviii</i>
RESUMO	<i>xix</i>
ABSTRACT	<i>xxi</i>
1. INTRODUÇÃO	23
1.1. Acidentes por serpentes peçonhentas	24
1.2. Composição das peçonhas ofídicas	28
1.2.1. Neurotoxinas	29
1.2.2. Miotoxinas	30
1.2.3. Fatores que atuam sobre coagulação sangüínea	30
1.2.4. Outras enzimas	31
1.2.5. Hemorraginas / SVMPS	32
1.3. Venenos botrópicos	38
1.4. <i>Bothrops lanceolatus</i>	42

2. OBJETIVOS	46
3. ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO	48
4. DISCUSSÃO	89
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	97

LISTA DE ABREVIATURAS

A	Absorbância
<i>B.lanceolatus</i>	<i>Bothrops lanceolatus</i>
BlaH1	<i>Bothrops lanceolatus</i> hemorragina 1
DMH	Dose mínima hemorrágica
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
ELISA	Ensaio de imuno-absorção por ligação enzimática
IgG	Imunoglobulina G
MMPs	Metaloproteinases de matriz endógena
PBS	Salina tamponada com fosfato
PLA₂	Fosfolipase A ₂
PMSF	Fluoreto de fenil-metil-sulfonila
PVDF	Poli vinilideno difluoreto hidrofóbico
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de SDS
SVMP	Metaloproteinase de veneno de serpente
TAME	N α - p – tosil – L –arginina metil éster

TBS	Tampão borato salina
TCA	Ácido tricloroacético
Temed	N,N,N',N' - tetrametilenodiamina
TNFα	Fator de necrose tumoral alfa
Tris	Tris (hidroximetil)-aminometano

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Resumo das múltiplas funções das SVMPs	33
Figura 2. Representação esquemática da classificação estrutural das SVMPs	37
Figura 3. Resumo das ações exercidas pelos venenos botrópicos	40
Figura 4. <i>Bothrops lanceolatus</i> (Fer de lance)	45

Figuras no artigo para publicação

Figure 1. Purification of BlaH1 from <i>B. lanceolatus</i> venom	81
Figure 2. SDS-PAGE of venom and BlaH1	82
Figure 3. Immunoblotting, Immunodiffusion and Immunoelectrophoresis of BlaH1 and <i>B. lanceolatus</i> venom	83
Figure 4. ELISA immunoreactivity of BlaH1 with commercial bothropic antivenom	84
Figure 5. pH-dependence of the proteolytic activity of BlaH1	85
Figure 6. Temperature stability of the proteolytic and hemorrhagic activities of BlaH1	86

Figure 7. Fibrinogen degradation by BlaH1 87

Figure 8. Neutralization of hemorrhagic activity of BlaH1 by commercial
bothropic antivenom 88

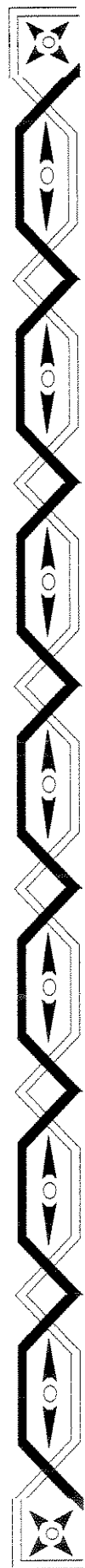
LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Metaloproteinases hemorrágicas isoladas de venenos ofídicos	91
--	----

Tabelas no artigo para publicação

Table 1. Enzymatic activity of <i>B. lanceolatus</i> venom and BlaH1 on several substrates	79
--	----

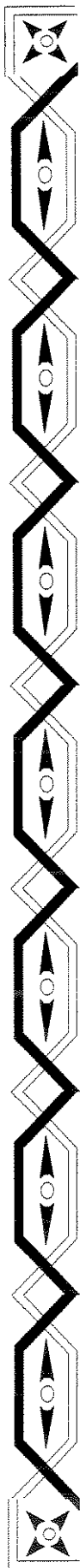
Table 2. Effects of enzyme inhibitors on the hemorrhagic and proteolytic activities of BlaH1	80
--	----



RESUMO

RESUMO

Envenenamentos por serpentes das subfamílias Crotalinae e Viperinae são caracterizados por um complexo quadro fisiopatológico, em que a hemorragia é freqüentemente observada. Neste trabalho, purificamos e caracterizamos uma proteína hemorrágica (BlaH1) da peçonha de *Bothrops lanceolatus*. A hemorragina foi purificada utilizando-se uma combinação de cromatografias de gel filtração, afinidade e interação hidrofóbica. Em SDS-PAGE, a enzima apresentou uma massa molecular estimada em 28 kDa, tanto na ausência quanto na presença de β -mercaptoetanol, indicando assim que a proteína não possui subunidades. A reação da BlaH1 com anticorpo foi confirmada pelos ensaios de imunoblotting, ELISA, imunoeletroforese e imunodifusão, onde o antisoro botrópico comercial foi capaz de reconhecer a proteína hemorrágica. BlaH1 possui atividade hemorrágica e caseinolítica. O uso do agente quelante EDTA inibiu as atividades hemorrágica e caseinolítica, sugerindo que a hemorragina é uma metaloproteinase. O pH ótimo da enzima foi de 8,0 e a temperatura ótima entre 30–40°C. Esses resultados mostram que a hemorragina isolada da peçonha de *B. lanceolatus* apresenta propriedades semelhantes a outras hemorraginas isoladas de peçonhas ofídicas.



ABSTRACT

ABSTRACT

Bothrops snake venoms contain metalloproteinases that contribute to the local effects seen after envenoming. In this work, a hemorrhagic metalloproteinase (BlaH1) was purified from the venom of the snake *Bothrops lanceolatus* by a combination of gel filtration, affinity (metal chelating) and hydrophobic interaction chromatographies. The hemorrhagin was homogeneous by SDS-PAGE and had a molecular mass of 28 kDa that was unaltered by treatment with β -mercaptoethanol. BlaH1 gave a single band in immunodiffusion, immunoelectrophoresis and immunoblotting using commercial bothropic antivenom. This reactivity was confirmed by ELISA. BlaH1 had hemorrhagic, caseinolytic, fibrinogenolytic, collagenolytic and elastinolytic activities, but no phospholipase A₂ activity. The hemorrhagic and caseinolytic activities were inhibited by EDTA, indicating that they were metal ion-dependent. In contrast, aprotinin, benzamidine and PMSF did not affect these activities. The caseinolytic activity of BlaH1 had a pH optimum of 8.0 and was stable in solution at up to 40°C; activity was completely lost at $\geq 70^\circ\text{C}$. The hemorrhagic activity was neutralized by commercial bothropic antivenom. These properties suggest that this new hemorrhagin belongs to class P-I snake venom metalloproteinases.



1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1. ACIDENTES POR SERPENTES PEÇONHENTAS

Há várias razões para respeitarmos as serpentes; sendo a maior delas, proveniente do poder do seu veneno. A picada fatal de algumas espécies venenosas é conhecida por diversas civilizações antigas e as propriedades dos seus venenos determinam a vida, a morte e a doença da vítima. Apesar do aspecto ameaçador, os venenos das serpentes representam atualmente, fonte de medicamentos empregados como agentes terapêuticos para o tratamento de várias patologias. A utilização do veneno de *Bothrops jararaca* conduziu a descoberta, em 1965, por Ferreira e Rocha e Silva, de um fator potenciador de bradicinina (BPF), utilizado como modelo para a síntese do Captopril®, nome comercial de um medicamento empregado no combate a hipertensão.

Animais peçonhentos são aqueles capazes de causar dano às suas vítimas através da inoculação de seu veneno. Eles utilizam essa capacidade como defesa ou para capturar suas presas (JORGE e RIBEIRO, 1990,1991).

Na Terra existem aproximadamente duas mil espécies de serpentes, sendo que apenas 300 são conhecidas como venenosas (VARANDA e GIANNINI, 1994). As serpentes são usualmente denominadas de venenosas, quando providas de eficiente aparelho inoculador e ainda, quando apresentam importância médica por produzirem acidentes ofídicos de grande frequência e gravidade. As espécies de serpentes venenosas estão taxonomicamente divididas em cinco famílias:

Elapidae, *Hydrophidae*, *Atractaspididae*, *Colubridae* e *Viperidae*, esta última família dividindo-se em duas subfamílias mais importantes: *Viperinae* e *Crotalinae* (WÜSTER, GOLAY, WARRELL, 1997). A classificação das famílias de serpentes ainda é controversa, Kochva, 1987 e Mehrtens, 1987 classificam taxonomicamente as serpentes venenosas em quatro famílias, *Elapidae*, *Hydrophidae*, *Colubridae* e *Viperidae*.

A distribuição da família *Elapidae* é ampla, podendo ser encontrada na África, na Ásia, na Austrália e nas Américas. No Brasil, o único gênero representante desta família é o *Micrurus*, cujas espécies são popularmente conhecidas como cobras corais. Os venenos da *Elapidae* contêm potentes neurotoxinas, enzimas muito tóxicas em experimentos *in vitro*. Características importantes destes venenos são elevada toxicidade e ausência ou baixa atividade proteolítica sobre substratos.

Os venenos da família *Hydrophidae*, ou serpentes marinhas, contêm neurotoxinas, que estão incluídas entre as substâncias mais tóxicas do mundo. São mais numerosas que as terrestres, sendo mais comuns nas regiões tropicais e subtropicais entre os oceanos Índico e Pacífico (VARANDA e GIANNINI, 1994).

Os membros da família *Atractaspididae* são denominados cobras de duas cabeças por não apresentarem cauda pontiaguda. Estas espécies estão distribuídas pela África central, atingindo o sul da África e o norte de Israel (MEIER e STOCKER, 1995).

A família *Colubridae* constitui uma das maiores famílias de serpentes, típicas de todos os continentes, exceto da Antártica. A maioria das colubrides é

inofensiva, pois não possui aparelho inoculador eficiente e pouco é conhecido sobre seus venenos. Todavia, trabalhos experimentais em animais mostram que o veneno de *Phylodrias* possui atividades hemorrágica, edematogênica, fibrinogenolítica e fibrinolítica (VARANDA e GIANNINI, 1994).

Os membros da família Viperidae são encontrados na Ásia, Europa, África e Américas, sendo que as serpentes pertencentes a subfamília Viperinae encontram-se principalmente em todo território do velho mundo, enquanto que as espécies da subfamília Crotalinae, vivem no novo mundo e também com representantes na África (gêneros *Trimeresurus* e *Agkistrodon*) (VARANDA e GIANNINI, 1994; VITAL BRAZIL, 1982). As peçonhas das Viperidae caracterizam-se por: 1) induzirem estado de choque; 2) exercerem intensa atividade proteolítica; 3) coagularem o plasma sanguíneo; 4) produzirem hemorragias; 5) liberarem bradicinina; 6) causarem localmente volumoso edema hemorrágico e necrose; 7) não produzirem efeitos neurotóxicos, como a peçonha das Elapidae e Hydrophidae (VITAL BRAZIL, 1982). No entanto, venenos botrópicos são capazes de induzirem efeitos neurotóxicos em animais de experimentação (OSHIMA-FRANCO, 2002; RODRIGUES-SIMIONI, 1983).

Dentro da subfamília Crotalinae, os gêneros *Bothrops*, *Crotalus* e *Lachesis* são particularmente importantes para o continente americano, uma vez que essas serpentes são abundantes nas Américas do Norte, Central e do Sul (VARANDA e GIANNINI, 1994).

O índice de acidentes ofídicos humanos no mundo é de cinco milhões de casos por ano, com cerca de 50 mil óbitos (CHIPPAUX; GOYFFON, 1998), enquanto que no território brasileiro a incidência destes acidentes atinge cerca de 20.000 casos por ano, com 0,4% de índice de letalidade (Ministério da Saúde, 1998; ARAÚJO et al., 2003).

No Brasil, as serpentes do gênero *Bothrops* (subfamília Crotalinae, família Viperidae) são responsáveis por cerca de 90,5% dos acidentes ofídicos, constituindo um problema de saúde pública, dadas a incidência, a gravidade e as seqüelas deixadas nos doentes (Ministério da Saúde, 1998). Os demais gêneros apresentam as seguintes porcentagens: 7,7% *Crotalus* (família Viperidae), 1,4% *Lachesis* (Família Viperidae) e 0,4% *Micrurus* (família Elapidae) (ARAÚJO et al., 2003).

A principal ferramenta empregada no tratamento de acidentes ofídicos é a soroterapia, introduzida por Calmette, em 1894, e embora o emprego da soroterapia seja eficaz no tratamento das alterações sistêmicas decorrentes do envenenamento ofídico, os efeitos locais induzidos por venenos de serpentes são difíceis de serem neutralizados pelos antivenenos específicos (GUTIÉRREZ et al. 1981, 1985; LOMONTE et al., 1987). Tal fato pode estar relacionado ao rápido desenvolvimento dos efeitos locais, enquanto os efeitos sistêmicos evoluem mais lentamente (GUTIÉRREZ, ROJAS, CERDAS, 1987).

1.2. COMPOSIÇÃO DAS PEÇONHAS OFÍDICAS

Os venenos ofídicos são complexos, sendo compostos por uma mistura de proteínas, bem como de outras substâncias não protéicas de natureza orgânica ou inorgânica. Os constituintes orgânicos são classificados em aminoácidos livres e peptídeos, nucleotídeos, carboidratos, lipídeos e aminas biogênicas, enquanto os inorgânicos são representados por íons, incluindo Ca^{++} , Cu^+ , Fe^{++} , K^+ , Mg^{++} , Na^+ , P^- , Co^{++} e Zn^{++} (BIEBER, 1979). Embora a função biológica dos componentes inorgânicos não esteja totalmente compreendida, acredita-se que alguns metais estejam relacionados com a estabilidade de certas proteínas (neutralizando suas cargas), enquanto outros, como o Zn^{2+} , Co^{2+} , Fe^{2+} e Cu^+ sejam indispensáveis ao processo catalítico de componentes enzimáticos, como as metaloproteínases. Esses íons metálicos encontram-se firmemente ligados a proteínas e podem servir como cofatores (grupo prostético) para suas funções. Este parece ser o caso de certas enzimas proteolíticas e algumas proteínas hemorrágicas (BJARNASON e FOX, 1994).

As proteínas correspondem cerca de 90% do peso seco do veneno e possuem grande importância fisiopatológica, podendo ou não apresentar ações enzimáticas importantes. Os constituintes protéicos mais comumente encontrados são: enzimas (fosfolipases, fosfodiesterases, L-aminoácido oxidase, acetilcolinesterase, enzimas proteolíticas, entre outras), cardiotoxinas e citotoxinas (VARANDA e GIANNINI, 1994).

As principais substâncias protéicas dos venenos podem ser divididas em neurotoxinas, miotoxinas, fatores que atuam sobre o sistema de coagulação sangüínea, hemorraginas e enzimas com pouca ou nenhuma toxicidade direta, como as fosfodiesterases, acetilcolinesterases, L-aminoácido oxidase e 5'-nucleotidases (CHIAPPAUX e GOYFFON, 1998).

1.2.1. Neurotoxinas (NTXs)

Os efeitos neurotóxicos (hipotonia muscular, paralisia flácida de músculos da face, pescoço, membros, tronco, laringe e respiração) produzidos pelas peçonhas ofídicas, especialmente serpentes elapídicas, são devidos à ação na junção neuromuscular de constituintes, denominados neurotoxinas (NTXs) (revisto por VITAL BRAZIL, 1982; MEIER e STOCKER, 1995). As NTXs ofídicas dividem-se, quanto ao modo de ação, em dois grupos:

- NTXs pós-sinápticas
- NTXs pré-sinápticas

As NTXs pós-sinápticas ligam-se aos receptores nervosos motores colinérgicos da placa terminal, sem promover despolarização da membrana dessa região da fibra muscular. Atuam de modo semelhante ao curare, bloqueando a interação entre acetilcolina liberada da membrana pré-sináptica e a subunidade α do receptor nicotínico presente nas junções neuromusculares. Como consequência desta ação, estas toxinas podem promover parada muscular e falência respiratória por paralisia flácida do diafragma.

As NTXs pré-sinápticas atuam nas terminações nervosas motoras inibindo a liberação do neurotransmissor acetilcolina na fenda neuromuscular pelos impulsos nervosos, podendo ocasionar morte e parada respiratória. Todas as NTXs pré-sinápticas exercem atividade fosfolipásica A e representam os constituintes mais tóxicos encontrados nos venenos ofídicos (revisto por VITAL BRAZIL, 1982; MEIER e STOCKER, 1995).

1.2.2. Miotoxinas

As miotoxinas atuam sobre as fibras musculares causando mionecrose, uma consequência comum dos envenenamentos por espécies botrópicas (BOLANOS, 1982; MEBS e OWNBY, 1990). Existem pelo menos dois diferentes mecanismos pelos quais, os venenos botrópicos afetam as células musculares: a) diretamente, pela ação de miotoxinas que provavelmente afetam a integridade da membrana plasmática da célula muscular esquelética; b) indiretamente, a necrose das fibras musculares, ocorre através de uma condição isquêmica produzida pela falência na microcirculação secundariamente a uma lesão vascular e hemorragia (GUTIÉRREZ et al., 1984; GUTIÉRREZ e LOMONTE, 1989).

1.2.3. Fatores que atuam sobre o sistema de coagulação sangüínea

Markland (1998), classificou os fatores que interferem com o sistema de coagulação sangüínea em: procoagulantes (ativadores de fator X, protrombina e fibrinogênio); anticoagulantes (inibidores de trombina e ativadores de proteína C);

fibrinolíticos (fatores que degradam fibrinogênio e ativadores de plasminogênio) e fatores ativos sobre plaquetas (indutores e inibidores da agregação plaquetária).

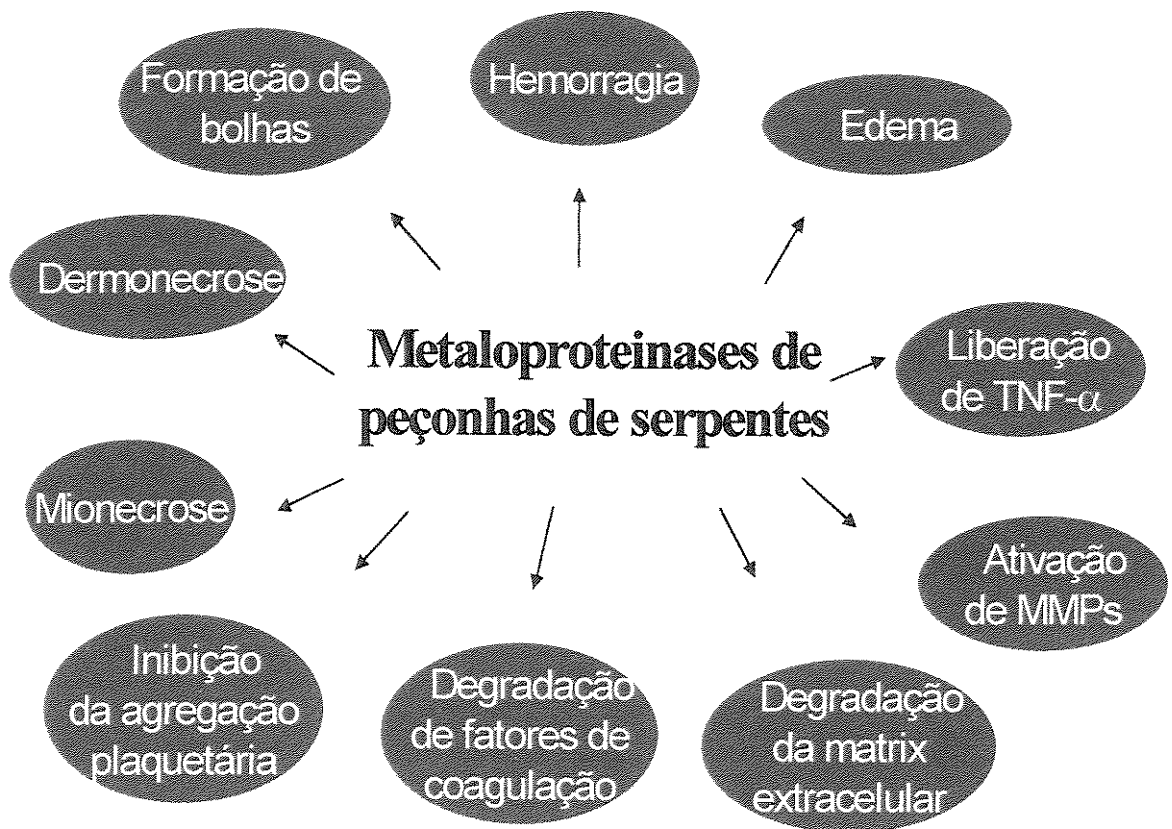
1.2.4. Outras Enzimas

- Fosfodiesterases: enzimas que hidrolizam ligações envolvendo grupos de fosfato (fosfomonoéster e fosfodiéster), atuam sobre ácidos nucleicos. São enzimas amplamente distribuídas entre os venenos das cinco famílias de serpentes venenosas.
- Acetilcolinesterases: enzimas presentes nos venenos Elapidae e Hydrophidae e ausentes em Viperidae; atuam hidrolizando acetilcolina, podendo causar paralisia muscular.
- L-aminoácido oxidase: enzima não hidrolítica, com propriedade de converter aminoácidos livres em α -cetoácido. Esta enzima tem um papel importante na agregação de plaquetas, contribuindo assim na extensão do sangramento.
- Fosfolipases: hidrolisam fosfatidilcolina dos fosfolipídeos das membranas celulares, resultando em lesão da membrana, causando vários efeitos farmacológicos e fisiopatológicos, caracterizados por mionecrose, neurotoxicidade e inflamação (VARANDA e GIANNINI, 1994; SHARMA e TAYLOR, 1987).

1.2.5. Hemorraginas / Metaloproteínases de venenos de serpentes (SVMPs)

Um dos efeitos mais sérios envolvendo a picada de serpentes da família *Viperidae* é a hemorragia. As proteínas hemorrágicas presentes nos venenos ofídicos são denominadas hemorraginas (GROTTO et al., 1967) ou fatores hemorrágicos (MANDELBAUM et al., 1976). As hemorraginas atuam degradando componentes da lâmina basal e da matriz extracelular como colágeno, elastina, fibronectina e laminina, entre outros, clivando seletivamente ligações peptídicas fundamentais para a organização estrutural/funcional da matriz extracelular, induzindo ao extravasamento de sangue dos capilares (GUTIÉRREZ e RUCAVADO, 2000; BJARNASON et al., 1988; BARAMOVA et al., 1989, 1991; MARUYAMA et al., 1993; RUCAVADO et al., 1995; OSAKA, 1979). Podem atuar também sobre outros sistemas como a cascata de coagulação e agregação plaquetária (BJARNASON e FOX, 1994; HATI et al., 1999; ANDREWS e BERNDT, 2000; MATSUI et al., 2000).

As metaloproteínases de venenos de serpentes (SVMPs) são enzimas de massas moleculares diferentes (20-100kDa), dependentes de zinco e responsáveis pela hemorragia observada em envenenamentos viperídeos (BJARNASON e FOX, 1994; HATI et al., 1999; GUTIÉRREZ e RUCAVADO, 2000), estando envolvidas também na patogênese da lesão local, como mionecrose, danificação da pele, edema e liberação de uma variedade de mediadores inflamatórios (COSTA et al., 2002; CLISSA et al., 2001; GUTIÉRREZ e RUCAVADO, 2000; GUTIÉRREZ, 1995; RUCAVADO, 1998). A figura 1 resume as múltiplas funções desempenhadas pelas SVMPs na patogênese da lesão local.



Fonte: Gutiérrez e Rucavado, 2000

Figura 1. Resumo das múltiplas funções que as SVMPs desempenham na patogênese da lesão local.

A patogênese do efeito hemorrágico tem sido estudada com várias metaloproteinases hemorrágicas, onde se relata que este efeito é induzido principalmente pelo mecanismo *per rhexis*, em que células endoteliais dos capilares sangüíneos são afetadas rapidamente após injeção de metaloproteínas, com o desenvolvimento de aberturas ou lesões através dos quais eritrócitos e outros componentes do sangue escapam para o espaço intersticial (OWNBY et al., 1987, 1990, MOREIRA et al., 1994). Outro mecanismo de indução de hemorragia foi relatado por metaloproteinases isoladas do veneno de *Trimeresurus flavoviridis*. Neste caso, a hemorragia ocorre por *diapedesis* dos eritrócitos e extravasamento do plasma através de aumento do espaço nas junções intercelulares das células endoteliais, sugerindo que metaloproteinases induzem inflamação local pela liberação de mediadores inflamatórios (OHSAKA, 1979; LOMONTE, 1994).

As SVMPs também podem ativar metaloproteínas de matriz endógenas (MMPs) pela clivagem de seu propeptídeo e liberação da forma ativa destas enzimas. Visto que MMPs são importantes na degradação e remodelamento da matriz extracelular, o aumento de sua expressão promovido pela inflamação induzida por venenos pode contribuir para a lesão tecidual por promover degradação da matriz extracelular (SHAPIRO, 1998). Um importante aumento na expressão de várias MMPs foi observado no tecido muscular e na pele após injeção de metaloproteinase BaP1 do veneno de *B. asper*. Esta mesma metaloproteinase, quando injetada por via intramuscular em camundongos, induz a formação de bolhas, sugerindo que metaloproteinases podem clivar alguns componentes fundamentais da junção dermal-epidermal, provavelmente a

integrina $\alpha_6\beta_4$ que forma o hemidesmossomo, a laminina ou algum outro componente de ancoragem (RUCAVADO et al., 1998).

As metaloproteinases de venenos desempenham importante função na complexa resposta inflamatória induzida por envenenamentos ofídicos. Fatores hemorrágicos do veneno de *B. jararaca* liberam fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) do seu precursor, sugerindo que estes fatores podem promover o processamento de uma variedade de mediadores inflamatórios das membranas celulares (MOURA DA SILVA et al., 1996).

Vários trabalhos demonstram que a injeção intramuscular de metaloproteinases hemorrágicas pode promover mionecrose (GUTIÉRREZ et al., 1995, RUCAVADO et al., 1995). Gutiérrez et al (1995) estudaram a ação da metaloproteinase BaH1 do veneno de *B. asper*, sugerindo que a lesão muscular ocorre secundariamente à isquemia desenvolvida na musculatura esquelética como uma consequência do sangramento.

Algumas metaloproteinases também afetam a função plaquetária, através de seu domínio disintegrina, e degradam fatores da coagulação sangüínea, impedindo uma resposta hemostática normal após lesão da microvasculatura (JIA et al., 1997, KAMIGUTI et al., 1996). Peptídeos contendo o domínio disintegrina da *jararhagin* foram purificados do veneno de *B. jararaca* e produziram inibição da agregação plaquetária (USAMI et al., 1994).

Baseadas na estrutura de seus domínios as SVMPs podem ser classificadas em quatro grupos (Figura 2): 1) P-I: variam de 20 a 30 kDa e

possuem apenas o domínio catalítico, 2) P-II: variam de 35 a 50 kDa, além do domínio catalítico possuem o domínio desintegrina, 3)P-III: variam de 50 a 80 kDa, composto pelo domínio catalítico, tipo desintegrina e rico em cisteína, 4) P-IV: variam de 80 a 100kDa , este grupo apresenta, além dos domínios anteriormente descritos, um adicional tipo lectina (BJARNASON E FOX, 1994; HITE et al., 1994; JIA et al., 1996).

Várias metaloproteases hemorrágicas já foram caracterizadas dos venenos botrópicos, tais como *B. asper* (BORKOW et al., 1993; GUTIÉRREZ et al., 1995; RUCAVADO et al., 1995; FRANCESCHI et al., 2000), *B. jararaca* (MANDELBAUM et al., 1982; QUEIROZ et al., 1985; ASSAKURA et al., 1986 TANIZAKI et al., 1989; MARUYAMA et al., 1993; KAMIGUTI et al., 1996), *B. moojeni* (ASSAKURA et al., 1985) e *B. neuwiedi* (MANDELBAUM et al., 1984), *Bothrops atrox* (PETRETSHI et al., 2000) e também dos venenos de *Lachesis muta muta* (SANCHEZ et al., 1987, 1991), *Trimeresurus purpureomaculatus* (KHOW et al., 2002), *Trimeresurus flavoviridis* (NIKAI et al., 2002), *Vipera ammodytes ammodytes* (LEONARDI et al., 2001), *Crotalus vegrandis* (AGUILAR et al., 2001).

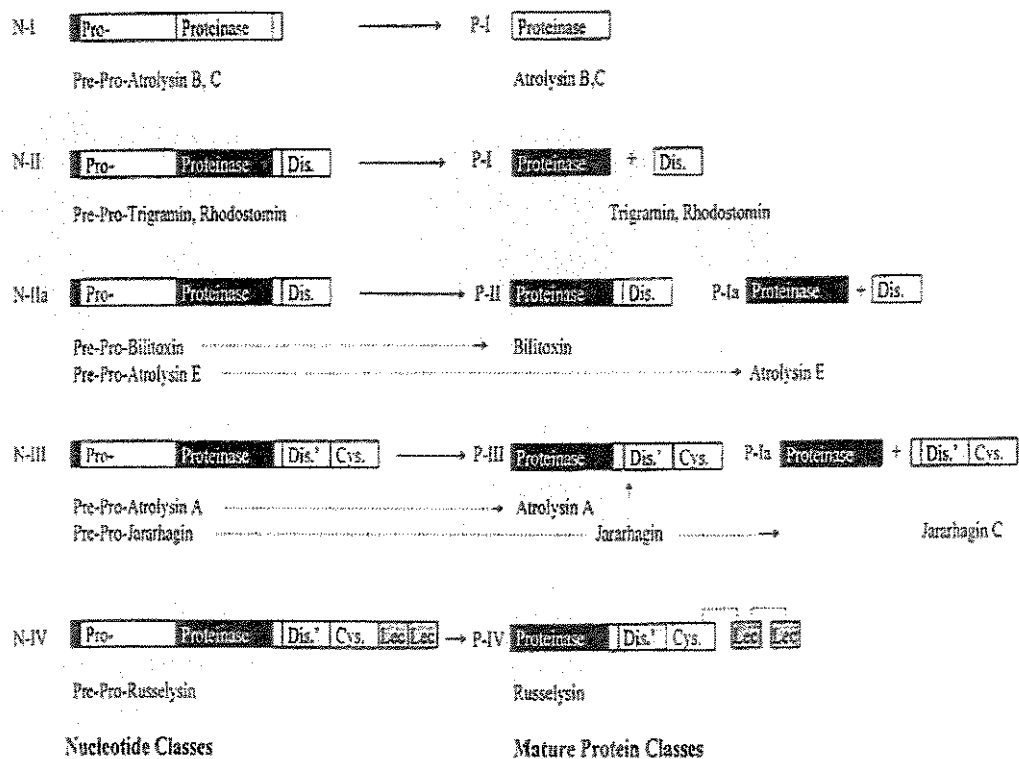


Figura 2. Representação esquemática da classificação estrutural das SVMPs. Pro- representa pró-domínio; Dis. e Dis.' representam domínios disintegrina e tipo disintegrina respectivamente. Cys. e Lec. representam domínios rico em cisteína e tipo lectina, respectivamente. Figura esquematizada por Jia et al., 1996.

1.3. VENENOS BOTRÓPICOS

Os venenos de serpentes pertencentes às subfamílias Crotalinae e Viperinae, além dos efeitos sistêmicos ou letais, causam efeitos locais caracterizados por edema, hemorragia e necrose, evidenciando um quadro fisiopatológico característico (ROSENFELD, 1971; OWNBY, 1984; GUTIÉRREZ e LOMONTE, 1989).

As peçonhas do gênero *Bothrops* possuem venenos com ações farmacológicas importantes: proteolítica, coagulante e hemorrágica (Figura 3).

- **Ação Proteolítica:** Causada por um grupo de substâncias com atividade enzimática, agindo sobre diferentes substratos (ROSENFELD, 1971), possuindo papel na necrose e no edema inflamatório desenvolvidos na região da picada (BRAZIL, 1911; JORGE e RIBEIRO, 1989; GUTIÉRREZ e LOMONTE, 1989). Secundariamente, pode haver liberação de autacóides endógenos, principalmente histamina, bradicinina e serotonina, que parecem estar relacionadas às manifestações sistêmicas (hipotensão e choque) e ao extravasamento de sangue dos capilares para o interstício da região da picada.
- **Ação Coagulante:** É a propriedade que o veneno das serpentes dos gêneros *Bothrops*, *Crotalus* e *Lachesis* tem de transformar diretamente o fibrinogênio em fibrina, devido a ação de proteases que atuam em pontos

específicos da cascata da coagulação (NAHAS et al., 1979). Esta ação é conhecida por “ação coagulante do tipo trombina” ou “thrombin-like”. Além disso, a maioria dos venenos botrópicos têm ação sobre fibrinogênio, fator X, protrombina e plaquetas da cascata da coagulação sangüínea. A fração do veneno botrópico, que possui ação coagulante, atua de maneira diferente da trombina fisiológica, devido ao fato de não ser neutralizada pela heparina. Ocorre ativação da cascata de coagulação, cujo resultado final será o consumo de fibrinogênio com incoagulabilidade sangüínea, restaurada horas após o tratamento adequado. Quando ocorre a ativação do fator X, há também consumo dos fatores V, VII e plaquetas, levando a produção de quadro de coagulação intravascular disseminada, com formação e deposição de microtrombos na rede vascular, o que poderia contribuir para desencadear a insuficiência renal aguda. (NISHIDA et al., 1994, BARRAVIEIRA e PEREIRA, 1994).

- Ação Hemorrágica: O veneno das serpentes do gênero *Bothrops* pode causar hemorragia local ou sistêmica a nível dos pulmões, cérebro e rins. A ação hemorrágica é causada por toxinas hemorrágicas caracterizadas como metaloproteinases (BJARNASON e FOX, 1994; KAMIGUTI, 1996). Estas agem sobre vasos capilares, destruindo a lâmina basal e a matriz extracelular, levando a rupturas vasculares e ao extravasamento de sangue dos capilares para o interstício da região da picada (ROSENFELD, 1971; GUTIÉRREZ et al., 1981; OSAKA, 1979; BARRAVIERA e PEREIRA, 1994).

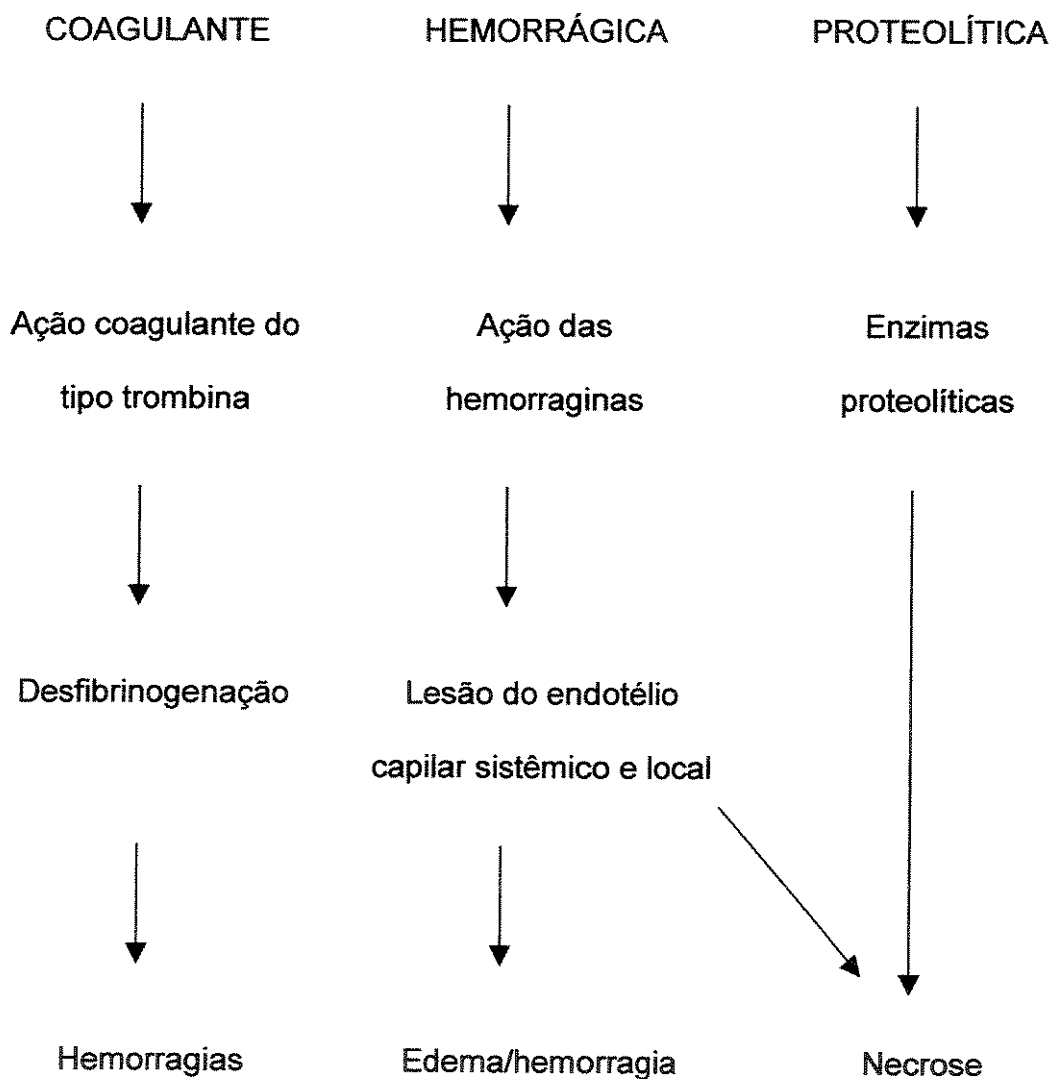


Figura 3. Resumo das ações exercidas pelos venenos botrópicos (Barraviera e Pereira, 1994).

Uma das principais manifestações apresentadas pelos pacientes acidentados por serpentes do gênero *Bothrops* é a incoagulabilidade sangüínea, relacionada com a depleção do fibrinogênio, e a hemorragia, que normalmente se restringe ao local da picada, podendo, entretanto ser sistêmica, nos casos mais graves (BARRAVIERA e PEREIRA, 1994). As manifestações e complicações mais referidas como possíveis causas de óbitos são insuficiência renal, septicemia e choque (RIBEIRO et al., 1998). Os efeitos sistêmicos podem ser observados através das hemorragias à distância como hematêmese, hematúria, epistaxes e gengivorragia. Ocorrem também manifestações locais como dor, edema, bolhas, equimoses e necrose (BARRAVIERA e PEREIRA, 1994; Ministério da Saúde, 1998).

O tratamento do acidente botrópico consiste em se internar o paciente, colocá-lo em repouso e na posição de drenagem postural, para que ocorra a remissão mais rápida do edema. Quando necessário, deve ser feito o tratamento local das lesões com banhos anti-sépticos e quando houver infecção secundária, indica-se a terapia com antibióticos. Imunoprofilaxia contra o tétano deve ser realizada e o soro antiofídico deve ser administrado o mais precocemente possível, em dose única, de preferência por via intravenosa, com o objetivo de neutralizar a peçonha antes que ela possa ter causado dano (BARRAVIERA e PEREIRA, 1994).

No Brasil, das 69 espécies de serpentes venenosas catalogadas, 32 pertencem ao gênero *Bothrops* (HOGE e ROMANO HOGE, 1972). Três espécies endêmicas são também reconhecidas: *Bothrops insularis*, na ilha da Queimada

Grande (Brasil), *Bothrops carabaeus* (Antilhas) e *Bothrops lanceolatus* (Ilha da Martinica , Caribe) (WÜSTER et al., 1997).

1.4. *Bothrops lanceolatus*

A *Bothrops lanceolatus* ou “Fer de lance”, (Figura 4) é uma serpente de grande porte, que habita as regiões úmidas da ilha de Martinica no Caribe (CAMPBELL e LAMAR, 1989), sendo responsável por cerca de 20 acidentes por ano (THOMAS et al., 1995, 1998). O veneno de *Bothrops lanceolatus* quando comparado a algumas espécies de *Bothrops* brasileiras apresentou atividade caseinolítica, fosfolipásica, esterásica e hemorrágica (LÔBO DE ARAÚJO et al., 1990).

O veneno desta serpente foi capaz de aumentar o tempo de tromboplastina parcial ativada do plasma humano, e dele foi purificada uma fosfolipase A₂ ácida com atividade anticoagulante (LÔBO DE ARAÚJO, 1994). Ainda deste veneno foi isolada uma enzima fibrino(geno)lítica que degrada as cadeias α e β do fibrinogênio (LOBO DE ARAÚJO et al., 1998).

As ações coagulante e anti-coagulante do veneno de *Bothrops lanceolatus* foram demonstradas quando se verificou que este veneno apresenta uma atividade *thrombin-like* sobre o fibrinogênio purificado e não coagula o plasma humano, indicando a presença de uma ação inibitória sobre a cascata da coagulação. Estas observações sugerem que a proteína fibrino(geno)lítica

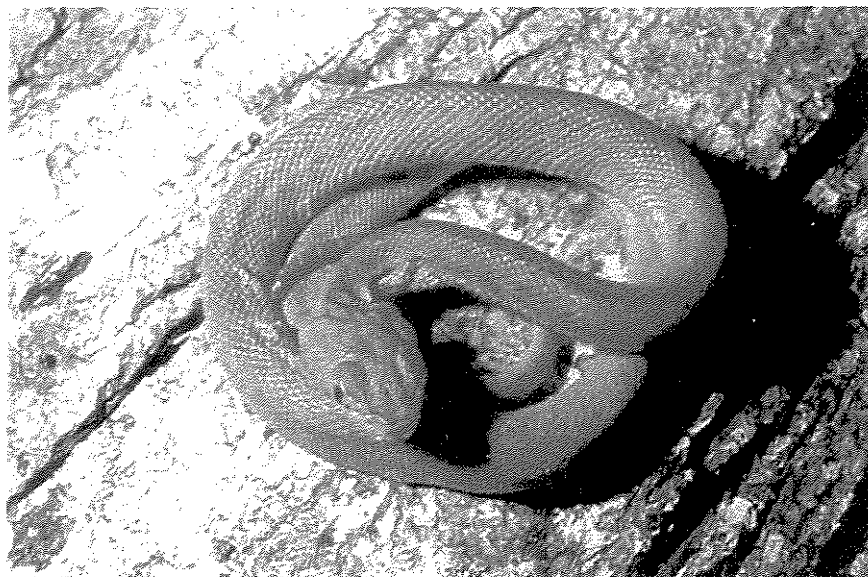
purificada pode atuar sinergicamente com a fosfolipase A₂ e aumentar a ação anti-coagulante do veneno (LÔBO DE ARAÚJO et al., 2001).

Foi comprovado também que o veneno de *Bothrops lanceolatus* produz aumento da permeabilidade vascular e edema em patas de camundongos, sendo este seguido por infiltrado leucocitário e mediado principalmente por metabólitos do ácido araquidônico, via lipoxigenase (LÔBO DE ARAÚJO et al., 2000). Experimentos realizados em patas de ratos mostraram que este veneno produz edema, acompanhado de hemorragia, e que este é afetado tanto pelo tratamento: 1) físico (FARIA et al., 2001), sugerindo o envolvimento de componentes termolábeis na indução do edema, já que o aquecimento do veneno reduziu significativamente a resposta edematogênica, 2) químico (GUIMARÃES et al., 2004), onde o veneno tratado com EDTA também produziu uma redução significativa do edema.

Mais recentemente, (ARRUDA et al., 2003) demonstrou que a migração de neutrófilos induzida pela *B. lanceolatus* na cavidade peritoneal de camundongos, é mediada por produtos da 5-lipoxigenase, e que macrófagos residentes são provavelmente a principal fonte de substâncias quimiotáticas. Do veneno desta serpente também foi isolada uma proteína caseinolítica capaz de induzir bloqueio neuromuscular em preparações de biventer cervicis de pintainho e despolarização do músculo diafragma de camundongos, com ação exclusivamente pós-sináptica (LÔBO DE ARAÚJO et al., 2002).

Muitos destes achados estão de acordo com observações clínicas em pacientes envenenados por esta espécie onde foram relatados edema, dor, sangramento e alterações sistêmicas como embolia pulmonar, enfarto do miocárdio e enfarte cerebral (THOMAS et al., 1995, 1998; BUCHER et al., 1997). Ainda, o envenenamento por esta serpente pode ocasionar sintomas sistêmicos como trombocitopenia e coagulação intravascular disseminada. O tratamento convencional dos acidentes é feito por terapia anticoagulante preventiva e soroterapia específica, o qual apresenta eficácia limitada na prevenção das complicações locais. Já as complicações trombóticas não são observadas quando o antiveneno é administrado até seis horas após a picada (THOMAS et al., 1995,1998).

Considerando que as metaloproteinases de venenos de serpentes são importantes para o desenvolvimento dos efeitos locais e sistêmicos decorrentes do envenenamento ofídico, em que a hemorragia é freqüentemente observada, o estudo destas enzimas hemorrágicas pode ser muito importante para a compreensão dos mecanismos envolvidos em processos fisiológicos e patológicos do envenenamento, além de constituir um relevante alvo para o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos. Assim, este trabalho tem a perspectiva de tornar-se uma ferramenta para melhor entendimento do papel das proteínas hemorrágicas nos efeitos locais observados em acidentes botrópicos, especialmente envolvendo a *Bothrops lanceolatus*.



Fonte: Campbell e Lamar 1989

Figura 4. *Bothrops lanceolatus* (Fer de lance)



2.OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

- Identificação e purificação de uma proteína (hemorragina) presente na peçonha de *Bothrops lanceolatus* responsável pelo efeito hemorrágico.
- Caracterização química desta hemorragina pela determinação da atividade enzimática sobre diferentes substratos.
- Caracterização biológica da hemorragina pela determinação da atividade hemorrágica.
- Caracterização imunológica através das interações antígeno-anticorpo.



3. ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO

**PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF A HEMORRHAGIC
METALLOPROTEINASE FROM *Bothrops lanceolatus*
(FER-DE-LANCE) SNAKE VENOM**

Alessandra Stroka^a, José L. Donato^a, Cassian Bon^b,
Stephen Hyslop^a and Albetiza Lôbo de Araújo^{a,*}

^aDepartamento de Farmacologia, Faculdade de Ciências Médicas (UNICAMP),
Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), CP 6111, 13083-970,
Campinas, SP, Brazil

^bUnité des Venins, Institut Pasteur, 25 rue du Dr. Roux, 75724, Paris, France

Running title: A hemorrhagin from *B. lanceolatus* venom

Keywords: *Bothrops lanceolatus*; Caseinolytic; Hemorrhage; Hemorrhagin;
Metalloproteinase; Proteolytic; Snake venom

*Corresponding author. Tel: +55-19-3788-9529/9532; fax: +55-19-3289-2968.

E-mail address: albetiza@fcm.unicamp.br

ABSTRACT

Bothrops snake venoms contain metalloproteinases that contribute to the local effects seen after envenoming. In this work, a hemorrhagic metalloproteinase (BlaH1) was purified from the venom of the snake *Bothrops lanceolatus* by a combination of gel filtration, affinity (metal chelating) and hydrophobic interaction chromatographies. The hemorrhagin was homogeneous by SDS-PAGE and had a molecular mass of 28 kDa that was unaltered by treatment with β -mercaptoethanol. BlaH1 gave a single band in immunodiffusion, immunoelectrophoresis and immunoblotting using commercial bothropic antivenom. This reactivity was confirmed by ELISA. BlaH1 had hemorrhagic, caseinolytic, fibrinogenolytic, collagenolytic and elastinolytic activities, but no phospholipase A₂ activity. The hemorrhagic and caseinolytic activities were inhibited by EDTA, indicating that they were metal ion-dependent. In contrast, aprotinin, benzamidine and PMSF did not affect these activities. The caseinolytic activity of BlaH1 had a pH optimum of 8.0 and was stable in solution at up to 40°C; activity was completely lost at $\geq 70^\circ\text{C}$. The hemorrhagic activity was neutralized by commercial bothropic antivenom. These properties suggest that this new hemorrhagin belongs to class P-I snake venom metalloproteinases.

Footnote:

¹Abbreviations: EDTA, ethylenediaminetetraacetic acid; PMSF, phenylmethylsulphonyl fluoride; PVDF, polyvinylidene difluoride; SDS, sodium dodecyl sulfate; SVMP, snake venom metalloproteinase; TAME, N α -p-tosyl-L-arginine methyl ester; TEMED, N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine.

1. Introduction

Envenoming by *Bothrops* species is characterized by prominent local tissue damage, including edema, pain, hemorrhage and necrosis, and by systemic disturbances such as coagulopathies, systemic hemorrhage and renal failure [1-4]. The local effects have a rapid onset after venom inoculation and are mediated by principally by (metallo)proteinases and phospholipase A₂ myotoxins in the venom [1,5-9].

Local hemorrhage after envenomation is caused by snake venom metalloproteinases (SVMPs) or hemorrhagins that require Ca²⁺ or Zn²⁺ for full activity. SVMPs are enzymes of varying molecular mass (20-100 kDa) that hydrolyze proteins of the basal lamina of microvessels to cause extravasation of fluid and cells [10,11]. These enzymes are also involved in the pathogenesis of local myonecrosis, skin damage, edema, and other reactions associated with inflammation [9,12-14].

Based on their domain structure, SVMPs have been classified into four classes, P-I to P-IV. Metalloproteinases of class P-I include proteins with molecular masses of 20-30 kDa and contain only a proteinase domain. Class P-II SVMPs comprise proteins with molecular masses of 30-60 kDa that contain protease and disintegrin-like domains. Class P-III SVMPs include a cysteine-rich domain, in addition to proteinase and disintegrin-like domains, while class P-IV SVMPs possess the class P-III domains and disulfide-bonded, lectin-like domains [10,15].

Bothrops lanceolatus (Fer de lance), a venomous snake found only on the island of Martinique in the Caribbean, is responsible for about 20 envenomings per

year. Envenoming by *B. lanceolatus* leads to swelling, pain, hemorrhage, and systemic coagulopathy that can produce severe thrombosis [16-18]. In agreement with this, the venom of this species causes edema and increases vascular permeability in mouse [19] and rat [20,21] hind paws, and also induces neutrophil migration into mouse peritoneal cavities [22]. In addition, *B. lanceolatus* venom clots purified fibrinogen, indicating the presence of a thrombin-like enzyme, but also inhibits the coagulation cascade [23]. *Bothrops lanceolatus* venom contains caseinolytic, phospholipase, esterolytic and hemorrhagic activities [24], and an acidic phospholipase A₂ and a fibrino(geno)lytic enzyme have isolated from this venom [25-26]. In this report, we describe the purification and characterization of a hemorrhagic metalloproteinase from *B. lanceolatus* venom.

2. Material and methods

2.1. Reagents

Acrylamide, ammonium persulfate, agarose, amidoschwartz, aprotinin, benzamidine, bovine casein, bovine serum albumin, bromophenol blue, collagen (bovine Achilles tendon), elastin-Congo red, EDTA (sodium salt), fibrinogen, β -mercaptoethanol, N,N'-methylene-bis-acrylamide, molecular weight markers for electrophoresis, ninhydrin reagent, 4-nitro-3-(octanoyloxy)benzoic acid, PVDF membrane, PMSF, rabbit anti-horse IgG-peroxidase conjugate, sodium dodecyl sulphate (SDS), N α -p-tosyl-L-arginine methyl ester (TAME), N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine (TEMED), and Tween 20 were from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). Glycine, Tris and all chromatographic media were from

Amersham Biosciences (Piscataway, NJ, USA). West Pico trial kits for chemiluminescence detection were from Pierce (Rockford, MD, USA). All other reagents used were of analytical grade. Ninety-six-well microliter plates were from Corning (Corning, MA, USA).

2.2. Venom and antivenom

Bothrops lanceolatus venom was supplied by the Unité des Venins, Institut Pasteur (Paris, France). The venom was stored at -20°C until used. Commercial equine antivenom raised against a pool of *Bothrops* venoms (*B. alternatus*, *B. jararaca*, *B. jararacussu*, *B. moojeni* and *B. neuwiedi*) [27] was obtained from the Instituto Butantan (São Paulo, SP, Brazil).

2.3. Animals

Male Wistar rats (200-250 g) were obtained from the Central Animal House Services (CEMIB) at UNICAMP. The rats were housed 5/cage at 22°C and had access to water and food *ad libitum* until used. The experiments with animals described here were done in accordance with the guidelines established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA).

2.4. Purification of hemorrhagin

2.4.1. Gel filtration chromatography on Sephadex G-100

Bothrops lanceolatus venom (100-200 mg) was dissolved in 0.05 M Tris-HCl, pH7.5, and centrifuged at $10,000 \times g$ for 5 min. The supernatant was applied

to a column (1.2 cm x 75 cm) of Sephadex G-100 equilibrated and eluted with the same buffer at 4°C. The venom was eluted at a flow rate of 5 ml/h (1.5 ml/fraction) and the elution profile was monitored at 280 nm using a Uvikon 810 spectrophotometer (Kontron Instruments, Milan, Italy). The fractions were assayed for hemorrhagic and proteolytic activities as described below. The fractions containing hemorrhagic activity were pooled and dialyzed against Milli-Q water prior to the next step.

2.4.2. Affinity chromatography on a HiTrap chelating column

The active fractions from the previous step were applied to a HiTrap chelating column (1 ml) that had been charged with 0.1 M ZnSO₄, washed with water and equilibrated with 0.05 M phosphate buffer, pH 7.5. After washing the column with phosphate buffer to remove unbound material, bound proteins were eluted with a linear gradient (0 - 1.0 M) of NaCl at a flow rate of 60 ml/h. The elution profile was monitored at 280 nm using an ÄKTAprime chromatography system (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA). Fractions of 1 ml were collected and screened for hemorrhagic and proteolytic activities. Active fractions were pooled for the next chromatographic step.

2.4.3. Hydrophobic interaction chromatography on high performance phenyl-Sepharose

Ammonium sulphate (1 M) was added to the active pool from the previous step. The mixture was then applied to a 1 ml column of high performance phenyl-

Sepharose equilibrated with 0.05 M phosphate buffer, pH 7.0, containing 1 M ammonium sulphate. After washing the column to remove unbound material, bound proteins were eluted with a decreasing linear gradient (1.0 – 0 M) of ammonium sulphate in phosphate buffer at a flow rate of 30 ml/h. The elution profile of the proteins was monitored by the absorbance at 280 nm using an ÄKTAprime chromatography system. Fractions of 1 ml were collected and assayed for hemorrhagic and proteolytic activities. Active fractions were pooled and stored at -20°C.

2.5. Protein quantification

The protein concentrations of the venom and purified hemorrhagin were determined by the method of Lowry et al. [28], using bovine serum albumin as standard.

2.6. Sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

The purity and molecular mass of the purified hemorrhagin were determined by SDS-PAGE using 12% gels [29]. Samples of venom and hemorrhagin were prepared in sample buffer (0.05 M Tris-HCl, pH 6.8, containing 10% SDS, 10% glycerol and 0.1% bromophenol blue) and then boiled for 5 min before applying to the gels (10 cm x 10 cm). In some cases, β -mercaptoethanol was added to the samples (final concentration 10%). After electrophoresis at 100 V (constant) in a miniVE vertical electrophoresis system (Hoefer-Amersham Biosciences, San

Francisco, CA, USA), the gels were fixed and silver stained prior to documentation. Protein molecular mass markers were included in the runs.

2.7. Immunological studies

2.7.1. Immunodiffusion

Double immunodiffusion was done on glass slides using 1% agar gels prepared in 0.1 M Tris-HCl, pH 8.0. *Bothrops lanceolatus* venom (10 µg) and hemorrhagin (5 µg) were allowed to diffuse against undiluted commercial bothropic antivenom (10 µl) for up to 48 h at room temperature in a humidified chamber. After extensive washing with 0.9% NaCl, the gels were dried and the precipitin lines were stained for 10 min with amidoschwartz (0.4% in 10% acetic acid) followed by destaining in the same solution without dye. The slides were subsequently dried and documented.

2.7.2. Immunoelectrophoresis

Immunoelectrophoresis was done in 1% agar gels poured on glass slides. Samples of venom (10 µg) and hemorrhagin (5 µg) were applied to the gels and run for 1.5 h at 120 V in 0.1 M Tris-HCl buffer, pH 8.0 [30]. Following electrophoresis, undiluted commercial bothropic antivenom (40 µl) was placed in the central trough and the slides were incubated for 48 h at room temperature in a humidified chamber. After extensive washing in 0.9% (w/v) NaCl, the gels were stained with amidoschwartz as described above.

2.7.3. Immunoblotting

Following electrophoresis as described in section 2.6, the proteins were transferred to PVDF membranes (Hybond-P, Amersham) [31] in a Mighty Small TE-22 transfer chamber (Hoefer-Pharmacia). After transfer, non-specific sites on the membranes were blocked for 2 h by incubating with 5% non-fat milk and 0.05% Tween 20 solution. After six washes with Tris-buffered saline (TBS, pH 7.6), the membranes were incubated overnight at room temperature with commercial bothropic antivenom diluted 1:1000 in TBS. Following a further three washes, the membranes were incubated for 2 h at 20°C with a rabbit anti-horse IgG-peroxidase conjugate diluted 1:4000 in TBS. After a final series of washes, the immunoreactive bands were detected by chemiluminescence (ECL, Pierce).

2.7.4. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

Ninety-six-well microtiter plates were coated with 100 µl of antivenom (diluted 1:1000 in 0.05 M carbonate buffer, pH 9.6) overnight at 4°C. The wells were subsequently washed three times with 9% (w/v) NaCl containing 0.5% Tween 20 (PBS-T), and various quantities of venom or hemorrhagin (diluted in 100 µl of 0.15 M phosphate-buffered saline, pH 7.4, containing 0.5% Tween 20 and 0.25% bovine casein; incubation buffer) were then added followed by incubation for 1 h at room temperature. After another series of washes with PBS-T, an affinity-purified anti-bothropic IgG-peroxidase conjugate (diluted 1:400 in incubation buffer) was added to each well (100 µl/well) and the plate then incubated for 1 h at room temperature. Following a final series of washes with PBS-T, substrate solution (100

μl of a solution containing 0.2 mg of O-phenylenediamine/ml and 0.05% H_2O_2 in 0.15 M citrate buffer, pH 5.0) was added and the plate incubated in the dark at room temperature for up to 30 min. The reaction was terminated by adding 50 μl of 5% H_2SO_4 and the final absorbance was read at 492 nm in a SpectraMax 340 plate reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA).

2.8. Determination of hemorrhagic activity

The hemorrhagic activity of the venom and hemorrhagin was assayed as described by Theakston and Reid [32]. Saline (100 μl), with or without venom or hemorrhagin, was injected intradermally into the shaved, dorsal skin of male Wistar rats. Twenty-four hours later, the rats were killed with an overdose of halothane and the skin was carefully removed, without stretching, and the diameter of the hemorrhagic spot on the inner surface of the skin was measured. The minimum hemorrhagic dose (MHD) was defined as the amount of venom or hemorrhagin capable of producing a spot 10 mm in diameter (mean of two perpendicular diameters).

2.9. Enzymatic assays

2.9.1. Proteolytic activity

General proteolytic activity was assayed in 0.1 M Tris-HCl, pH 7.8, using casein as substrate [33]. One unit of activity was defined as an increase of 0.001 absorbance units at 280 nm/min.

Collagenase activity was assayed essentially as described elsewhere [34,35] using bovine Achilles tendon collagen in 0.05 M Tris-HCl, pH 7.8, as substrate. The hydroxyproline released during a 24 h incubation was detected by reaction with ninhydrin reagent followed by boiling for 20 min. After cooling, 50% N-propanol was added and the resulting absorbance was read at 600 nm. Collagenolytic activity was expressed as the increase in absorbance at 600 nm/mg.

Elastase activity was assayed as described by Shotton [36] using elastin-Congo red as substrate in 0.02 M sodium borate buffer, pH 8.8. The reaction was stopped by adding 300 μ l of glacial acetic acid and the samples then centrifuged for 10-15 min at room temperature [36-37]. The increase in absorbance of the supernatants was measured at 495 nm. Enzymatic activity was expressed as the increase in absorbance at 495 nm/mg protein.

2.9.2. Esterase

Esterolytic activity was assayed in 0.1 M Tris-HCl, pH 7.8, as described by Viljoen et al. [37], using TAME as substrate. The increase in absorbance at 247 nm was recorded continuously and the rate of change/min calculated. One unit of activity was defined as an increase of 0.001 absorbance units at 247 nm/min.

2.9.3. Phospholipase A₂

PLA₂ activity was assayed in 96-well plates, as described by Beghini et al. [38]. Each well contained 100 μ l of buffer (10 mM Tris-HCl, 10 mM CaCl₂, 100 mM NaCl, pH 8.0), 40 μ l of venom or hemorrhagin and 100 μ l of substrate (4-nitro-3-

(octanoyloxy)benzoic acid). The increase in absorbance at 425 nm was recorded for up to 30 min in a SpectraMax 340 multiwell plate reader and the activity was expressed as the absorbance increase at 425 nm/mg.

All assays were run in duplicate and were corrected for appropriate blanks.

2.9.4. Fibrinogenolytic activity

Fibrinogenolytic activity was assayed by incubating 200 μ l of a fibrinogen solution (5 mg/ml) in 0.01 M Tris-HCl, pH 8.0, with 100 μ l of hemorrhagin (20 μ g). Aliquots of 40 μ l were withdrawn at 1, 5, 15, 30, 60 and 120 min after the start of incubation and added to 60 μ l of a denaturing solution (10 M urea, 4% SDS and 4% β -mercaptoethanol). The mixtures were then incubated for 24 h at 37°C prior to analysis by SDS-PAGE.

2.10. Enzymatic properties of the hemorrhagin

2.10.1. pH optimum

The pH optimum for the caseinolytic activity of the hemorrhagin was determined over the pH range of 5-10 using the general proteolytic assay in phosphate (pH 5-6), Tris (pH 7-8), and glycine (pH 9-10) buffers (all 0.1 M).

2.10.2. Heat stability

The heat stability of the hemorrhagin was examined by incubating aliquots at 30, 40, 50, 60 and 70°C for 30 min followed by cooling on ice and determination of the residual proteolytic and hemorrhagic activities.

2.10.3. Effect of inhibitors

The effects of aprotinin, benzamidine, EDTA and PMSF were examined by pre-incubating the hemorrhagin with these compounds (final concentration, 5 mM in all cases) for 60 min at room temperature (~25°C). After incubation, the residual proteolytic and hemorrhagic activities were assayed.

2.11. Neutralization by antivenom

The ability of commercial bothropic antivenom to neutralize the hemorrhagic activity was determined by pre-incubating the hemorrhagin with antivenom for 30 min at 37°C followed by assaying the residual activity.

3. Results

3.1. Purification of the hemorrhagin

The hemorrhagin from *B. lanceolatus* venom (BlaH1) was purified in three chromatographic steps. Fractionation of the venom on Sephadex G-100 yielded three peaks (P1, P2 and P3) (Fig. 1A), only the first of which (P1) showed hemorrhagic activity when tested in rat skin. The active fractions of P1 were pooled and chromatographed on a HiTrap chelating column. All of the hemorrhagic activity eluted in the unbound peak (P1a) before the salt gradient (Fig. 1B). This hemorrhagic peak was further purified on a phenyl-Sepharose column (Fig. 1C). Hemorrhagic and proteolytic activities were found in peaks 1 and 4, but peak 4 showed several bands on SDS-PAGE (not shown), whereas peak 1 (*B. lanceolatus*

hemorrhagin 1 or BlaH1) was homogeneous by SDS-PAGE and accounted for 0.8-1% of the venom protein. The molecular mass of BlaH1 as estimated by SDS-PAGE was 28 kDa (Fig. 2), and this value was unaltered by treatment with β -mercaptoethanol (not shown), indicating that BlaH1 was a single chain polypeptide.

3.2. Immunological properties

A single immunoreactive band with a molecular mass equal to that seen in SDS-PAGE gels stained for protein was observed when BlaH1 was immunoblotted with commercial bothropic antivenom and a rabbit anti-horse IgG-peroxidase conjugate (Fig. 3A). Immunodiffusion and immunoelectrophoresis of BlaH1 with this antivenom also gave only one precipitin line (Fig. 3B and C, respectively), thus indicating the purity of the preparation. ELISA confirmed the reactivity of BlaH1 with the antivenom (Fig. 4).

3.3. Enzymatic characteristics

BlaH1 showed proteolytic activity towards casein, with a specific activity of 70.5 units/mg of protein compared to 17.4 units/mg of protein for the venom. BlaH1 also showed collagenolytic, elastinolytic and esterolytic activities; no phospholipase A₂ activity was detected (Table 1). The optimal pH for the caseinolytic activity of BlaH1 was 8.0 (Fig. 5). This enzymatic activity was thermolabile since a decrease was observed after incubation at 50°C, with complete loss at $\geq 70^\circ\text{C}$ (Fig. 6A). BlaH1 also had fibrinogenolytic activity, with rapid degradation of the A α -chain of the fibrinogen; the B β -chain was considerably less sensitive to degradation (Fig. 7).

3.4. Hemorrhagic activity

The MHD for BlaH1 in rat dorsal skin was 5 μ g, which was nearly 10-fold more potent than the venom (MDH, 46.5 μ g). The hemorrhagic activity of BlaH1 was stable up to 40°C, but was completely lost at 70°C (Fig. 6B).

3.5. Effect of enzyme inhibitors

The caseinolytic activity of BlaH1 was completely abolished by preincubation with 5 mM EDTA, which also inhibited the hemorrhagic activity. In contrast, aprotinin, benzamidine and PMSF did not affect either activity (Table 2).

3.6. Neutralization by antivenom

Commercial bothropic antivenom neutralized the hemorrhagic activity of BlaH1 in a concentration-dependent manner (Fig. 8).

4. Discussion

Hemorrhage is one of the most prominent local effects of crotalid venoms and plays an important role in the pathophysiology of experimental and clinical envenoming [10,39,40]. The main snake venom components responsible for this activity are hemorrhagic metalloproteinases [11], several of which have been purified and characterized from *Bothrops* species, including *B. asper* [41–43], *B. atrox* [44], *B. jararaca* [44–47], *B. moojeni* [48] and *B. neuwiedi* [49].

As shown here, we have purified a hemorrhagic metalloproteinase, BlaH1, from the venom of *B. lanceolatus* by a combination of gel filtration (Sephadex G-100), affinity (chelating) and hydrophobic interaction (phenyl-Sepharose HP) chromatographies. The yield of BlaH1 (0.8-1% of the venom protein) was similar to that reported for other venom hemorrhagic metalloproteinases purified by a variety of procedures [41,50-52]. *Bothrops lanceolatus* venom apparently contains more than one hemorrhagic proteinase, as shown by the two peaks (1 and 4) with hemorrhagic activity obtained by hydrophobic interaction chromatography. Peak 4 had principal bands in the region of 40-60 kDa on SDS-PAGE (not shown) and was not investigated further here.

The molecular mass of BlaH1 by SDS-PAGE (28 kDa) was similar to the 26 and 24 kDa reported for *B. asper* hemorrhagins BH2 and BaP1, respectively [41,42], and to the 24 and 25.7 kDa for *C. atrox* hemorrhagins Ht-a,c,d and Ht-e [53]. In agreement with this, BlaH1 gave a single band in the absence or presence of β -mercaptoethanol, as also reported for other low molecular mass hemorrhagic factors [54]. The purity of the final preparation was demonstrated by immunodiffusion, immunoelectrophoresis and immunoblotting, all of which gave a single band or precipitin line, as also described for other such proteins [41,43].

BlaH1 showed strong hemorrhagic and proteolytic activities, with an MHD almost 10-fold more potent than that of the venom. The proteolytic activity of BlaH1 had an alkaline pH optimum, and both the hemorrhagic and proteolytic activities were thermolabile. Although many hemorrhagins are heat labile and rapidly lose activity at $>70^{\circ}\text{C}$ [42,51], Ownby and Colberg [56] reported that the venoms of

some *Agkistrodon*, *Bitis*, *Bothrops* and *Crotalus* species contained heat-stable hemorrhagic factors that retained activity after heating at 100°C for 5 min.

The inhibition of the hemorrhagic and proteolytic activities of BlaH1 by EDTA, but not by inhibitors of serine and kallikrein-like proteinases, indicated that this protein was a metalloproteinase, as also reported for hemorrhagins isolated from other snake venoms [41-43,51,52,57]. The similar inhibition profiles of the proteolytic and hemorrhagic activities of BlaH1 in the presence of EDTA suggested that the two activities may be related and interdependent. This conclusion is supported by the similar thermostability profiles for the two activities and agrees with the idea that proteolytic degradation of the basement membrane components of capillary vessels by hemorrhagic metalloproteinases is a key step in the tissue damage produced by these toxins [10,11,58].

Compared to the venom, BlaH1 had low arginine esterase activity towards TAME, as also reported for uracoin-1, a metalloproteinase isolated from *Crotalus vegrandis* venom [51]. Nevertheless, BlaH1 caused a rapid degradation of the A α -chain of fibrinogen and, with longer incubation times, also affected the B β -chain. This finding suggests that this toxin could interfere with the coagulation cascade following envenoming, although this remains to be determined. Metalloproteinases with a similar pattern of fibrinogenolytic activity to that of BlaH1 have been isolated from other snake venoms, such as *B. asper* [42], *B. jararaca* [58] and *Crotalus vegrandis* [51].

The ability of BlaH1 to interact with commercial bothropic antivenom in various immunological tests indicated that this protein was antigenic and that it

shared immunological identity with metalloproteinases present in other *Bothrops* venoms, even though *B. lanceolatus* venom is not part of the pool of venoms used to produce the commercial antivenom. In agreement with these findings, Bogarín et al. [55] showed that a monospecific *B. lanceolatus* antivenom was effective in cross-neutralizing the lethal, hemorrhagic, myotoxic and indirect hemolytic activities of *B. asper* and *B. atrox* venoms. The ability of the antivenom to neutralize the hemorrhagic activity of BlaH1 suggests that this activity may also be neutralized *in vivo* should this antivenom be used to treat envenomings by *B. lanceolatus*.

In conclusion, we have purified a metalloproteinase, BlaH1, with hemorrhagic and caseinolytic activity, from *B. lanceolatus* venom. The properties of BlaH1 indicate that this protein probably belongs to class P-I SVMPs. This metalloproteinase may contribute to the hemorrhage seen in patients envenomed by *B. lanceolatus*.

Acknowledgments

The authors thank José Ilton dos Santos and Alessandra Priscila Ponciano for technical assistance, Ágatha C. Corradini, Alessandra Linardi and Gabriela A. Wagner for help with some of the experiments, and Sueli M. Melo for preparing the affinity-purified anti-bothropic IgG-peroxidase conjugate. A.S. was supported by a studentship from the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP). This work was partially funded by the Fundo de Apoio ao Ensino e Pesquisa (FAEP-UNICAMP).

References

- [1] G. Rosenfeld, Symptomatology, pathology and treatment of snake bites in South America, in: W. Bücherl, E. Buckley, V. Deulofeu (Eds.), *Venomous Animals and their Venoms*, vol. 1, Academic Press, New York, 1971, pp. 345-403.
- [2] G. Watt, Snakebite treatment and first aid, in: J.A. Campbell, W.W. Lamar (Eds.), *The Venomous Reptiles of Latin America*, Comstock Publishing Associates, Cornell University Press, Ithaca, 1989, pp. 6-13.
- [3] H.W. Fan, J.L.C. Cardoso, Clinical toxicology of snake bites in South America, in: J. Meier, J. White (Eds.), *Handbook of Clinical Toxicology of Animal Venoms and Poisons*, CRC Press, Boca Raton, 1995, pp. 667-688.
- [4] F.O.S. França, C.M.S. Malaque, Acidente botrópico, in: J.L.C. Cardoso, F.O.S. França, F.H. Wen, C.M.S. Malaque, V. Haddad Jr (Eds.), *Animais Peçonhentos no Brasil: Biologia, Clínica e Terapêutica dos Acidentes*, Sarvier, São Paulo, 2003, pp. 72-86.
- [5] J.M. Gutiérrez, B. Lomonte, Local tissue damage induced by *Bothrops* snake venoms, *Mem. Inst. Butantan* 51 (1989) 211-223.
- [6] J.M. Gutiérrez, B. Lomonte, Phospholipase A₂ myotoxins from *Bothrops* snake venoms, *Toxicon* 33 (1995) 1405-1424.
- [7] J.M. Gutiérrez, B. Lomonte, Efectos locales en el envenenamiento ofídico en América Latina, in: J.L.C. Cardoso, F.O.S. França, F.H. Wen, C.M.S. Malaque,

- V. Haddad Jr (Eds.), *Animais Peçonhentos no Brasil: Biologia, Clínica e Terapêutica dos Acidentes*, Sarvier, São Paulo, 2003, pp. 310-323.
- [8] A.S. Kamiguti, C.R. Hay, R.D.G. Theakston, M. Zuzel, Insights into the mechanism of haemorrhage caused by snake venom metalloproteinases, *Toxicon* 34 (1996) 627-642.
- [9] A. Rucavado, J. Núñez, J.M. Gutiérrez, Blister formation and skin damage induced by BaP1, a hemorrhagic metalloproteinase from the venom of the snake *Bothrops asper*, *Int. J. Exp. Pathol.* 79 (1998) 245-254.
- [10] J.B. Bjarnason, J.W. Fox, Hemorrhagic metalloproteinases from snake venoms, *Pharmacol. Ther.* 62 (1994) 325-372.
- [11] J.M. Gutiérrez, A. Rucavado, Snake venom metalloproteinases: their role in the pathogenesis of local tissue damage, *Biochimie* 82 (2000) 841-845.
- [12] J.M. Gutiérrez, M. Romero, J. Núñez, F. Chavez, G. Borkow, M. Ovadia, Skeletal muscle necrosis and regeneration after injection of BaH1, a hemorrhagic metalloproteinase isolated from the venom of the snake *Bothrops asper* (terciopelo), *Exp. Mol. Pathol.* 62 (1995) 28-41.
- [13] P.B. Clissa, G.D. Laing, R.D.G. Theakston, I. Mota, M.J. Taylor, A.M. Moura-da-Silva, The effect of jararhagin, a metalloproteinase from *Bothrops jararaca* venom, on pro-inflammatory cytokines released by murine peritoneal adherent cells. *Toxicon* 39 (2001) 1567-1573.
- [14] E.P Costa, P.B. Clissa, C.F.P. Teixeira, A.M. Moura-da-Silva, Importance of metalloproteinase and macrophages in viper snake envenomation-induced local inflammation, *Inflammation* 26 (2002) 13-17.

-
- [15] L.G. Jia, K. Shimokawa, J.B. Bjarnason, J.W. Fox, Snake venom metalloproteinases: structure, function and relationship to the ADAMs family of proteins *Toxicon* 34 (1996) 1269-1276.
- [16] L. Thomas, B. Tyburn, B. Bucher, F. Pecout, J. Ketterle, D. Rieux, D. Smadja, D. Garnier, Y. Plumelle, Prevention of thromboses in human patients with *Bothrops lanceolatus* envenoming in Martinique: failure of anticoagulants and efficacy of a monospecific antivenom, *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 52 (1995) 419-426.
- [17] L. Thomas, B. Tyburn, J. Ketterle, T. Biao, H. Mehdaoui, V. Moravie, C. Rouvel C., Y. Plumelle, B. Bucher, D. Canonee, C.A. Marie-Nelly, J. Lang, Prognostic significance of clinical grading of patients envenomed by *Bothrops lanceolatus* in Martinique, *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 92 (1998) 542-545.
- [18] B. Bucher, D. Canonge, L. Thomas, B. Tyburn, A. Robbe-Vicent, V. Choumet, C. Bon, J. Ketterlé, J. Lang, Clinical indicators of envenoming and serum levels of venom antigens in patients bitten by *Bothrops lanceolatus* in Martinique, *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 91 (1997) 186-190.
- [19] A. Lôbo de Araújo, A.O. Souza, M.A. Cruz-Höfling, C.A. Flores, C. Bon, *Bothrops lanceolatus* (Fer de lance) venom induces oedema formation and increases vascular permeability in the mouse hind paw, *Toxicon* 38 (2000) 209-221.
- [20] A.Q. Guimarães, M.A. Cruz-Höfling, P.M. Ferreira de Araújo, C. Bon, A. Lôbo de Araújo, Pharmacological and histopathological characterization of *Bothrops lanceolatus* (Fer de lance) venom-induced edema. *Inflamm. Res.*, in press.

-
- [21] L. de Faria, E. Antunes, C. Bon, A. Lôbo de Araújo, Pharmacological characterization of the paw edema induced by *Bothrops lanceolatus* (Fer de lance) venom, *Toxicon* 39 (2001) 825-830.
- [22] V.A. Arruda, A.Q. Guimarães, S. Hyslop, P.M. Ferreira de Araújo, C. Bon, A. Lôbo de Araújo, *Bothrops lanceolatus* (Fer de lance) venom stimulates leukocyte migration into the peritoneal cavity of mice, *Toxicon* 41 (2003) 99-107.
- [23] A. Lôbo de Araújo, A. Kamiguti, C. Bon, Coagulant and anticoagulant activities of *Bothrops lanceolatus* (Fer de lance) venom, *Toxicon* 39 (2001) 371-375.
- [24] A. Lôbo de Araújo, J.L. Donato, R.A. Moreno, J. Prado-Franceschi, Comparison of the phospholipase A₂, blood-clotting, caseinolytic and hemorrhagic activities of some *Bothrops* snake venoms. *Toxicon* 28 (1990) 601.
- [25] A. Lôbo de Araújo, F. Radvanyi, C. Bon, Purification of an acidic phospholipase A₂ from *Bothrops lanceolatus* (Fer de lance) venom: molecular and enzymatic properties, *Toxicon* 32 (1994) 1069-1081.
- [26] A. Lôbo de Araújo, J.L. Donato, C. Bon, Purification from *Bothrops lanceolatus* (Fer de lance) venom of a fibrino(geno)lytic enzyme with esterolytic activity, *Toxicon* 36 (1998) 745-758.
- [27] D.F. Cardoso, I.K. Yamaguchi, A.M. Moura da Silva, Produção de soros antitoxinas e perspectivas de modernização por técnicas de biologia molecular, in: J.L.C. Cardoso, F.O.S. França, F.H. Wen, C.M.S. Malaque, V. Haddad Jr (Eds.), *Animais Peçonhentos no Brasil: Biologia, Clínica e Terapêutica dos Acidentes*, Sarvier, São Paulo, 2003, pp. 367-379.

- [28] O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A.L. Farr, R.J. Randall, Protein measurement with the Folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.* 193 (1951) 265-275.
- [29] U.K. Laemmli, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄, *Nature* 227 (1970) 680-685.
- [30] T.C. Bog-Hansen, Immunoelectrophoresis, in: B.D. Hames, D. Rickwood (Eds.), *Gel Electrophoresis of Proteins - a Practical Approach*, 2nd edn, IRL Press, Oxford, 1990, pp. 273-300.
- [31] H. Towbin, T. Staehelin, J. Gordon, Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76 (1979) 4350-4354.
- [32] R.D.G. Theakston, H.A. Reid, Development of simple standard assay procedures for the characterization of snake venoms, *Bull. WHO* 61 (1983) 949-956.
- [33] G.R. Delpierre, Studies on African snake venoms – I. The proteolytic activities of some African viperidae venoms, *Toxicon* 5 (1968) 233-238.
- [34] M. Martinez, E.D. Rael, N.L. Maddux, Isolation of a hemorrhagic toxin from Mojave rattlesnake (*Crotalus scutulatus*) venom, *Toxicon* 28 (1990) 685-694.
- [35] O. Molina, R.K. Seriel, M. Martinez, M.I. Sierra, A. Varela-Ramirez, E.D. Rael, Isolation of two hemorrhagic toxins from *Crotalus basiliscus basiliscus* (Mexican west coast rattlesnake) venom and their effect on blood clotting and complement, *Int. J. Biochem.* 22 (1990) 253-261.
- [36] D.M. Shotton, Elastase. *Meth. Enzymol.* 19 (1970) 113-117.

-
- [37] C.C. Viljoen, C.M. Meehan, D.P. Botes, Separation of *Bitis gabonica* (gaboon adder) venom arginine esterases into kinin-releasing, clotting and fibrinolytic factors, *Toxicon* 17 (1979) 145-154.
- [38] D.G. Beghini, M.H. Toyama, S. Hyslop, L. Sodek, J.C. Novello, S. Marangoni, Enzymatic characterization of a novel phospholipase A₂ from *Crotalus durissus cascavella* rattlesnake (maracambóia) venom, *J. Protein Chem.* 19 (2000) 603-607.
- [39] E.N. Baramova, J.D. Shannon, J.B. Bjarnason, J.W. Fox, Degradation of extracellular matrix proteins by hemorrhagic metalloproteinases, *Arch. Biochem. Biophys.* 275 (1989) 63-71.
- [40] E.N. Baramova, J.D. Shannon, J.B. Bjarnason, S.L. Gonias, J.W. Fox, Interaction of hemorrhagic metalloproteinase with human α_2 -macroglobulin, *Biochemistry* 29 (1990) 1069-1074.
- [41] G. Borkow, J.M. Gutiérrez, M. Ovadia, Isolation and characterization of synergistic hemorrhagins from the venom of the snake *Bothrops asper*, *Toxicon* 31 (1993) 1137-1150.
- [42] J.M. Gutiérrez, M. Romero, C. Diaz, G. Borkow, M. Ovadia, Isolation and characterization of a metalloproteinase with weak hemorrhagic activity from the venom of the snake *Bothrops asper* (terciopelo), *Toxicon* 33 (1995) 19-29.
- [43] A. Franceschi, A. Rucavado, N. Mora, J.M. Gutiérrez, Purification and characterization of BaH4, a hemorrhagic metalloproteinase from the venom of the snake *Bothrops asper*, *Toxicon* 38 (2000) 63-77.

-
- [44] J.H. Petretski, M.M. Kanashiro, F.R. Rodrigues, E.W. Alves, O.L.T. Machado, T.L. Kipnis, Edema induction by the disintegrin-like/cysteine-rich domains from a *Bothrops atrox* hemorrhagin, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 276 (2000) 29-34.
- [45] F.R. Mandelbaum, A.P. Reichel, M.T. Assakura, Isolation and characterization of a proteolytic enzyme from the venom the snake *Bothrops jararaca* (jararaca), *Toxicon* 20 (1982) 955-972.
- [46] M.T. Assakura, A.P. Reichl, F.R. Mandelbaum, Comparison of immunological, biochemical and biophysical properties of three hemorrhagic factors isolated from the venom of *Bothrops jararaca*, *Toxicon* 24 (1986) 943-946.
- [47] M. Maruyama, M. Tanigawa, M. Sugiki, E. Yoshida, H. Mihara, Purification and characterization of low molecular weight fibrinolytic/hemorrhagic enzymes from snake (*Bothrops jararaca*) venom, *Enzyme Protein* 47 (1993) 24-35.
- [48] M.T. Assakura, A.P. Reichl, C.A. Asperti, F.R. Mandelbaum, Isolation of the major proteolytic enzyme from the snake *Bothrops moojeni*, *Toxicon* 23, (1985) 691-706.
- [49] F.R. Mandelbaum, M.T. Assakura, A.P. Reichl, Characterization of two hemorrhagic factors isolated from the venom of *Bothrops neuwiedi* (jararaca pintada), *Toxicon* 22 (1984) 193-206.
- [50] E.F. Sanchez, A. Magalhães, F.R. Mandelbaum, C.R. Diniz, Purification and characterization of the hemorrhagic factor II from the venom of the bushmaster snake (*Lachesis muta muta*), *Biochim. Biophys. Acta* 6 (1991) 347-356.

-
- [51] I. Aguilar, M.E. Giron, A. Rodriguez-Acosta, Purification and characterization of a hemorrhagic fraction from the venom of the Uracoan rattlesnake *Crotalus vegrandis*, *Biochim. Biophys. Acta.* 1548 (2001) 57-65.
- [52] A. Leonardi, F. Gubensek, I. Krizaj, Purification and characterization of two hemorrhagic metalloproteinases from the venom of the long-nosed viper, *Vipera ammodytes ammodytes*, *Toxicon* 40 (2001) 55-92.
- [53] J.B. Bjarnason, A.T. Tu, Hemorrhagic toxins from western diamondback rattlesnake (*Crotalus atrox*) venom: isolation and characterization of five toxins and the role of zinc in hemorrhagic toxin, *Biochemistry* 17 (1978) 3395-3404.
- [54] J.B. Bjarnason, J.W. Fox, Hemorrhagic toxins from snake venoms, *J. Toxicol. - Toxin Rev.* 7 (1988-89) 121-209.
- [55] G. Bogarín, M. Romero, G. Rojas, C. Lutsch, M. Casadamont, J. Lang, R. Otero, J.M. Gutiérrez, Neutralization, by a monospecific *Bothrops lanceolatus* antivenom, of toxic activities induced by homologous and heterologous *Bothrops* snake venoms, *Toxicon* 37 (1999) 551-557.
- [56] C.L. Ownby, T.R. Colberg, Presence of heat-stable hemorrhagic toxins in snake venoms, *Toxicon* 32 (1994) 945-954.
- [57] O. Khow, L. Chanhome, T. Omori-Satoh, S. Puempunpanich, V. Sitprija, A hemorrhagin as a metalloprotease in the venom of *Trimeresurus purpureomaculatus*: purification and characterization, *Toxicon* 40 (2002) 455-461.

- [58] M. Maruyama, M. Sugiki, E. Yoshida, K. Shimaya, H. Mihara, Broad substrate specificity of snake venom fibrinolytic enzymes: possible role in haemorrhage, *Toxicon* 30 (1992) 1387-1397.

FIGURE LEGENDS

Fig. 1. Purification of BlaH1 from *B. lanceolatus* venom. **(A)** Fractionation of *B. lanceolatus* venom by gel filtration on Sephadex G-100. Venom (200 mg) was dissolved in 5 ml of 0.05 M Tris-HCl, pH 7.5, centrifuged and the supernatant applied to the column (1.2 cm x 75 cm) equilibrated with this same buffer. The proteins were eluted with Tris-HCl buffer at a flow rate of 5 ml/h and the elution profile was monitored at 280 nm. Fractions of 1.5 ml were collected and assayed for hemorrhagic and proteolytic activities. The fractions corresponding to peak 1 (P1) showed hemorrhagic and caseinolytic activities and were pooled for further purification. **(B)** Fractionation of P1 by affinity chromatography on chelating Sepharose. Peak 1 was dialyzed against distilled water and applied to a column of chelating Sepharose charged with 0.1 M ZnSO₄ and equilibrated with 0.05 M phosphate buffer, pH 7.5. The column was washed with the same buffer to remove unbound material and a linear gradient (0-1.0 M) of NaCl in buffer was then applied. The active fractions corresponding to peak 1a (P1a) were pooled for the next chromatographic step. Fractions with hemorrhagic activity are indicated by a bar above the corresponding peak. **(C)** Hydrophobic interaction chromatography of P1a on phenyl-Sepharose (high performance). Peak 1a from affinity chromatography was mixed with 1 M (NH₄)SO₄ and applied to a phenyl-Sepharose column equilibrated with 0.05 M phosphate buffer, pH 7.0, containing 1 M (NH₄)SO₄. The column was washed with this same buffer to remove unbound material and the retained proteins were then eluted with a decreasing linear gradient (1.0-0.0 M) of (NH₄)SO₄ in phosphate buffer. Peaks 1 and 4 showed

proteolytic and hemorrhagic activities, but only peak 1 (BlaH1) gave a single band on SDS-PAGE. Fractions with hemorrhagic activity are indicated by a bar above the corresponding peak.

Fig. 2. (A) SDS-PAGE of venom and BlaH1. Venom (V, 50 μ g), BlaH1 (10 μ g) and molecular mass markers (M) were run on a 12% gel at 100 V and then silver stained. **(B)** Estimation of the molecular mass of BlaH1 following SDS-PAGE. The protein markers were (in kDa): phosphorylase b (Ph) 97, bovine serum albumin (BSA) 66, ovalbumin (Ov) 45, carbonic anhydrase (CA) 30, trypsin inhibitor (TI) 20.1, and α -lactalbumin (La) 14.4. BlaH1 had a molecular mass of 28 kDa.

Fig. 3. (A) Immunoblot of BlaH1 (3 μ g) and *B. lanceolatus* venom (V, 10 μ g) using commercial bothropic antivenom. A single immunoreactive band of ~28 kDa was observed. **(B)** Immunodiffusion of *B. lanceolatus* venom (a, 10 μ g) and BlaH1 (b, 5 μ g) with commercial bothropic antivenom (c). **(C)** Immunoelectrophoresis of *B. lanceolatus* venom (a, 10 μ g) and BlaH1 (b, 5 μ g). The assays were done as described in Methods.

Fig. 4. ELISA immunoreactivity of BlaH1 with commercial bothropic antivenom. Wells of microtiter plates were coated with bothropic antivenom followed by incubation with venom or BlaH1 and then with an affinity-purified anti-bothropic IgG-peroxidase conjugate. After incubation with substrate, the reaction was stopped with H₂SO₄ and the absorbance at 492 nm was read.

Fig. 5. pH-dependence of the proteolytic activity of BlaH1. The caseinolytic activity of the BlaH1 was determined over the pH range of 5-10 using the standard proteolytic assay. The points are the mean $\pm$ S.E.M. of three determinations.

Fig. 6. Temperature stability of the proteolytic (A) and hemorrhagic (B) activities of BlaH1. Aliquots of BlaH1 were incubated for 30 min at 30, 40, 50, 60 and 70°C followed by determination of the residual proteolytic and hemorrhagic activities. The points are the mean $\pm$ S.E.M. of three determinations.

Fig. 7. Fibrinogen degradation by BlaH1. BlaH1 (20 μ g) and bovine fibrinogen (5 mg/ml) were co-incubated for up to 120 min at 37°C. Aliquots (40 μ l) of the mixture were removed after 1, 5, 10, 15, 30, 60 and 120 min of incubation and added to 60 μ l of a denaturing solution (10 M urea, 4% SDS and 4% β -mercaptoethanol). After incubation for 24 h at 37°C, the degradation of fibrinogen was analyzed by SDS-PAGE. Lane 0: fibrinogen without enzyme. The other lanes correspond to fobrinogen incubated with BlaH1 for various times.

Fig. 8. Neutralization of the hemorrhagic activity of BlaH1 by commercial bothropic antivenom. BlaH1 was pre-incubated with antivenom for 30 min at 37°C followed by determination of the residual activity. The columns are the mean $\pm$ S.E.M. of quadruplicate determinations from two independent experiments.

Table 1: Stroka, A. et al. Purification and characterization of a hemorrhagic metalloproteinase from *Bothrops lanceolatus* (Fer de Lance) snake venom

Table 1. Enzymatic activity of *B. lanceolatus* venom and BlaH1 on several substrates.

Enzyme	Activity	
	Venom	BlaH1
Protease (caseinolytic) (units/mg)	17.4	70.5
Collagenase ($A_{600\text{ nm}}$ /mg)	0.213	5.31
Elastase ($A_{495\text{ nm}}$ /mg)	0.105	0.300
Esterase (units/mg)	15.0	4.8
Phospholipase A_2 ($A_{425\text{ nm}}$ /mg)	0.37	0.0

The values are the means of triplicate determinations.

Table 2: Stroka, A. et al. Purification and characterization of a hemorrhagic metalloproteinase from *Bothrops lanceolatus* (Fer de Lance) snake venom

Table 2. Effects of enzyme inhibitors on the hemorrhagic and proteolytic activities of BlaH1.

Inhibitor	Concentration (mM)	Caseinolytic activity (%) [*]	Hemorrhagic activity (%) [*]
No inhibitor	—	100	100
EDTA	5	0	0
Aprotinin	5	100	100
Benzamidine	5	100	100
PMSF	5	100	100

^{*}Activity of BlaH1 incubated without inhibitor corresponded to 100%. The values are the means of three determinations.

FIGURE 1: Stroka, A. et al. Purification and characterization of a hemorrhagic metalloproteinase from *Bothrops lanceolatus* (Fer de Lance) snake venom

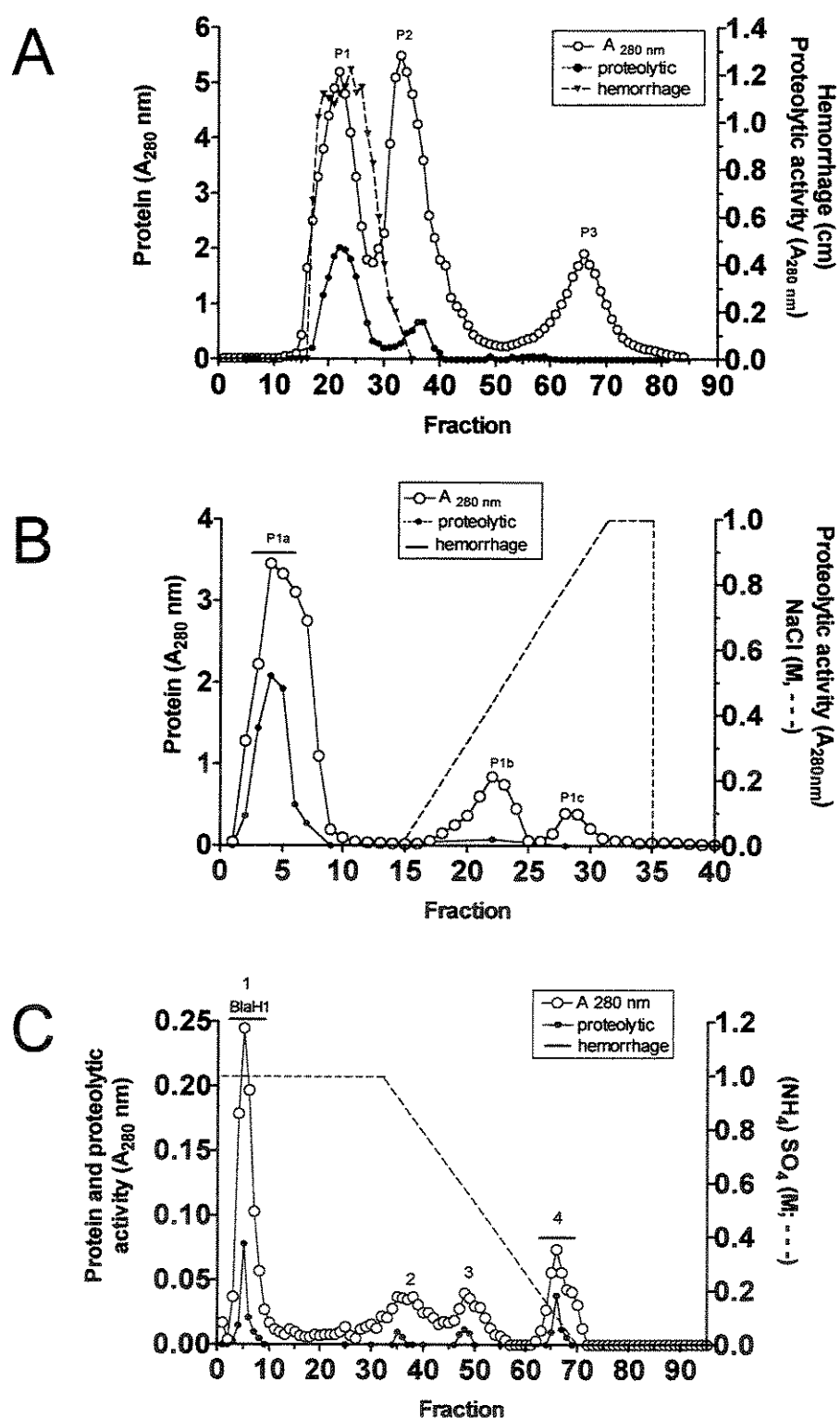


FIGURE 2: Stroka, A. et al. Purification and characterization of a hemorrhagic metalloproteinase from *Bothrops lanceolatus* (Fer de Lance) snake venom

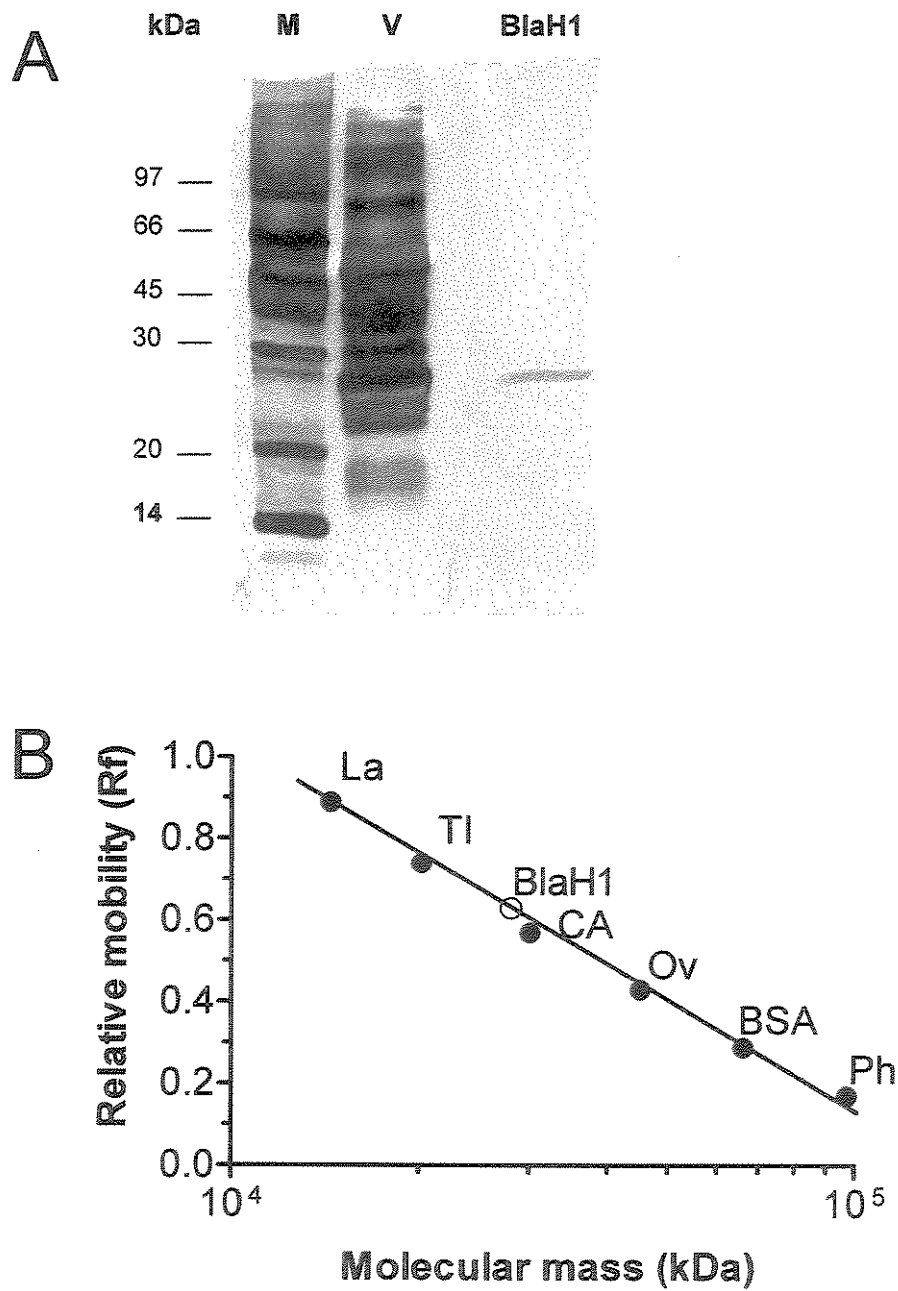


FIGURE 3: Stroka, A. et al. Purification and characterization of a hemorrhagic metalloproteinase from *Bothrops lanceolatus* (Fer de Lance) snake venom

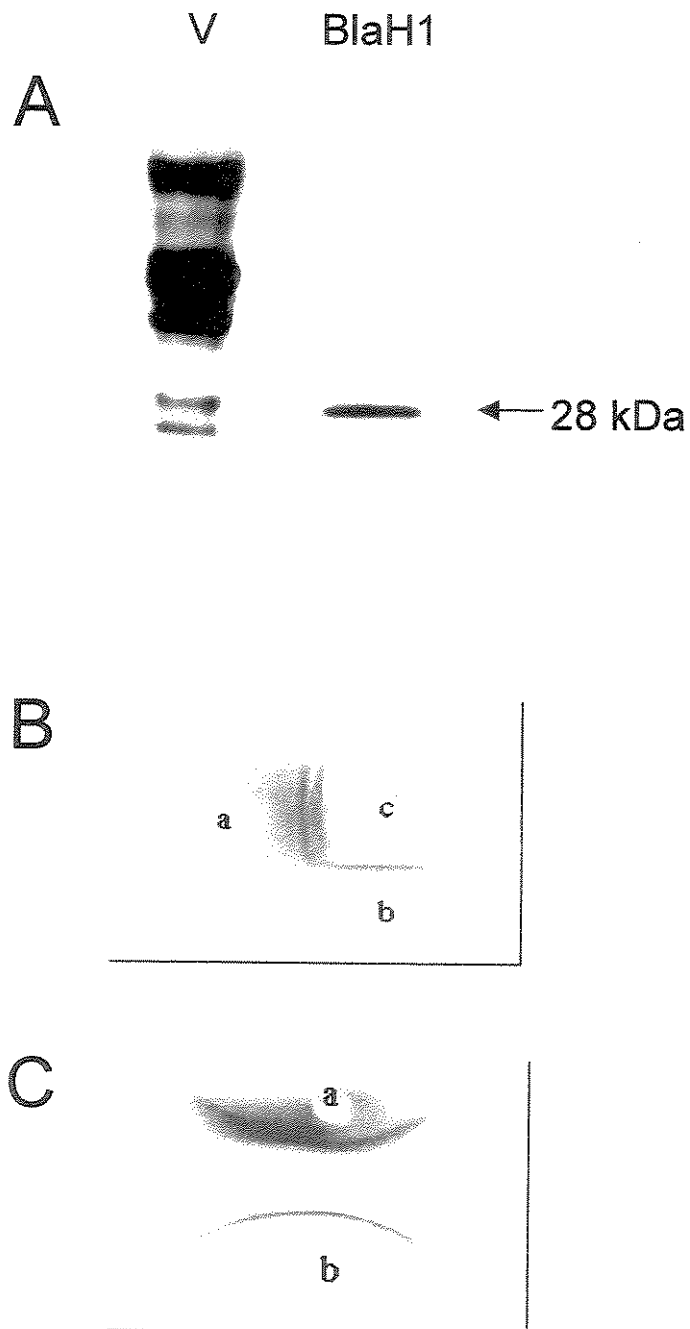


FIGURE 4: Stroka, A. et al. Purification and characterization of a hemorrhagic metalloproteinase from *Bothrops lanceolatus* (Fer de Lance) snake venom

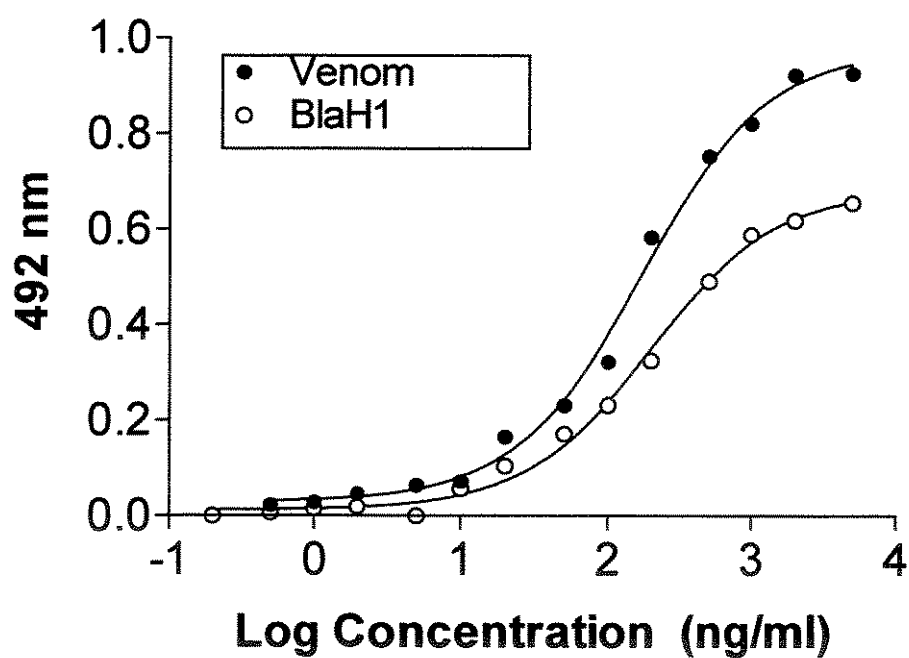


FIGURE 5: Stroka, A. et al. Purification and characterization of a hemorrhagic metalloproteinase from *Bothrops lanceolatus* (Fer de Lance) snake venom

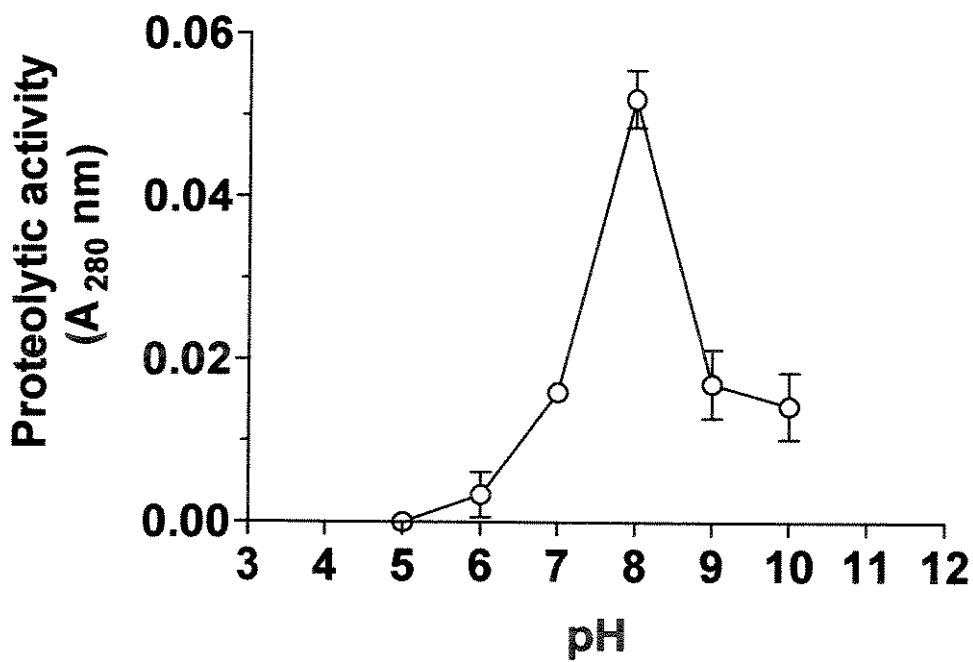


FIGURE 6: Stroka, A. et al. Purification and characterization of a hemorrhagic metalloproteinase from *Bothrops lanceolatus* (Fer de Lance) snake venom

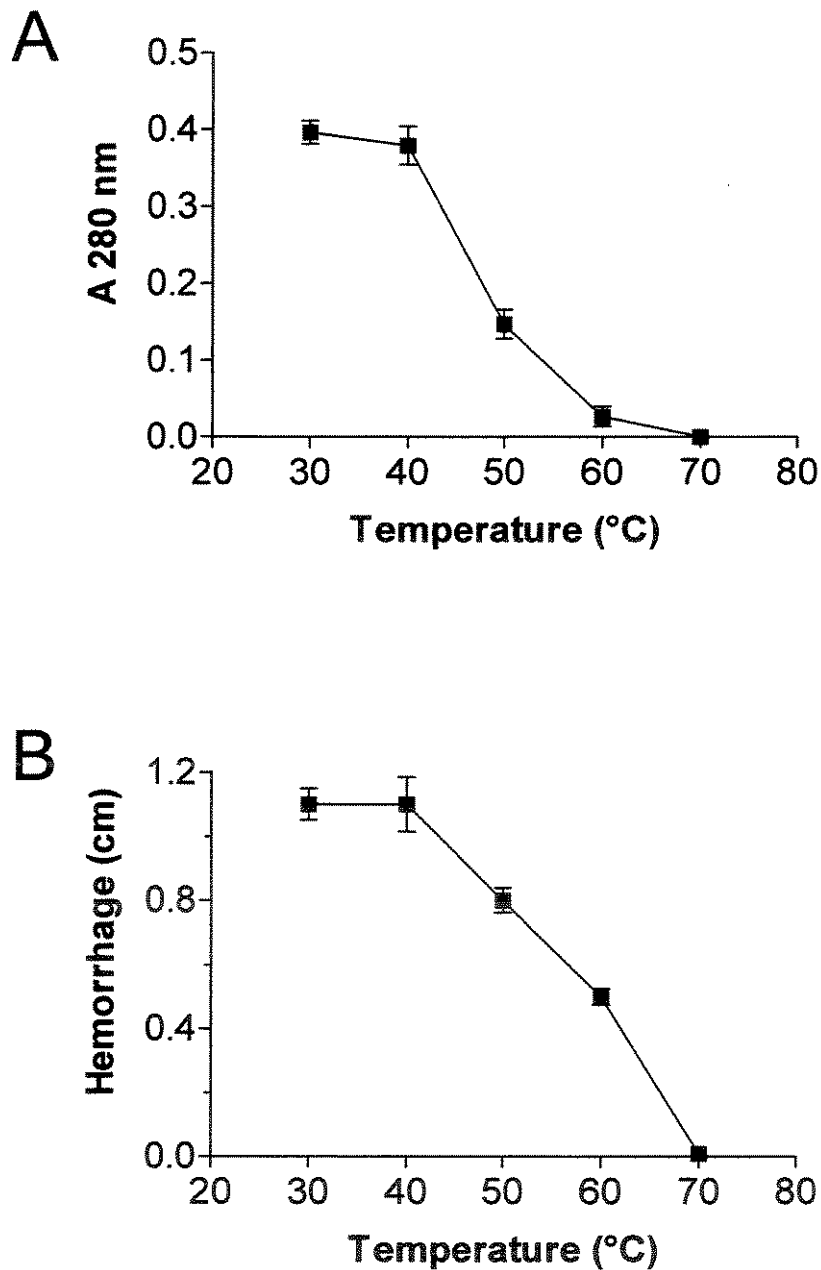


FIGURE 7: Stroka, A. et al. Purification and characterization of a hemorrhagic metalloproteinase from *Bothrops lanceolatus* (Fer de Lance) snake venom

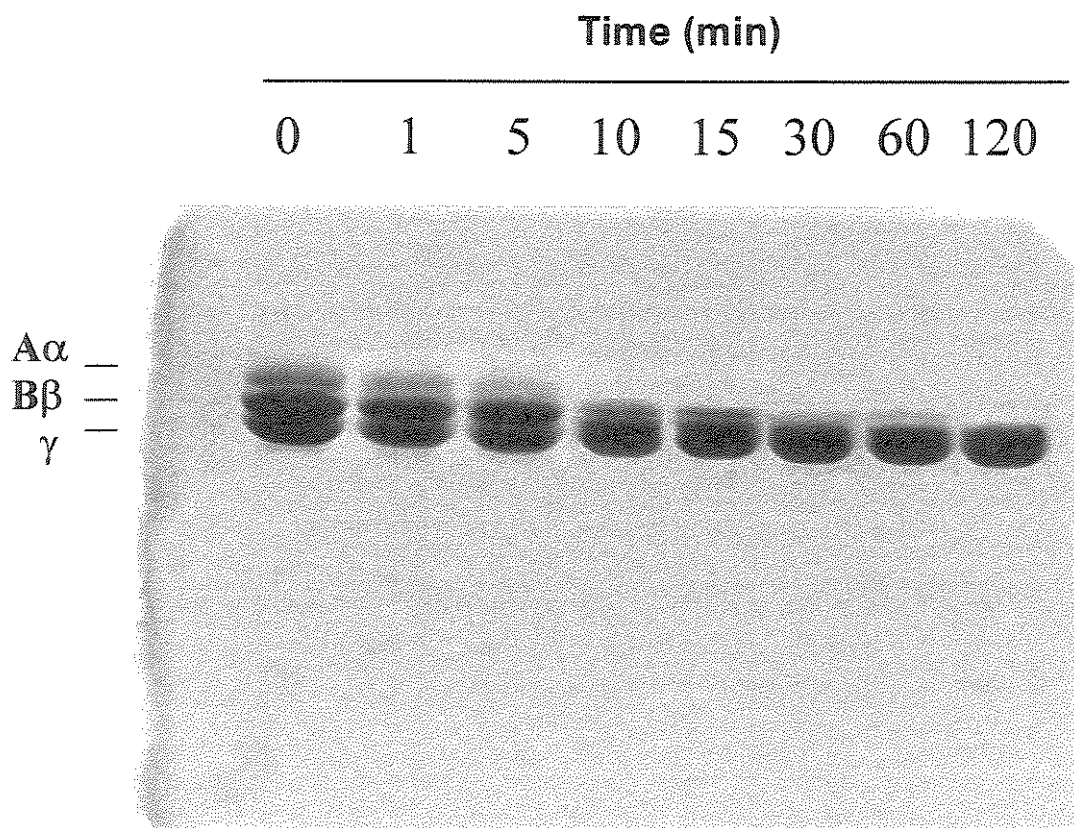
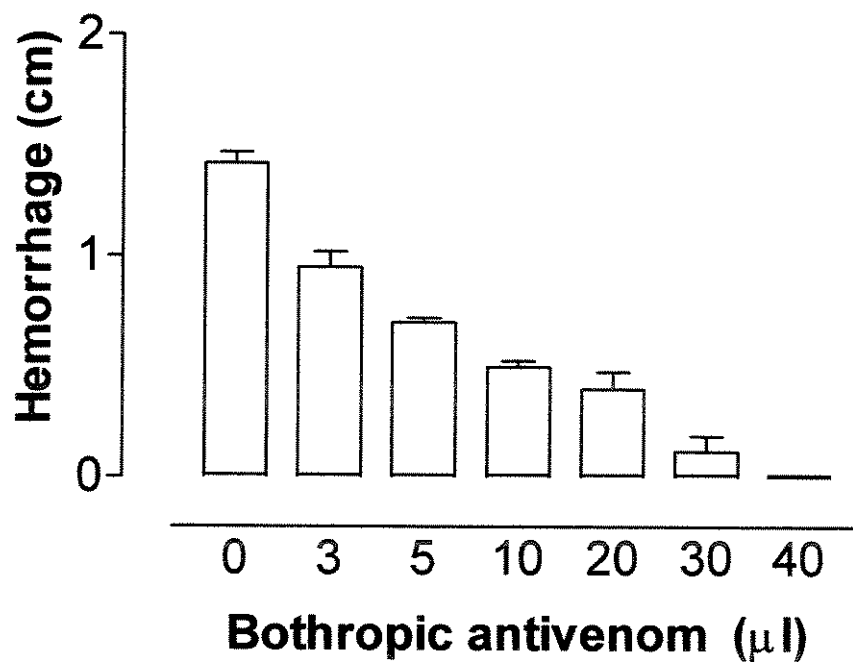


FIGURE 8: Stroka, A. et al. Purification and characterization of a hemorrhagic metalloproteinase from *Bothrops lanceolatus* (Fer de Lance) snake venom





4. DISCUSSÃO

4. DISCUSSÃO

Os venenos botrópicos são capazes de causarem intensos efeitos locais caracterizados por edema, necrose e hemorragia (ROSENFELD, 1971; OWNBY, 1984; GUTIÉRREZ e LOMONTE, 1989, BJARNASON e FOX, 1994, GUTIÉRREZ e RUCAVADO, 2000). Tanto a hemorragia local como a sistêmica são conseqüências comuns e graves em envenenamentos por serpentes das subfamílias Crotalinae e Viperinae (WARRELL, 1995; GUTIÉRREZ, 1995).

Em geral os venenos ofídicos contêm grande número de enzimas; que hidrolizam diferentes substratos (TU, 1988) e algumas são responsáveis pela hemorragia em pacientes envenenados (MANDELBAUM, 1984; CIVELLO et al., 1983; BJARNASON e TU, 1978; OVADIA, 1978). Muitas delas já foram isoladas e caracterizadas como metaloproteinases que estão relacionadas a atividades biológicas específicas como a atividade hemorrágica (BJARNASON e TU, 1978; OVADIA, 1978; CIVELO et al., 1983; MANDELBAUM et al., 1984). A tabela 1 a seguir descreve algumas dessas metaloproteinases com suas respectivas massas moleculares.

Tabela 1: Metaloproteínas hemorrágicas isoladas de venenos ofídicos

VENENO	METALOPROTEÍNASE	MASSA	REFERÊNCIA
		MOLECULAR	
<i>B. asper</i>	BH2	26	Borkow et al., 1993
	BH3	55	Borkow et al., 1993
	BaH1	64	Borkow et al., 1993
	BaP1	24	Gutiérrez et al., 1995
	BaH4	69	Franceschi et al., 2000
<i>B. jararaca</i>			
	Botropasina	48	Mandelbaum et al., 1982 Queiroz et al., 1985
	HF-1	nd	Assakura et al., 1986
	HF-2	50	Assakura et al., 1986
	HF-3	62	Assakura et al., 1986
	Jararafibrase I	47	Maruyama et al., 1992
	Jararafibrase II	22,5	Maruyama et al., 1992
	Jararafibrase III	20,4	Maruyama et al., 1993
	Jararafibrase IV	21,2	Maruyama et al., 1993
<i>B. moojeni</i>			
	Protease A	22,5	Assakura et al., 1985
<i>B. neuwiedi</i>			
	NHFa	46	Mandelbaum et al., 1984
	NHFb	58	Mandelbaum et al., 1984
<i>B. atrox</i>			
		50	Petretski et al., 2000

Tabela 1 – (continuação): Metaloproteinases hemorrágicas isoladas de venenos ofídicos

VENENO	METALOPROTEINASE	MASSA MOLECULAR	REFERÊNCIA
<i>L. m. muta</i>			
	Mutalisina I	23,5	Sanchez et al., 1987
	Mutalisina II	100	Sanchez et al., 1991
<i>T. purpureoma - culatus</i>			
		72	Khow et al., 2002
<i>T. flavoviridis</i>			
	LMHT	16,5	Nikai et al., 2002
<i>V. ammodytes ammodytes</i>			
	VaH1	70	Leonerdi et al., 2001
	VaH2	70	Leonerdi et al., 2001
	HT-1	60	Bjarnason e Fox, 1995
	HT-2	60	Bjarnason e Fox, 1995
	HT-3	60	Bjarnason e Fox, 1995
<i>C. vegrandis</i>			
	Uracoína-1	58	Aguilar et al., 2001

O veneno de *B. lanceolatus* quando comparado com outros venenos botrópicos apresentou atividades casinolítica, fosfolipásica, esterolítica e hemorrágica (LÔBO DE ARAÚJO et al., 1990). Proteínas hemorrágicas com atividade proteolítica vêm sendo isoladas de alguns venenos como o de *B. asper* (GUTIÉRREZ et al., 1995; FRANCESCHI et al., 2000), *B. neuwiedi* (MANDELBAUM et al., 1984), *Crotalus vegrandis* (AGUILAR et al., 2001), *Vipera ammodytes* (LEONARDI et al., 2001). No presente trabalho, uma proteína hemorrágica (BlaH1), foi purificada do veneno de *B. lanceolatus* através da combinação de cromatografias de gel filtração, afinidade e interação hidrofóbica.

A hemorragina (BlaH1) isolada do veneno *B. lanceolatus* quando analisada por eletroforese em SDS-PAGE revelou uma massa molecular estimada em 28kDa, assemelhando-se a proteínas hemorrágicas BH2 (26 kDa) e BaP1 (24 kDa) isoladas do veneno de *B. asper* Borkow et al., 1993 e Gutiérrez et al., 1995, respectivamente.

Ainda a BlaH1, quando analisada sobre colágeno e caseína mostrou-se bastante ativa. Como sabemos as atividades colagenásica e caseinolítica além de detectadas em pacientes envenenados são as responsáveis pela lesão das paredes dos vasos sangüíneos com conseqüente hemorragia (OHSAKA et al., 1973). Também a BlaH1 isolada da *B. lanceolatus* apresentou atividade fibrinogenolítica, degradando as cadeias A α e B β do fibrinogênio. Resultado semelhante foi obtido por Gutiérrez et al. (1995) com a metaloproteinase BaP1 isolada do veneno de *B. asper* e por Lôbo de Araújo et al. (1998) com a enzima

fibrinogenolítica (F-II-1a) purificada da *B. lanceolatus*. No entanto a F-II-1a possui alta atividade esterásica, diferindo da BlaH1 que praticamente é desprovida desta atividade.

A atividade caseinolítica da BlaH1 foi máxima em pH alcalino. O efeito da temperatura sobre as atividades caseinolítica e hemorrágica da BlaH1, mostrou que ambas são termolábeis, e são completamente abolidas a 70°C. Fato também demonstrado para metaloproteinases hemorrágicas do veneno de *B. asper* (GUTIÉRREZ et al., 1995) e de *Crotalus vegrandis* (AGUILAR et al., 2001). Ainda a atividade hemorrágica da hemorragina de *B. lanceolatus* (BlaH1) é mais resistente a ação da temperatura quando comparada a atividade caseinolítica.

Estudos com metaloproteinases indicam que estas enzimas produzem hemorragia relacionada com a atividade proteolítica sobre componentes da membrana basal (OHSAKA et al., 1973; BJARNASON e TU, 1978), sugerindo uma correlação entre a atividade proteolítica e potência hemorrágica (BJARNASON e FOX, 1989). No entanto, ensaios realizados com metaloproteinases quer seja *in vitro* ou *in vivo* mostram que o ataque proteolítico sobre a matriz extracelular é lento, enquanto que o efeito hemorrágico ocorre dentro de minutos indicando a complexidade do mecanismo de ação destas enzimas (OWNBY, 1990). Ao longo do processo de purificação da hemorragina do veneno de *B. lanceolatus*, a atividade hemorrágica foi sempre acompanhada da caseinolítica, sugerindo que a atividade proteolítica pode contribuir ou mesmo potencializar o efeito hemorrágico. Como mencionado acima, os mecanismos envolvidos no desenvolvimento da hemorragia são complexos.

A pureza e a imunogenicidade da BlaH1 foi confirmada pelo ensaio de imunoblotting, o qual revelou uma única banda imunorreativa com massa molecular equivalente à proteína nativa. Outros ensaios imunológicos como ELISA, imunodifusão e imunoeleroforese também demonstraram que o soro antibotrópico foi capaz de reconhecer a hemorragina (BlaH1) isolada de *B. lanceolatus*. Ainda, o soro antibotrópico neutralizou a atividade hemorrágica induzida pela BlaH1, quando esta foi injetada intradermicamente na pele de ratos, indicando que esta atividade pode ser neutralizada in vivo. As características imunológicas de metaloproteinases isoladas do veneno de *B. asper* também foram demonstradas por Franceschi et al. (2000) e Borkow et al. (1993).

As atividades caseinolítica e hemorrágica da BlaH1 isolada do veneno de *B. lanceolatus* foram inibidas quando tratadas com o agente quelante EDTA, indicando a dependência de íons metálicos para o desenvolvimento destas atividades. Efeito semelhante foi obtido pelo tratamento do veneno de *B. lanceolatus* com EDTA, o qual resultou em redução das atividades edematogênica e hemorrágica deste veneno (GUIMARÃES et al., 2004). Como já demonstrado as metaloproteinases apresentam íons metálicos firmemente ligados, os quais são essências para o pleno desenvolvimento das atividades proteolíticas e hemorrágicas. (BJARNASON E FOX,1994; BORKOW et al., 1993; FRANCESCHI et al., 2000; AGUILAR et al., 2001; GUTIÉRREZ et al., 1995).

Em conclusão, uma metaloproteinase com atividade hemorrágica e caseinolítica foi purificada e caracterizada do veneno de *Bothrops lanceolatus*. As propriedades da hemorragina purificada do veneno desta espécie foram semelhantes a outras hemorraginas de venenos ofídicos.



5.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUILAR I., GIRON M.E., RODRIGUEZ-ACOSTA A. Purification and Characterization of a hemorrhagic fraction from the venom of the Uracoan rattlesnake *Crotalus vegrandis*. **Biochim Biophys Acta**, 1548: 57-65, 2001.

ANDREWS R.K., BERNDT M.C. Snake venom modulators of platelet adhesion receptors and their ligands. **Toxicon**, 38: 775-779, 2000.

ARAÚJO F.A.A., SANTALÚCIA M., CABRAL R.F. Epidemiologia dos acidentes por animais peçonhentos. In: Cardoso, J.L.C., França, F.O.S., Wen, F.H., Malaque C.M.S., Haddad Jr, V., (Eds.), **Animais Peçonhentos no Brasil: Biologia, Clínica e Terapêutica dos Acidentes**, Sarvier, São Paulo, pp. 6-9, 2003.

ARRUDA V.A., GUIMARÃES A.Q., HYSLOP S., FERREIRA DE ARAÚJO P.M., BON C., LÔBO DE ARAÚJO A. *Bothrops lanceolatus* (Fer de lance) venom stimulates leukocyte migration into the peritoneal cavity of mice. **Toxicon**, 41: 99-107, 2003.

ASSAKURA M.T., REICHL A.P., ASPERTI C.A., MANDELBAUM F.R. Isolation of the major proteolytic enzyme from the snake *Bothrops moojeni*. **Toxicon**, 23: 691-706, 1985.

ASSAKURA M.T., REICHL A.P., MANDELBAUM F.R. Comparison of immunological, biochemical and biophysical properties of three hemorrhagic factors isolated from the venom of *Bothrops jararaca*. **Toxicon**, 24: 943-946, 1986.

BARAMOVA E.N., SHANNON J.D., BJARNASON J.B., FOX J.W. Degradation of extracellular matrix proteins by hemorrhagic metalloproteinases. **Arch Biochem Biophys**, 275: 63-71, 1989.

BARAMOVA E.N., SHANNON J.D., FOX J.W., BJARNASON J.B. Proteolytic digestion of non-collagenous basement membrane proteins by the hemorrhagic metalloproteinase Ht-e from *Crotalus atrox* venom. **Biomed Biochim Acta**, 50: 763-768, 1991.

BARRAVIERA B., PEREIRA P.C.M. Acidentes por Serpentes do Gênero *Bothrops*. In: **Venenos Animais**, ed EPUC, Rio de Janeiro, pp.261-280, 1994.

BJARNASON J.B., TU A.T. Hemorrhagic toxins from Western diamondback rattlesnake (*Crotalus atrox*) venom: isolation and characterization of five toxins and the role of zinc in hemorrhagic toxin. **Biochemistry**, 17: 3395-3404, 1978.

BJARNASON J.B., FOX J.W. Hemorrhagic toxins from snake venoms. **J Toxic-Toxin Rev**, 7: 121-209, 1988-89.

BJARNASON J.B., HAMILTON D., FOX J.W. Studies on the mechanism of hemorrhage production by five proteolytic toxins from *Crotalus atrox* venom. **Biol Chem Hoppe-Seyler**, 369: 121-129, 1988.

BJARNASON J.B., FOX J.W. Hemorrhagic toxins from snake venoms. **J Toxicol-Toxins Rev**, 7: 121-209, 1989.

BJARNASON J.B., FOX J.W. Hemorrhagic metalloproteinases from snake venoms. **Pharmacol Ther**, 62: 325-372, 1994.

BJARNASON J.B., FOX J.W. Snake venoms metalloendopeptidases: Reprolysins. In: Barret A. J. (Ed)_ **Methods in Enzymology – Proteolytic Enzymes**, New York: Academic Press, 345-368, 1995.

BIEBER A. Metal and nonprotein constituents in snake venom. In: *Snake Venoms. Handbook of Experimental Pharmacology*. Vol. 52 (LEE, C.Y., ed). pp. 295-306. Springer Verlag, Berlin, 1979.

BOLAÑOS R. Las serpientes venenosas de Centroamerica y el problema del ofidismo. Primeira parte. Aspectos zoologicos, epidemiologicos y biomédicos. **Rev Cost Cienc Med**, 3: 165 – 84, 1982.

BORKOW G., GUTIÉRREZ J.M., OVADIA M. Isolation and characterization of synergistic hemorrhagins from the venom of the snake *Bothrops asper*. **Toxicon**, 31: 1137-1150, 1993.

BRAZIL V. **La défense contre l'ophidisme**. 2^a ed., Pocai & Weiss: São Paulo, 1911.

BUCHER B., CANONGE D., THOMAS L., TYBURN B., ROBBE-VICENT A., CHOUMER V., BON C., KETTERLÉ J., LANG J. Clinical indicators of envenoming and serum levels of venom antigens in patients bitten by *Bothrops lanceolatus* in Martinique. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, 91: 186-190, 1997.

CALMETTE A. Contribution à l'étude du venim des serpents. Immunisation dès animaux et traitement de l'envenimation. **Ann Inst Pasteur**, 8: 275-291, 1894.

CAMPBELL J.A., LAMAR W.W. Lanceheads, Genus *Bothrops* Wagler. In: **The Venomous Reptiles of Latin America**. Eds Campbell J.A. e Lamar W.W. Ithaca: Comstock Publishing Associates, 180-226, 1989.

CHIAPPAUX J.P., GOYFFON M. Venoms, antivenoms and immunotherapy. **Toxicon**, 36: 823-846, 1998.

CIVELLO D.J., DUONG H.L., GEREN C.R. Isolation and characterization of a hemorrhagic proteinase from timber rattlesnake venom. **Biochemistry**, 22: 749-755, 1983.

CLISSA P.B., LAING G.D., THEAKSTON R.D.G., MOTA I., TAYLOR M.J., MOURA-DA-SILVA A.M. The effect of jararhagin, a metalloproteinase from the *Bothrops jararaca* venom, on pro-inflammatory cytokines released by murine peritoneal adherent cells. **Toxicon**, 39: 1567-1573, 2001.

COSTA E.P., CLISSA P.B., TEIXEIRA C.F.P., MOURA-DA-SILVA A.M. Importance of metalloproteinase and macrophages in viper snake envenomation-induced local inflammation. **Inflammation**, 26: 13-17, 2002.

FARIA L. DE, ANTUNES E., BON C., LÔBO DE ARAÚJO, A. Pharmacological characterization of the paw edema induced by *Bothrops lanceolatus* (Fer de Lance) venom. **Toxicon**, 39: 825-830, 2001.

FERREIRA S.H., ROCHA E SILVA M. Potention of bradykinin and eledoisin by BPF (bradykinin potentaiting factor) from *Bothrops jararaca* venom. **Experientia**, 21: 347-349, 1965.

FRANCESCHI A., RUCAVADO A., MORA N., GUTIÉRREZ J.M. Purification and characterization of BaH4, a hemorrhagic metalloproteinase from the venom of the snake *Bothrops asper*. **Toxicon**, 38: 63-77, 2000.

GROTTO L., MOROZ C., VRIES A., GOLDBLUM N. Isolation of *Vipera palestinae* hemorrhagin and distinction between its hemorrhagic and proteolytic activities. **Biochim Biophys Acta**, 133: 356, 1967.

GUIMARÃES A.Q. CRUZ-HÖFLING M.A., ARAÚJO P.M.F. BON C., LÔBO DE ARAÚJO A. Pharmacological and histopathological characterization of *Bothrops lanceolatus* (Fer de Lance) venom-induced edema. **Inflammation** [in press].

GUTIÉRREZ J.M., LOMONTE B. Local tissue damage induced by *Bothrops* snake venoms. **Mem Inst Butantan**, 51: 211-223, 1989.

GUTIÉRREZ J.M., CHAVES F., BOLÃNOS R., CERDAS L., ROJAS G., ARROYO O., PORTILLA. Neutralization de los efectos locales Del veneno de *Bothrops asper* por um antiveneno polivalente. **Toxicon**, 19: 439-500, 1981.

GUTIÉRREZ J.M., OWNBY C.L., ODELL G.V. Isolation of a myotoxin from *Bothrops asper* venom; partial characterization and action on skeletal muscle. **Toxicon**, 22: 115-128, 1984.

GUTIÉRREZ J.M., GENÉ J.A., ROJAS G., CERDAS L. Neutralization of proteolytic and hemorrhagic activities of Costa Rican snake venoms by a polyvalent antivenom. **Toxicon**, 23: 887-893, 1985.

GUTIÉRREZ J.M., ROJAS G., CERDAS L. Ability of a polyvalent antivenom to neutralize the venom of *Lachesis muta melanocephala*, a new Costa Rican subspecies of the bushmaster. **Toxicon**, 25: 713-720, 1987.

GUTIÉRREZ J.M., ROMERO M., DIAZ 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**, 33: 19-29, 1995a.

GUTIÉRREZ J.M., ROMERO M., NÚÑEZ J., CHAVEZ F., BORKOW G., OVADIA M. Skeletal muscle necrosis and regeneration after injection of BaH1, a hemorrhagic metalloproteinase isolated from the venom of the snake *Bothrops asper* (Terciopelo). **Exp Mol Pathol**, 62: 28-41, 1995b.

GUTIÉRREZ J.M., RUCAVADO A. Snake venom metalloproteinases: their role in the pathogenesis of local tissue damage. **Biochimie**, 82: 841-845, 2000

HATI R., MITRA P., SARKER S., BHATTACHARYYA K.K. Snake venom hemorrhagins. **Crit Rev Toxicol**, 29: 1-19, 1999.

HITE L. A., JIA L.G., BJARNASON J.B., FOX J.W. cDNA sequences for four snake venom metalloproteinases: structure, classification, and their relationship to mammalian reproductive proteins. **Arch Biochem Biophys**, 308: 182-191, 1994.

HOGUE A.R., ROMANO HOGUE S.A.W.L. Sinopse das serpentes peçonhentas do Brasil. Serpentes, Elapidae e Viperidae. **Mem Inst Butantan**, 36: 109-208, 1972.

JIA L.G., SHIMOKAWA K., BJARNASON J.B., FOX J.W. Snake venom metalloproteinases: structure, function and relationship to the ADAMs family of proteins. **Toxicon**, 34: 1269-1276, 1996.

JIA L.G., WANG X.M., SHANNON J.D., BJARNASON J.B., FOX J.W. Function of desintegrin-like/cysteine-rich domains of atroplysins A. Inhibition of platelet aggregation by recombinant protein and peptide antagonists. **J Biol Chem**, 272: 13094-13102, 1997.

JORGE M.T., RIBEIRO L.A. Alteração do tempo de coagulação sanguínea em pacientes picados por serpentes *Bothrops jararaca* adulta e filhote. **Hosp Clin Fac Med S Paulo**, 44: 143-145, 1989.

JORGE M. T., RIBEIRO L. A. Acidentes por serpentes peçonhentas do Brasil. **Rev Ass Med Brasil**, 36: 66-77, 1990.

JORGE M. T., RIBEIRO L. A. Acidentes causados por animais peçonhentos. In: **Doenças Transmissíveis**. ed Sarvier, São Paulo, 133-137, 1991.

KAMIGUTI A.S., HAY C.R., THEAKSTON R.D.G., ZUZEL M. Insights into the mechanism of haemorrhage caused by snake venom metalloproteinases. **Toxicon**, 34: 627-642, 1996.

KHOW O., CHANHOM L., OMORI-SATOH T., PUEMPUNPANICH S., SITPRIJA V. (2002) A hemorrhagin as a metalloprotease in the venom of *Trimeresurus purpureomaculatus*: purification and characterization. **Toxicon**, 40: 455-461, 2002.

KOCHOVA E. The origin of snakes and evolution of the venom apparatus. **Toxicon**, 25: 65-106, 1987.

LEONARDI A., GUBENSEK F., KRIZAJ I. Purification and characterization of two hemorrhagic metalloproteinases from the venom of the long-nosed viper, *Vipera ammodytes ammodytes*. **Toxicon**, 40: 55-92, 2001.

LÔBO DE ARAÚJO A., DONATO J.L., MORENO R.A., PRADO-FRANCESCHI J. Comparison of the phospholipase A₂, blood-clotting, caseinolytic and hemorrhagic activities of some Bothrops snake venoms. **Toxicon**, 28: 601, 1990.

LÔBO DE ARAÚJO A., RADVANYI F., BON C. Purification of an acidic phospholipase A₂ from *Bothrops lanceolatus* (Fer de lance) venom: molecular and enzymatic properties. **Toxicon**, 32: 1069-1081, 1994.

LÔBO DE ARAÚJO A., DONATO J.L., BON C. Purification from *Bothrops lanceolatus* (Fer de lance) venom of a fibrino(geno)lytic enzyme with esterolytic activity. **Toxicon**, 36: 745-758, 1998.

LÔBO DE ARAÚJO A., SOUZA A.O., CRUZ-HÖFLING M.A., FLORES C.A., BON C. *Bothrops lanceolatus* (Fer de lance) venom induces oedema formation and increases vascular permeability in the mouse hind paw. **Toxicon**, 38: 209-221, 2000.

LÔBO DE ARAÚJO A., KAMIGUTI A., BON C. Coagulant and anticoagulant activities of *Bothrops lanceolatus* (Fer de lance) venom. **Toxicon**, 39: 371-375, 2001.

LÔBO DE ARAÚJO A., DONATO J.L., LEITE G.B., PRADO-FRANCESCHI J., FONTANA M.D., BON C., SIMIONI L.R. Neuromuscular action of *Bothrops lanceolatus* (Fer de lance) venom and caseinolytic fraction. **Toxicon**, 40: 1283-1289, 2002

LOMONTE B., GUTIÉRREZ J.M., MORENO E., CERDAS L. Antibody neutralization of a myotoxin from the venom of *Bothrops asper* (terciopelo). **Toxicon**, 25: 443-450,, 1987.

MANDELBAUM F.R., REICHL A.P., ASSAKURA M.T. Some physical and biochemical characteristics of HF₂, one of the hemorrhagic factors in the venom of *Bothrops jararaca*. In: **Animal, Plant and Microbial Toxins**, Vol. 1. (Ohsaka A, Hayashi K, Sawai Y, eds). pp. 111-121. Plenum Press: London, 1976.

MANDELBAUM F.R., REICHEL A.P., ASSAKURA M.T. Isolation and charactrization of a proteolytic enzyme from the venom the snake *Bothrops jararaca* (Jararaca). **Toxicon**, 20: 955-972, 1982.

MANDELBAUM F.R., ASSAKURA M.T., REICHL A.P. Characterization of two hemorrhagic factors isolated from the venom of *Bothrops neuwiedi* (jararaca pintada). **Toxicon**, 22: 193-206, 1984.

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

MARUYAMA M., SUGIKI M., YOSHIDA E., MIHARA H., NAKAJIMA N. Purification and characterization of two fibrinolytic enzymes from *Bothrops jararaca* (jararaca) venom. **Toxicon**, 30: 853-864, 1992.

MARUYAMA M., TANIGAWA M., SUGIKI M., YOSHIDA E., MIHARA H. Purification and characterization of low molecular weight fibrinolytic/hemorrhagic enzymes from snake (*Bothrops jararaca*) venom. **Enzyme Protein**, 47: 24-35, 1993.

MATSUI T., FUJIMORI Y., TITANI K. Snake venom proteases affecting hemostasis and thrombosis. **Biochim Biophys Acta**, 1477: 146-156, 2000.

MEBS D., OWNBY C.L. Myotoxic components of snake venoms: their and biological activities. **Pharma Ther.**, 48: 223-236, 1990.

MEHRTENS J. **Living snakes of the world**. Sterling Publishing, New York, pp. 480, 1987.

MEIER J., STOCKER K.F. Biological and distribution of venomous snakes of medical importance and the composition of snake venoms. In: Meier J., White J. (Eds). **Handbook of clinical toxicology of animal venoms and poisons**. Flórida: CrC Press, 367-412, 1995.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes ofídicos**. Brasília: Centro de Documentação do Ministério da Saúde, 9-34, 1998.

MOREIRA L., BORKOW G., OVADIA M., GUTIÉRREZ J.M. Pathological changes induced by BaH1, a hemorrhagic proteinase isolated from *Bothrops asper* (terciopelo) snake venom, on mouse capillary blood vessels. **Toxicon**, 32: 977-987, 1994.

MOURA DA SILVA A.M., LAING G.D., PAINE M.J.I., DENNISON J.M.T.J., POLITI V., CRAMPTON R.D.G. Processing of pro-tumor factor- α by venom metalloproteinases: a hypothesis explaining local tissue damage following snake bite. **Eur J Immunol**, 26: 2000-2005, 1996.

NAHAS L., KAMIGUTI A.S., BARROS M.A.R. Thrombin-like and factor X-activator components of *Bothrops* snake venoms. **Thromb Haemost**, 41: 314, 1979.

NIKAI T., TATEOKA M., KOMORI Y., TATEMATSU R. A novel low molecular weight hemorrhagic toxin from *Trimeresurus flavoviridis* (orojima) venom. **J Nat Toxins**, 11: 155-63, 2002.

NISHIDA S., FUGIMURA Y., MIURA S., OSAKI Y., USAMI U., SUZUKI M., TITANI K., YOSHIDA E., SUGIMOTO M., YOSHIOKA A., FUKUI H. Purification and characterization of bothombin, a fibrinogen-clotting serine protease from venom of *Bothrops jararaca*. **Biochemistry**, 33: 1843-1849, 1994.

OHASKA A., JUST M., HABERMANN E. Action of snake venom principles on isolated glomerular basement membrane. **Biochim Biophys Acta**, 323: 415-428, 1973.

OHSACA A. Hemorrhagic, necrotizing and edema-forming effects of snake venoms. In: **Handbook of Experimental Pharmacology**. Vol 52. Snake Venom. Ed. Ilee, CY Berlin, Springer. p. 480-546, 1979.

OSHIMA-FRANCO, Y., LEITE, G.B., VALÉRIO, A.A., HYSLOP, S., ANDRIO-ESCARSO, S., GIGLIO, J.R., PRADO-FRANCESCHI, J., CRUZ-HÖFLING, M.A., RODRIGUES-SIMINONI, L. (2002). Rabbit antivenom efficacy against myotoxic and neurotoxic activities of *Bothrops jararacussu* venom and bothropstoxin-I. **J Venom Anim Toxins**, 8: 226-243

OVADIA M. Isolation and characterization of three hemorrhagic factors from the venom of the *Vipera palaestinae* . **Toxicon**, 16: 479-487, 1978.

OWNBY C.L., GEREN C.R. Pathogenesis of hemorrhage induced by hemorrhagic proteinase IV from timber rattlesnake (*Crotalus horridus horridus*) venom. **Toxicon**. 25: 517-526, 1987.

OWNBY C.L. Pathology of rattlesnake envenomation. In: **Rattlesnake venoms. Their actions and treatment.** (Tu AT, ed). pp.163-209. Marcel Dekker: New York, 1984.

OWNBY C.L., NIKAI T., IMAI K., SUGIHARA H. Patogenesis of hemorrhage induced by bilitoxin, a hemorrhagic toxin isolated from venom of the common cantil (*Agkistrodon bilineatus bilineatus*). **Toxicon**, 28: 837-846, 1990.

PETRETSKI J.H., KANASHIRO M.M., RODRIGUES F.R., ALVES E.W., MACHADO O.L.T., KIPNIS T.L. Edema induction by the desintegrin-like/cysteine-rich domains from a *Bothrops atrox* hemorrhagin. **Biochem Biophys Res Commun**, 276: 29-34, 2000.

QUEIROZ LS. SANTO NETO H., ASSAKURA M.T., REICHL A.P., MANDELBAUM F.R. Pathological changes in muscle caused by haemorrhagic and proteolytic factors from *Bothrops jararaca* snake venom. **Toxicon**, 23: 341-345, 1985.

RIBEIRO L.A., ALBUQUERQUE M.J., PIRES DE CAMPOS V.A.F., KATZ G., TAKAOKA N.Y., LEBRÃO M.L., JORGE M.T. Óbitos por serpentes peçonhentas no Estado de São Paulo: avaliação de 43 casos, 1988/93. **Rev Ass Med Brasil**, 44: 312-8, 1998.

RODRIGUES-SIMIONI, L., BORGESE, N., CECCARELLI, B. (1983). The effects of *Bothrops jararacussu* venom and its components on frog nerve-muscle preparation. **Neuroscience**, 10:475-489.

ROSENFELD G. Symptomatology, pathology and treatment of snake bites in South America. In: **Venomous animal and their venoms**. Vol. 1 (Bücherl W, Buckley E, Deulofeu V, eds.). pp. 345-403. Academic Press: New York, 1971.

RUCAVADO A., LOMONTE B., OVADIA M., GUTIÉRREZ J.M. Local tissue damage induced by BaP1, a metalloproteinase isolated from *Bothrops asper* (terciopelo) snake venom. **Exp Mol Pathol**, 63: 186-199, 1995.

RUCAVADO A., NÚÑEZ J., GUTIÉRREZ J.M. Blister formation and skin damage induced by BaP1, a hemorrhagic metalloproteinase from the venom of the snake *Bothrops asper*. **Int J Exp Pathol**, 79: 245-254, 1998.

SANCHEZ E.F., MAGALHÃES A., DINIZ C.R. Purification of a hemorrhagic factor (LHF-1) from the venom of the bushmaster snake, *Lachesis muta muta*. **Toxicon**, 25: 611-619, 1987.

SANCHEZ E.F., MAGALHÃES A., MANDELBAUM F.R., DINIZ C.R. Purification and characterization of the hemorrhagic factor II from the venom of the bushmaster snake (*Lachesis muta muta*). **Biochim Biophys Acta**, 6: 347-356, 1991.

SHAPIRO S.D., Matrix metalloproteinase degradation of extracellular matrix: biological consequences. **Curr Opin Cell Biol.** 10: 602-608, 1998.

SHARMA R.P., TAYLOR M.J. Animal Toxins. In: **Handbook of Toxicology.** Haley T.J., Berndt W.O. (eds) Washington: Harder & Row Pubkishers, 439-467, 1987.

THOMAS L., TYBURN B., BUCHER B., PECOUT F., KETTERLE J., RIEUX D., SMADJA D., GARNIER D., PLUMELLE Y. Prevention of thromboses in human patients with *Bothrops lanceolatus* evnenoming in Martinique: failure of anticoagulants and efficacy of a monospecific antivenom. **Am J Trop Med Hyg,** 52: 419-426,1995.

THOMAS L., TYBURN B., KETTERLE J., BIAO T., MEHDAOUI H., MORAVIE V., ROUVEL C., PLUMELLE Y., BUCHER B., CANONEE D., MARIE-NELLY C.A., LANG J. Prognostic significance of clinical grading of patients envenomed by *Bothrops lanceolatus* in Martinique. **Trans R Soc Trop Med Hyg,** 92: 542-545, 1998.

TU AT (1988) Hemorrhagic factors. Hemorrhagic proteases from snake venoms. **Hemostasis and Animal Venoms.** pp. 425-455. Marcel Dekker: New York.

USAMI Y., FUJIMURA Y., MIURA S., SHIMA H., YOSHIDA E., YOSHIOKA A., HIRANO K., SUZUKI M., TITÁN K. A 28 kDa protein with desintegrin-like structure (jararhagin-C) purified from *Bothrops jararaca* venom inhibits collagen and ADP-induced platelet aggregation. **Biochim Biophys Res Commun**, 201: 331-339, 1994.

VARANDA E. A., GIANNINI M.J.S.M. Bioquímica de Venenos de Serpentes. In: **Venenos Animais**, ed EPUC, Rio de Janeiro, 205-223, 1994.

VITAL BRAZIL O. Peçonhas. In: **Farmacodinâmica**, ed Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 1044-1072, 1982.

WARRELL D.A., FENNER P.J., Venomous bites and stings. **Br Med Bull**, 49: 423-439, 1993.

WÜSTER W., GOLAY P., WARRELL D.A. Synopsis of recent developments in venomous snake systematics. **Toxicon**, 35: 319-340, 1997.