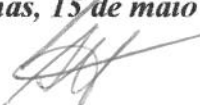


Amanda Abdalla Valério

Purificação e caracterização da fosfodiesterase do veneno de *Bothrops alternatus* (urutu)

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-Bioquímica Amanda Abdalla Valério.

Campinas, 15 de maio de 2002.


Prof. Dr. Stephen Hyslop
- Orientador -

CAMPINAS

2002

i
UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

Amanda Abdalla Valério

**Purificação e caracterização da
fosfodiesterase do veneno de
Bothrops alternatus (urutu)**

Dissertação de mestrado apresentada a Pós
Graduação da Faculdade de Ciências Médicas
da Universidade Estadual de Campinas para
obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Stephen Hyslop

CAMPINAS

2002

E Be
MADA T/UNICAMP
V237p
EX
BCI 50540
6.837/02
Dy
R\$ 11,00
23/08/02

0172314-4

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP

252420

V237p

Valério, Amanda Abdalla

Purificação e caracterização da fosfodiesterase do veneno de
Bothrops alternatus (urutu) / Amanda Abdalla Valério. Campinas,
SP : [s.n.], 2002.

Orientador : Stephen Hyslop

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

1. Enzima. 2. Purificação. I. Stephen Hyslop. II. Universidade
Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.



Banca Examinadora da Dissertação de Mestrado

Orientador:

Prof. Dr. Stephen Hyslop

Membros:

Prof. Dr. Stephen Hyslop

Prof. Dr. José Luiz Donato

Profa. Dr. Sérgio Marangoni

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

Data: 15/05/02

DEDICATÓRIA

A Deus, a meus pais: José Adilson e Regina, e a meu querido irmão Júnior (in memoriam) que sempre me iluminaram e estiveram me acompanhando no decorrer de minha trajetória de vida.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Stephen Hyslop, pela oportunidade, orientação, amizade e contribuição à minha formação científica.

À minha valiosa família, principalmente aos que me acompanharam de perto, meus Pais, Júnior, Ana, Vó Nair e D. Josefa, Dr. João que me incentivaram sempre.

A todos os amigos e funcionários do Departamento de Farmacologia, principalmente: Patrícia, Ágatha, Pamela, Ericleison, Alessandra Linardi, Christiane, Marta, Alessandra Stroka, Carla, Ivani, Enilton, Renata, Sílvia, Sueli, Cháriston, Gildo, Yoko, Nadim, Sara, Themys, Valéria, Wanderlei e Gislaine, pela convivência e valiosas colaborações em vários momentos.

Ao Sr. José Ilton dos Santos, pelo apoio técnico e amigo, pelas sugestões e ajuda.

Ao Álvaro, pela paciência e carinho que foram preciosos.

A Deus, pela chance de desenvolver este trabalho, pelas pessoas que colocou em meu caminho, enfim por tudo!

A CAPES, pela bolsa de estudo concedida.

***Uma luta infinita para atingir a perfeição, eis o nosso dever.
Esse dever traz em si a recompensa.
O resto está nas mãos de Deus.
(Mahatma Gandhi)***

***O Senhor meu Pai que me dá toda essa inspiração fazendo me
sentir não o maior nem o melhor...
Apenas seguir minha missão...
Através das dádivas que do Senhor recebo...
Peço-lhe de coração, dai-me força para que meus atos nem
minhas palavras machuquem meu irmão.
Que o meu coração esteja sempre aberto em paz, e que toda
nossa existência seja coroada de esperança e amor.
(Luiz Carlos S. Ribas)***

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	xvii
LISTA DE FIGURAS	xxi
LISTA DE TABELAS	xxiii
RESUMO	xxv
1. INTRODUÇÃO	29
1.1. Enzimas que atuam sobre ligações envolvendo grupos fosfatos	30
1.2. Fosfodiesterases	31
1.2.1. Histórico	31
1.2.2. Classificação e distribuição	31
1.2.3. Purificação	32
1.2.4. Propriedades físico-químicas	34
1.2.5. Propriedades cinéticas	36
1.2.6. Ativadores e inibidores de PDE	39
1.2.7. Propriedades imunológicas	40
1.2.8. Funções biológicas	40
1.3. <i>Bothrops alternatus</i>	42
1.3.1 Biologia	42
1.3.2. Toxinologia	45
1.3.2.1 Composição da peçonha	45
1.3.2.2. Atividades biológicas	46

2.	OBJETIVO	48
3.	RESULTADOS : ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO	50
4.	CONCLUSÕES	78
5.	SUMMARY	83
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	85

LISTA DE ABREVIATURAS

ADPase	Adenosina difosfatase
5'-AMP	5'- Adenosina monofosfato
ATPase	Adenosina trifosfatase
CM	Carboximetil
DNDP	Desoxi-citrulina difosfato
DEAE	Dietilaminoetil
DNase	Desoxirribonuclease
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilenodiaminotetraacético
EGTA	Ácido etilenoglicoltetraacético
ELISA	"Enzyme-linked immunosorbent assay"
FAD	Flavina adenina dinucleotídeo
GDP	Guanosina difosfato
IgG	Imunoglobulina G
IRA	Insuficiência renal aguda
K_m	Constante de Michaelis
K_i	Constante de inibição
LD₅₀	Dose letal 50%
NAD	Nicotinamida adenina dinucleotídeo
NADP	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato

PCMB	Ácido p- Mercuribenzóico
PDE	Fosfodiesterase
pI	Ponto isoelétrico
PLA₂	Fosfolipase A ₂
RNase	Ribonuclease
SBTI	Inibidor de tripsina derivado de soja
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS
Temed	N,N,N',N'- Tetrametilenodiamina
TDP	Timidina trifosfato
UDP	Uridina difosfato

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mecanismo de ação da PDE de peçonha ofídica.....	37
Figura 2. Mecanismo hipotético para ação de PDE de peçonha de serpente.....	43
Figura 3. <i>Bothrops alternatus</i> - Urutu.....	44
 Figuras no artigo para publicação	
Figure 1. Purification of PDE from <i>B. alternatus</i> venom.....	72
Figure 2 . Electrophoretic profile of venom and purified PDE and reactivity of the enzyme with commercial bothropic antivenom as assessed by immunoblotting.....	73
Figure 3. Immunoreactivity of commercial bothropic antivenom with PDE of <i>B. alternatus</i> venom.....	74
Figure 4. Lineweaver-Burk plot for <i>B. alternatus</i> PDE	75
Figure 5. pH and temperature optima and heat stability of <i>B. alternatus</i> PDE....	76
Figure 6. Influence of metals, EDTA and β -mercaptoethanol on PDE activity.....	77

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Propriedades físico-químicas de PDE de peçonhas ofídicas	80
---	----

RESUMO

RESUMO

Peçonhas de serpentes contêm enzimas que quebram ligações fosfáticas (ATPases, 5'-nucleotidases, fosfatases e fosfodiesterases ou PDE) e que agem sobre ácidos nucléicos (PDE, DNase e RNase). Nesse trabalho, purificou-se e caracterizou-se a PDE da peçonha de *Bothrops alternatus*. A PDE foi isolada da peçonha, usando-se uma combinação de cromatografias de gel filtração e troca iônica. Em SDS-PAGE, a enzima é constituída de uma única cadeia polipeptídica com uma massa molecular de 105 kDa, a qual foi inalterada pela presença do β -mercaptoetanol, indicando assim que a proteína não possui subunidades. A enzima foi reconhecida por anti-soro botrópico comercial, tanto no ELISA como no immunoblotting. A enzima purificada era desprovida de nucleotidase, fosfatase alcalina e atividade proteolítica. O pH ótimo da PDE foi de 7.5 a 9.5, com temperatura ótima de 60°C. Houve perda rápida de atividade, após 1 minuto a $\geq 70^\circ\text{C}$. O K_m da enzima foi de 2.69 mM. A atividade da PDE foi potencializada pelo cobalto e, em grau menor pelo cálcio, enquanto que o cobre, manganês, zinco, EDTA and β -mercaptoetanol foram inibitórios. Esses resultados mostram que esta enzima é pertence à família de proteínas da PDE isoladas de outras peçonhas ofídicas.

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

Peçonhas ofídicas são misturas complexas, constituídas principalmente (70-90%) por proteínas (toxinas e/ou enzimas), porém com a presença de carboidratos, lipídeos, aminas biogênicas, nucleotídeos, aminoácidos, peptídeos e componentes inorgânicos (BIEBER, 1979). As principais proteínas em peçonhas de serpentes são enzimas, tais como esterases, fosfatases, fosfolipases e proteases (TU, 1977; ELLIOTT, 1978; IWANAGA & SUZUKI, 1979; BAILEY, 1998; MACKESSY, 1998).

1.1 ENZIMAS QUE ATUAM SOBRE LIGAÇÕES ENVOLVENDO GRUPOS FOSFATOS

Muitas peçonhas contêm enzimas capazes de agir sobre ácidos nucleicos e sobre compostos contendo ligações que envolvem grupos de fosfato. Estas enzimas incluem ADPase/ATPases, fosfomonoesterases (ácida e alcalina), 5'-nucleotidases, desoxirribonucleases (DNase), ribonucleases (RNase) e fosfodiesterases (PDE), sendo que estas últimas são, certamente, as mais bem caracterizadas do grupo (ELLIOTT, 1978; IWANAGA & SUZUKI, 1979; MACKESSY, 1998; AIRD, 2002). Recentemente, sugeriu-se um mecanismo integrado para explicar como as enzimas deste grupo poderiam contribuir para os efeitos de envenenamento, principalmente através da metabolização e liberação de purinas, (ver seção 1.2.; AIRD, 2002).

1.2 FOSFODIESTERASES

1.2.1 Histórico

UZAWA (1932) foi o primeiro a demonstrar a presença de PDE em peçonha de várias serpentes, tais como a *Bothrops atrox*, *Bothrops asper*, e *Crotalus adamanteus*. Estas observações foram estendidas para várias outras espécies por GULLAND & JACKSON (1938). Paralelamente, TAKAHASHI (1932) estudou a ação de peçonhas sobre ácidos ribonucléicos, e posteriormente, COHN & VOLKIN (1953) mostraram que a enzima era capaz de liberar o ribonucleosídeo 5'-fosfato do RNA. Apesar destes estudos iniciais, apenas na década de 1950 é que começaram as primeiras purificações de PDE (HURST & BUTLER, 1951; SINSHEIMER & KOERNER, 1952; PRIVAT DE GARILHE & LASKOWSKI, 1955; RAZZELL & KHORANA, 1959), e somente a partir da década de 1970 é que surgiram as primeiras preparações de PDE homogêneas (livres de outras atividades) (EHRlich, TORTI, BERNARDI, 1971; DOLAPCHIEV, SULKOWSKI, LASKOWSKI, 1974; PRITCHARD, KOWALSKI, LASKOWSKI, 1977; LASKOWSKI, 1980).

1.2.2 Classificação e distribuição

As PDE de peçonhas são classificadas como exonucleases do tipo I (5'-exonuclease ou oligonucleato 5'-nucleotídhidrolase, EC 3.1.4.1) pois são responsáveis pela remoção sucessiva de unidades mononucleotídicas de DNA ou RNA a partir do terminal 3'-hidróxi livre. As exonucleases do tipo II (EC 3.1.4.2) são representadas pela PDE de baço. Numerosos estudos têm demonstrado que a PDE é uma enzima bastante comum e amplamente distribuída em peçonhas ofídicas

(SETOGUCHI, MORISAWA, OBO, 1968; MEBS, 1970; KOCHOLATY *et al.*, 1971; TAN & TAN, 1988; TAN, ARMUGAM, TAN, 1989; TAN, POH, TAN, 1989; TAN & PONNUDURAI, 1990a,b,c,d, 1991a,b,c,d; JORGE DA SILVA & AIRD, 2001), embora, em algumas famílias como a Elapidae e Hydrophidae, haja muito pouco ou nada desta enzima (TAN & PONNUDURAI, 1991a). A atividade fosfodiesterásica também é encontrada em peçonhas de artrópodes (SCHMIDT, BLUM, OVERAL, 1986; TAN & PONNUDURAI, 1992), especialmente formigas e vespas, porém em níveis bem reduzidos quando comparada às ofídicas.

1.2.3 Purificação

Muitos dos protocolos iniciais, descritos para a purificação de PDE, eram baseados, em grande parte, no fracionamento de peçonhas com acetona e/ou cromatografia em colunas de celulose (HURST & BUTLER, 1951; SINSHEIMER & KOERNER, 1952; BUTLER, 1956; RAZZELL & KHORANA, 1959; BJÖRK, 1963; RAZZELL, 1963), o que, às vezes, resultou em preparações impuras (contaminadas com 5'-nucleotidase, fosfatase alcalina e endonuclease).

A purificação de PDE de peçonhas ofídicas, geralmente, envolve uma combinação de gel filtração e algumas cromatografias de troca iônica (catiônica e/ou aniônica) e afinidade (EHRlich *et al.*, 1971; FRISCHAUF & ECKSTEIN, 1973; DOLAPCHIEV *et al.*, 1974; PHILIPPS, 1975, 1976; PRITCHARD *et al.*, 1977;; LASKOWSKI, 1980; SUGIHARA *et al.*, 1986; HALIM *et al.*, 1987; MORI, NIKAI, SUGIHARA., 1987), esta última realizada em resina de Sepharose acoplada ao O-(4-aminofenil)-O'-fenil—tiofosfato (FRISCHAUF & ECKSTEIN, 1973), em resina azul de

Sepharose (OKA, UEDA & HAYAISHI, 1978), em resina de NAD⁺-Sepharose (TATSUKI, IWANAGA, SUZUKI, 1975), NADP-agarose (LASKOWSKI, 1980), ou em resina de concavalina A -Sepharose (DOLAPCHIEV, SULKOWSKI, LASKOWSKI, 1974). A combinação de cromatografia por troca iônica em DEAE-celulose e eletroforese preparativa tem sido usada para purificar a PDE da peçonha de *Vipera aspis* (BALLARIO, BERGAMI, PEDONE, 1977).

O número de etapas necessárias para se conseguir uma preparação pura, geralmente três ou mais, embora alguns autores relataram apenas duas etapas (BALLARIO *et al.*; 1977; HALIM *et al.* 1987) reflete, em grande parte, uma das principais dificuldades na purificação de PDE, que é a eliminação de atividades contaminantes, especialmente as de fosfatase alcalina (monofosfatase não-específica) (EC 3.1.3.1) e 5'-nucleotidase (EC 3.1.3.5) (SULKOWSKI, BJÖRK, LASKOWSKI, 1963). De fato, muitas preparações de PDE de peçonhas de serpentes, disponíveis comercialmente, são, com frequência contaminadas por monofosfatase alcalina não-específica e 5'-nucleotidase, sendo que estes contaminantes podem interferir com a precisão em análises quantitativas dos produtos de reação de PDE (OKA *et al.*, 1978).

Com a possível exceção do trabalho do KINI & GOWDA (1984) sobre o isolamento de isoformas de PDE da peçonha de *Trimeresurus flavoviridis* através de cromatografia em resina CM-Sephadex C-25, não existe nenhuma descrição de purificação de PDE de peçonha em uma única etapa. Embora o uso de azul de Sepharose tenha sido sugerido para isso, o produto final obtido ainda contém atividades contaminantes, porém com baixo conteúdo de atividade fosfatásica (OKA *et al.*, 1978; LASKOWSKI, 1980). Uma possibilidade, ainda não pesquisada, seria o uso

de uma coluna de imunoafinidade, em que seriam acoplados anticorpos anti-PDE produzidos contra PDE purificada por um protocolo que inclui gel filtração, troca iônica. Isso poderia ser um método bastante rápido e econômico para se obter quantidades elevadas de enzima pura.

1.2.4 Propriedades físico-químicas

As PDE de peçonha tem massa molecular que varia entre 98 e 150 kDa, podendo conter ou não carboidratos (LASKOWSKI, 1980; KINI & GOWDA, 1984; MORI *et al.*, 1987; SUGIHARA *et al.*, 1986; DOLAPCHIEV, VASSILEVA, KOUNANOV, 1980; PHILIPPS, 1975). Na maioria dos casos, estas enzimas não possuem subunidades, uma vez que o tratamento com β -mercaptoetanol ou uréia não altera a massa molecular da proteína ou o número de bandas proteicas observadas em SDS-PAGE. A única exceção até o momento é a PDE da cascavel norte americana *Crotalus ruber ruber* que existe em forma de homodímero com subunidades de 49 kDa (MORI *et al.*, 1987). Na maioria das peçonhas, ocorre apenas uma isoforma de PDE (HALIM *et al.*, 1987; MORI *et al.*, 1987), conforme demonstrado tanto pelos perfis cromatográficos como por experimentos de isoeletrofocalização. Entretanto, existem exceções, como os venenos de *Crotalus adamanteus* (BOMAN & KALETTA, 1957), *Trimeresurus flavoviridis* (KINI & GOWDA, 1984) e *Vipera palestinae* (LEVY & BDOLAH, 1976), onde podem ocorrer várias isoformas (3 a 5) de PDE no mesmo veneno. A possibilidade de que algumas destas poderiam ser o resultado da ação de proteases presentes no próprio veneno (KHORANA, 1961) ainda não foi rigorosamente testada. O ponto

isoeletrico (pI) das PDE varia de 7,94 a 10,5 (PHILIPPS, 1976; SUGIHARA *et al.*, 1986; MORI *et al.*, 1987).

De modo geral, as PDE de venenos mostram atividade máxima entre 50°C e 60°C (PHILIPPS, 1975, 1976; HALIM *et al.*, 1987), porém, em temperaturas acima de 40°C, já pode ocorrer uma inativação mais rápida da enzima (BJÖRK, 1963; HALIM *et al.*, 1987). A atividade começa a se perder rapidamente acima de 55°C, embora exista certa variação entre as PDE. (PHILIPPS, 1976; SUGIHARA *et al.*, 1986; MORI *et al.*, 1987; BJÖRK, 1963). A inativação pelo calor pode ser influenciada pelo pH do meio, ocorrendo em temperaturas mais baixas em pH abaixo de 7 e acima de 9 (BJÖRK, 1963).

Por outro lado, a atividade enzimática pode ser mantida durante meses (até um ano) quando congelada a -20°C (PRIVAT DE GARILHE & LASKOWSKI, 1955; BJÖRK, 1963; RICHARDS *et al.*, 1967) em tampão Tris-acetato, pH 8,8 contendo 0,005% Triton X-100 e glicerol 50% (LASKOWSKI, 1980), ou quando estocada a 4°C na presença de NaCl 0,1 M (PRIVAT DE GARILHE & LASKOWSKI, 1955) ou de um antimicrobiano (mertiolato 0,01%) (BUTLER, 1956), ou em glicerol 30% (BALLARIO *et al.*, 1977) ou acetato de magnésio 10 mM e glicerol 10% (PHILIPPS, 1976).

Procedimentos como a ultrafiltração, diálise e liofilização freqüentemente resultam em alguma perda de atividade, especialmente em soluções diluídas de enzima e em pH fora da faixa de 7 a 9 (PRIVAT DE GARILHE & LASKOWSKI, 1955; BOMAN & KALETTA, 1957; RAZZELL & KHORANA, 1959; BJÖRK, 1963; FRISCHAUF & ECKSTEIN, 1973; DOLAPCHIEV *et al.*, 1974).

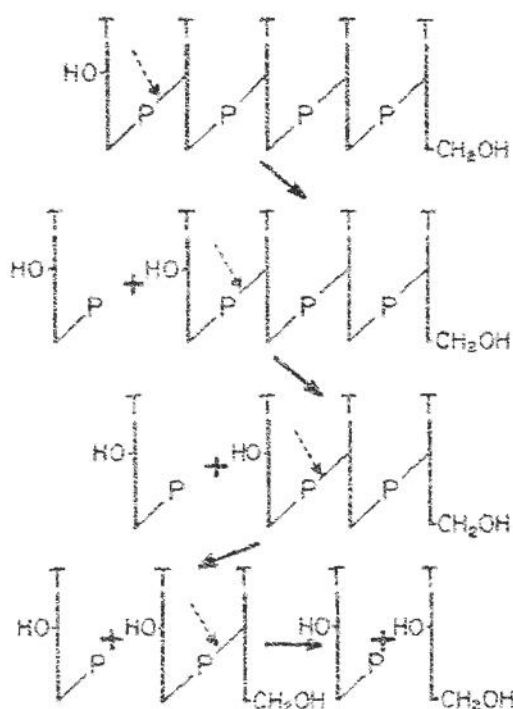
1.2.5 Propriedades cinéticas

A PDE de peçonha atua sobre ácidos nucléicos lineares de fita única ou dupla, mas também é capaz de degradar DNA circular (PRITCHARD *et al.*, 1977; LASKOWSKI, 1980). A disponibilidade de um terminal 3'-hidróxi livre é fundamental para a atuação da enzima sobre DNA linear (Figura 1), pois este grupo serve como âncora para a ligação da enzima ao ácido nucléico; a presença de um grupo 3'-fosfomonoéster, no terminal, confere resistência do substrato à degradação enzimática (KHORANA, 1961).

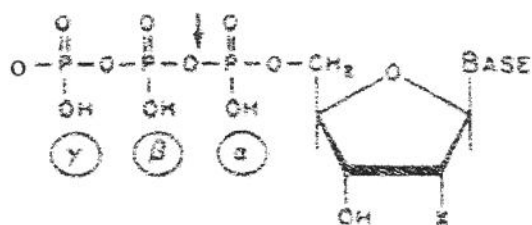
Além da sua atividade nucleolítica ou diesterásica, a enzima também mostra uma ação pirofosfatásica sobre nucleotídeos trifosfáticos, onde atua, quebrando a ligação fosfodiéster α - β , liberando assim pirofostato (KHORANA, 1961; DOLAPCHIEV *et al.*, 1974). Ao contrário de 5'-nucleotidase, a PDE não libera fosfato inorgânico dos seus vários substratos.

A quebra da ligação α - β forma a base dos ensaios para a quantificação da atividade de PDE através da hidrólise de uma variedade de substratos sintéticos, tais como *bis*-(*p*-nitrofenil)-fosfato, *p*-nitrofenil timidina-5'-fosfato, *p*-nitrofenil uridina-5'-fosfato, oligonucleotídeos de ácido timidílico, e oligonucleotídeos de ácido timidílico, terminando em desoxicitidílico com um resíduo 5'-fosfato no grupo final, a degradação dos quais resulta em uma cor amarela em razão da liberação de *p*-nitrofenol em pH alcalino (PRIVAT DE GARILHE & LASKOWSKI, 1955; RAZZELL & KHORANA, 1959; KHORANA, 1961; RAZZELL, 1963; LASKOWSKI, 1980).

A



B



- BASE = A, C, G, T, U AND X = OH, H

Figura 1: Mecanismo de ação da PDE de peçonha ofídica – ponto de clivagem de fosfodiesterase da peçonha de serpente.

(A) Clivagem seqüencial de ligações fosfáticas em cadeia de ácido nucléico. A seta tracejada indica o ponto de quebra (Razzel & Khorana, 1959).

(B) Clivagem da ligação fosfática α - β em nucleotídeos trifosfáticos (Pollack & Auld, 1982)

Destes substratos, os mais sensíveis são ésteres de timidina e uridina, contendo mono-*p*-nitrofenil na posição 5'; ésteres na posição 3' são resistentes à PDE (RAZZELL & KHORANA, 1959; KHORANA, 1961; ELLIOTT, 1978). De modo geral, substratos à base de desoxirribonucleotídeos são mais suscetíveis à ação da enzima de que substratos derivados de ribonucleotídeos; não há variação na suscetibilidade de substratos derivados de diferentes purinas ou de diferentes pirimidinas.

Embora os ensaios usados para a quantificação de PDE sejam, geralmente, colorimétricos, o uso de substratos fluorogênicos, baseados em nucleotídeos trifosfáticos acoplados ao 1-aminonaftaleno-5-ácido sulfônico (1,5-ANS) (POLLACK & AULD, 1982) ou em mononucleotídeos acoplados a 4-metilumbeliferil (LO *et al.*, 1972) também tem sido sugerido. Com substratos como o ácido poliadenilato, a atividade enzimática pode ser acompanhada, monitorando-se o aumento na absorbância a 260 nm (PHILIPPS, 1976).

O pH ótimo para a atividade PDE varia entre 8,0 e 9,2 (BJÖRK, 1963; PHILIPPS, 1976; HALIM *et al.*, 1987). A estabilidade da enzima em solução é influenciada pelo pH, sendo que valores de pH entre 6 a 9 conservam melhor a enzima de *B. atrox*, especialmente em temperaturas acima de 37°C; a atividade cai rapidamente em pH <6 e >9 (BJÖRK, 1963; PHILIPPS, 1975).

Com a exceção da PDE de *C. adamanteus* (RAZZELL & KHORANA, 1959; KHORANA, 1961), pouco se sabe dos parâmetros cinéticos destas enzimas de peçonhas. O K_m de PDE varia da faixa micromolar (RAZZELL & KHORANA, 1959) à milimolar (SUGIHARA *et al.*, 1986; MORI *et al.*, 1987), e é influenciado pelo substrato.

1.2.6 Ativadores e inibidores de PDE

As PDE de peçonhas são metaloenzimas, contendo 1 mole de zinco por mole de proteína (DOLAPCHIEV *et al.*, 1980; MORI *et al.*, 1987). Mesmo com a presença de zinco, algumas PDE dependem de outros metais, como o Mg^{2+} (PHILIPPS, 1975, 1976) para atividade plena. DOLAPCHIEV *et al.*, (1980) sugeriram que o zinco da PDE serviria para a atividade catalítica, enquanto que o Ca^{2+} e Mg^{2+} servem para ligação do substrato. Sendo assim, não é surpreendente que a atividade destas enzimas possa ser inibida por quelantes de metais tais como EDTA, EGTA, e o-fenantrolina (RAZZEL & KHORANA, 1959; PHILIPPS, 1975, 1976; KINI & GOWDA, 1984; SUGIHARA *et al.*, 1986; HALIM *et al.*, 1987; MORI *et al.*, 1987).

A inibição observada com cisteína, DTT, e ácido cloro *p*-mercuribenzóico (PCMB) sugere a importância de ligações S-S ou grupos -SH na atividade da enzima. A PDE de *C. adamanteus* contém sete pontes sulfídricas (DOLAPCHIEV *et al.*, 1980). Por outro lado, resíduos de histidina contribuem pouco para a atividade enzimática, uma vez que a iodoacetamida não influencia a mesma (HALIM *et al.*, 1987). De modo semelhante, a serina parece pouco importante, uma vez que o inibidor de tripsina, derivado de soja (SBTI), e a benzamidina não afetam a atividade enzimática (BUTLER, 1956; SUGIHARA *et al.*, 1986; MORI *et al.*, 1987). Estas observações estão de acordo com os achados de CULP & BUTLER (1986), mostrando que o aminoácido chave para a atividade catalítica no sítio ativo é a treonina.

Compostos como o ADP, AMP, ácido ascórbico, ácido tioglicólico, cádmio, e glutathione também inibem a PDE (RAZZELL & KHORANA, 1959; PHILLIPS, 1975; SUGIHARA *et al.*, 1986; HALIM *et al.*, 1987; MORI *et al.*, 1987), enquanto que outros,

como o arsenato de sódio, citrato de sódio, β -mercaptoetanol e sulfato de berílio exercem pouco efeito inibitório (BUTLER, 1956; HALIM *et al.*, 1987).

Do ponto de vista cinético, SUGIHARA *et al.* (1986) determinaram uma constante de inibição (K_i) de 0.76 mM para a inibição da PDE de *Trimeresurus mucrosquamatus* pela PCMB, usando-se como substrato o *p*-nitrofenil timidina-5'-fosfato. Por outro lado, um K_i maior (12 mM) foi obtido para inibição da PDE de *C. r. ruber* pelo PCMB (MORI *et al.*, 1987). No caso da PDE da peçonha de *C. cerastes*, a cisteína produz inibição não competitiva com K_i de 3,35 mM, enquanto que o ADP produz inibição competitiva com K_i de 0,47 mM, ambas na presença de *bis*(*p*-nitrofenil) fosfato como substrato, (HALIM, *et al.* 1987). [RAZZELL & KHORANA, 1959 para outros valores de K_i com inibidores diferentes].

1.2.7 Propriedades imunogênicas

Apesar de numerosos estudos sobre a purificação e caracterização de PDE de peçonhas ofídicas, sabe-se muito pouco sobre as relações imunológicas entre estas enzimas. Alguns estudos têm usado a PDE purificada para produzir anti-soros (LEVY & BDOLAH, 1976), ou tem usado antivenenos comerciais (SUGIHARA *et al.*, 1986) para avaliar a pureza da enzima obtida após separação por métodos cromatográficos, porém não há relato de algum estudo comparativo entre PDE ofídicas.

1.2.8 Funções biológicas

O grande interesse que se tem demonstrado na purificação e caracterização de PDE, nos últimos 50 anos, deve-se, principalmente, à larga utilidade desta enzima

como ferramenta para degradar ácidos nucléicos em estudos estruturais destas moléculas e de outras, como a poli(ADP-ribose) e seus derivados (EHRlich *et al.*, 1971; HO & GILHAM, 1973; OKA *et al.*, 1978). Por outro lado, a função de PDE em peçonhas ofídicas ainda não está muito bem esclarecida. O papel mais óbvio é o digestivo, onde estas enzimas poderiam contribuir para a degradação de ácidos nucléicos em células lesadas por outros componentes da peçonha. De fato, vários autores já sugeriram que, além da sua toxicidade, muitas enzimas encontradas em peçonhas exercem um papel digestivo (ZELLER, 1948, 1977; THOMAS & POUGH, 1979; GANS, 1978; IVANOV & IVANOV, 1979; KARDONG, 1980; KOCHVA, NAKAR, OVADIA., 1983).

O único trabalho que investigou um papel fisiológico para a PDE é o do RUSSELL, BUESS, WOO (1963), em que demonstraram que a DL_{50} intraperitoneal da PDE preparada da peçonha de diversas espécies de *Crotalus* e de *Vipera russelli*, varia de 3,08 a 4,65 mg/kg em ratos. A injeção intravenosa causou hipotensão arterial em doses de 1 a 6 µg/kg. Entretanto, a interpretação destas observações é complicada pelo fato das PDE usadas apresentarem múltiplas bandas eletroforéticas, o que poderia indicar contaminação por outros componentes do veneno que seriam responsáveis pelos efeitos observados (MEBS, 1978).

Baseado, em parte, sobre o estudo de RUSSELL *et al.* (1963) acima, e também em outras evidências, sugeriu-se recentemente (AIRD, 2002; ZELLER, 1977) que a PDE poderia atuar no sistema cardiovascular através da sua capacidade de liberar 5'-mononucleotídeos de DNA, RNA, rRNA e tRNA, (PETROVA, PHILIPPSSEN, ZACHAU, 1975; KELLER, 1964; PHILIPPS & CHIEMPRASERT, 1976), os quais serviriam como

substrato para a 5'-nucleotidase do veneno (e a enzima endógena correspondente da presa), levando à formação de purinas, que seriam os mediadores finais da resposta a esta enzima em nível da vasculatura e órgãos como o coração (Figura 2). Poderia também haver a formação de purinas, mediante a atuação inicial de PDE sobre uma série de outros substratos, tais como o ATP, ADP, adenosina 5'-tetrafosfato, dCDP-colina, TDP-ramnose, UDP-glicose, GDP-mannose, e outros. Esta hipótese interessante ainda precisa ser confirmada com estudos farmaco-fisiológicos.

1.3. *Bothrops alternatus*

1.3.1 Biologia

A serpente *B. alternatus* (Figura 3) é encontrada no Centro, Norte e Nordeste da Argentina, Sul do Paraguai, Uruguai, e nas regiões Sul, Sudeste e parte do Centro-Oeste do Brasil, ocorrendo em altitudes até 700 m acima do nível do mar (CAMPBELL & LAMAR, 1989). Em termos de *habitat*, a *B. alternatus* é encontrada em regiões úmidas de florestas tropicais, subtropicais e temperadas, sendo comum também em canaviais. O tamanho médio é em torno de 1 m de comprimento, podendo chegar perto de 2 m. Este porte elevado significa que entre as *Bothrops* brasileiras, a *B. alternatus* é uma das poucas espécies com rendimento máximo de peçonha acima de 200 mg (peso seco) por espécime (as outras são *B. atrox*, *B. insularis*, *B. moojeni*, e *B. jararacussu* (ROSENFELD, 1971; FURTADO *et al.*, 1991; DE ROODT *et al.*, 1998b). A quantidade elevada de peçonha que dispõe esta espécie explica, em parte, a gravidade de envenenamentos por esta serpente.

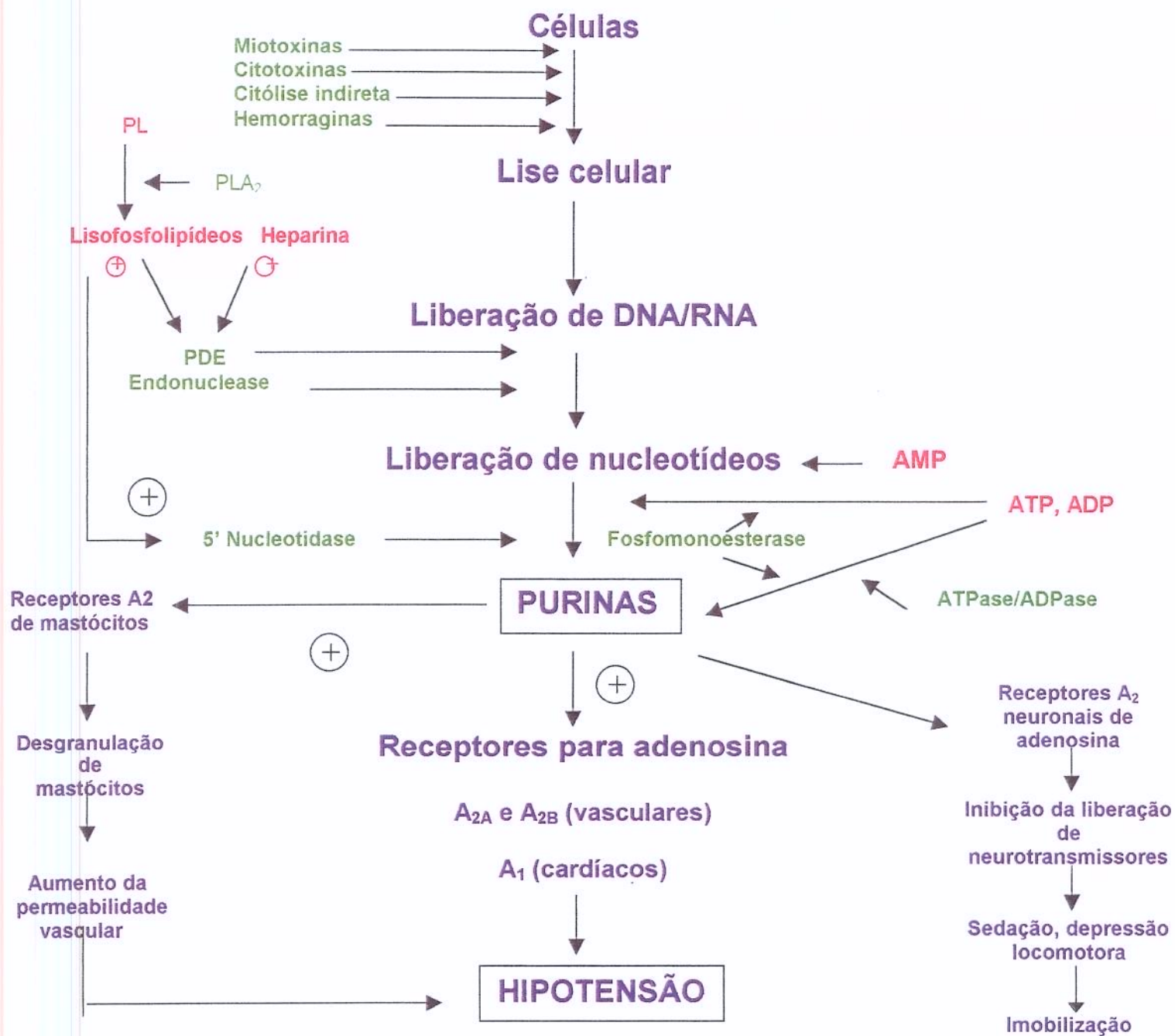


Figura 2. Mecanismo hipotético para a ação de PDE de peçonha de serpente. A lise de células leva à liberação de DNA que serviria de substrato para a PDE e endonuclease (DNase), com subsequente formação de nucleotídeos. Estes, por sua vez, são degradados por 5'-nucleotidase para formar purinas que então desencadeiam respostas fisiológicas. +, ativação. (Modificado de AIRD, 2002). Azul - cadeia de respostas biológicas
Verde - enzimas de peçonha
Vermelho - substratos ou ativadores. PL - fosfolipases

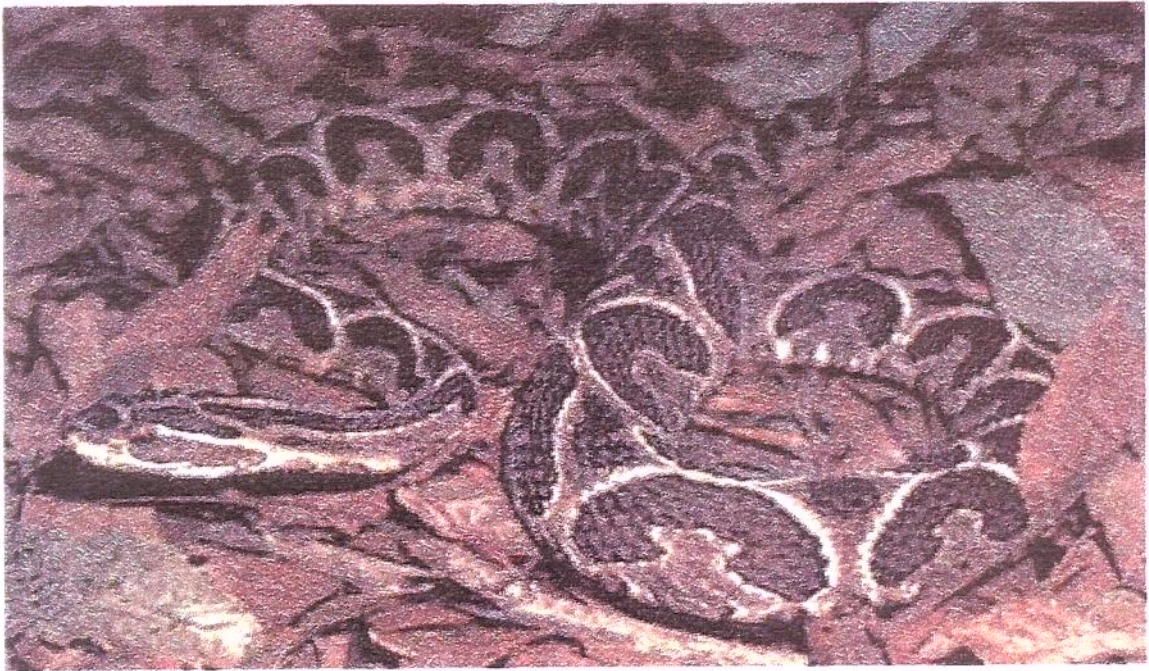


Figura 3. *Bothrops alternatus*- (urutu).

1.3.2 Toxinologia

1.3.2.1 Composição da peçonha

Apesar de ser uma espécie bastante agressiva e perigosa, a toxinologia de *B. alternatus* é muito menos estudada quando comparada à de *B. jararaca*, talvez por esta última ser a espécie de maior importância clínica, causando o maior número de acidentes em humanos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 1998), e, portanto, ser a mais estudada entre as *Bothrops* brasileiras.

Em comum com outras peçonhas botrópicas, a peçonha de *B. alternatus* contém uma variedade de proteínas e enzimas (MEBS, 1970; TAN & PONNUDURA, 1991b), algumas das quais já foram isoladas e caracterizadas, incluindo fosfolipase A₂ (NISENBOM, SEKI, VIDAL, 1986^a; NISENBOM *et al.*, 1986b, 1988), uma enzima tipo-trombina - a balterobina (SMOLKA *et al.*, 1998), um inibidor da trombina - a botroalternina - parecida com a botrojararacina de *B. jararaca* (CASTRO *et al.*, 1998), uma metaloprotease com um domínio tipo desintegrina capaz de inibir a adesão celular (SOUZA *et al.*, 2000), e 5'-nucleotidase (CORRADINI & HYSLOP, resultados não publicados).

Vários estudos já demonstraram que a peçonha de *B. alternatus* compartilha diversos antígenos com outras peçonhas botrópicas, e que suas atividades biológicas (ver seção 1.3.2.2) podem ser efetivamente neutralizadas por antivenenos polivalentes comerciais (SILES VILLARROEL *et al.*, 1974, 1976/1977, 1978/1979; ANTUNES, RODRIGUES-SIMIONI, PRADO-FRANCESCHI, 1989; DIAS DA SILVA *et al.*, 1989; MOURA-DA-SILVA *et al.*, 1990b; de ROODT *et al.*, 1998a, 1999; HENEINE *et al.*, 1999;

ESTEVIÃO-COSTA *et al.*, 2000; FERNANDES *et al.*, 2000), e também por soro do gambá *Didelphis albiventris* (SOARES *et al.*, 1997).

1.3.2.2 Atividades biológicas

Os principais efeitos locais observados em envenenamento experimental e clínico (BAUAB *et al.*, 1994) com peçonha de *B. Alternatus* são edema (FLORES, ZAPPELLINI, PRADO-FRANCESCHI, 1993; MARUNAK *et al.*, 1999), hemorragia (PÉREZ *et al.*, 1997b, 1998; MARUNAK *et al.*, 1999; DE ROODT *et al.*, 2000) e necrose (QUEIROZ & PETTA, 1984; MARUNAK *et al.*, 1999). Em humanos, bolhas, hemorragia e necrose ocorrem no local da picada em 22%, 41% e 9,4% dos casos, respectivamente (BAUAB *et al.*, 1994). Este quadro se assemelha muito a outras peçonhas botrópicas (GUTIÉRREZ & LOMONTE, 1989; WATT, 1989; JORGE & RIBEIRO, 1990; FAN & CARDOSO, 1995). Curiosamente, esta peçonha parece não conter as miotoxinas básicas (MOURA-DA-SILVA, CARDOSO, TANIZAKI, 1990a; MOURA-DA-SILVA *et al.*, 1990a, 1991; ANDRIÃO-ESCARSO *et al.*, 2000) comuns a vários outras peçonhas botrópicas (GUTIÉRREZ & LOMONTE 1995, 1997). Alguns dos efeitos locais da peçonha, especialmente o edema e a resposta inflamatória poderiam ser mediadas por metaloproteinases (GUTIÉRREZ & RUCAVADO, 2000), pela formação de metabólitos de ácido araquidônico, liberado pela ação da PLA₂ da peçonha (NISENBOM *et al.*, 1986a,b; 1988) e, posteriormente, convertidos em leucotrienos pela via lipoxigenase (FLORES *et al.*, 1993), ou pela liberação de mediadores endógenos como a histamina (ANTUNES *et al.*, 1989) e citocinas como o TNF α (MOURA-DA-SILVA *et al.*, 1996; PETRICEVICH *et al.*, 2000).

A letalidade (LD_{50}) da peçonha de espécimes adultas de *B. alternatus*, embora semelhante à de outras *Bothrops* sul-americanas, varia consideravelmente (2.2 a 11.5 mg/kg, i.p.), dependendo da origem geográfica (SANCHEZ *et al.*, 1992), e também da idade da serpente, com exemplares jovens possuindo uma peçonha mais potente que adultos, tanto na letalidade (FURTADO *et al.*, 1991) como nas atividades edematogênica e hemorrágica (MARUNAK *et al.*, 1999).

As peçonhas botrópicas exercem várias ações sobre a hemostasia e cascata de coagulação (ROSENFELD, 1971; KAMIGUTI & CARDOSO, 1989; FAN & CARDOSO, 1995; KAMIGUTI & SANO-MARTINS, 1995), e o envenenamento por *B. alternatus* em humanos (BAUAB *et al.*, 1994) e animais (cães) (PÉREZ *et al.*, 1997a) leva a distúrbios de coagulação. No caso de humanos, quase todos os pacientes (97%) apresentam alteração no tempo de coagulação (BAUAB *et al.*, 1994). Esta peçonha não possui atividade pró-agregante, mas tem baixa atividade anti-agregante (FRANCISCHETTI *et al.*, 1998), a qual é mediada por um inibidor de trombina (CASTRO *et al.*, 1998). O sangue incoagulável pode agravar a severidade da hemorragia interna causada por proteases da peçonha. Embora tenha sido relatado a presença de uma metaloproteinase na peçonha de *B. alternatus* (SOUZA *et al.*, 2000), pouco se sabe da sua contribuição à hemorragia sistêmica, quando comparada a hemorraginas como a jararagina de *B. jararaca* (KAMIGUTI *et al.*, 1996; KAMIGUTI, ZUZEL, THEAKSTON, 1998). A hemorragia interna extensa pode resultar em hipovolemia e choque circulatório, o qual, em conjunto com a IRA provocada pela peçonha, leva à morte do paciente (ROSENFELD, 1971; WATT, 1989; FAN & CARDOSO, 1995; RUSSELL *et al.*, 1997).

2. OBJETIVO

OBJETIVO

O objetivo do presente trabalho foi purificar e caracterizar a fosfodiesterase (PDE) presente na peçonha de *B. alternatus*:

- Purificar a enzima através de métodos cromatográficos
- Caracterizar a PDE através da cinética enzimática e propriedades físico-químicas
- Caracterizar a enzima com as propriedades imunogênicas

Comparar suas propriedades com as PDE de outras peçonhas ofídicas.

3. RESULTADOS: ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO (J. Protein Chem.)

**PURIFICATION AND CHARACTERIZATION
OF A PHOSPHODIESTERASE FROM
Bothrops alternatus SNAKE VENOM**

A. A. Valério¹, A. C. Corradini¹, P. C. Panunto¹, S. M. Mello^{1,2} and S.
Hyslop^{1*}

¹Departamento de Farmacologia, Faculdade de Ciências Médicas, and

²Centro de Controle de Intoxicações, Hospital das Clínicas,

Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), CP 6111, 13083-970,
Campinas, SP, Brazil

Running title: Phosphodiesterase from *B. alternatus* venom

* Author for correspondence at the above address. Tel.: 55-19-3788-7185, Fax: 55-19-3289-2968,
E-mail: hyslop@fcm.unicamp.br

Abstract

A phosphodiesterase was purified from the venom of the snake *Bothrops alternatus* by a combination of gel filtration and ion exchange chromatographies. In SDS-PAGE, the enzyme gave a single band with a molecular mass of 105 kDa which was unaltered in the presence of β -mercaptoethanol, indicating that the protein contained no subunits. There were no contaminating 5'-nucleotidase, alkaline phosphatase and protease activities. The enzyme was recognized by commercial bothropic antiserum and gave a single band in immunoblotting. The enzyme had a pH optimum in the range of 7.5-9.5 and the optimum temperature was 60°C, with activity being rapidly lost within 1 min at $\geq 70^\circ\text{C}$. The K_m of the enzyme was 2.69 mM. PDE activity was potentiated by cobalt and, to a lesser extent, by calcium, whereas copper, manganese, zinc, EDTA and β -mercaptoethanol were inhibitory. These properties show that this enzyme is very similar to that isolated from other snake venoms.

KEY WORDS: *Bothrops alternatus*; enzyme; phosphodiesterase; purification; venom

Footnote:

¹Abbreviations: DNase, deoxyribonuclease; PDE, phosphodiesterase; PLA₂, phospholipase A₂, RNase, ribonuclease.

1. INTRODUCTION

Snake venoms are a rich source of enzymes, including peptidases, (metallo)proteases, phospholipases A₂ (PLA₂)¹, nucleases (DNase and RNase), nucleotidases, phosphatases and phosphodiesterases (Elliott, 1978; Suzuki and Iwanaga, 1979; Bailey, 1998). Compared to (metallo)proteases and PLA₂, venom enzymes active on nucleic acids and phosphate bonds are still poorly characterized, both biochemically and in terms of their biological activities and contribution to the local and systemic effects of envenomation (see Mackessy, 1998). Of this group of enzymes, the best characterized are the phosphodiesterases (PDE) (exonuclease I, EC 3.1.4.1) which are abundant in venoms of the Crotalidae (Tan *et al.*, 1989; Tan and Ponnudurai, 1990b, 1991b,d) and Viperidae (Tan and Ponnudurai, 1990c), whereas venoms of the Elapidae and Hydrophidae generally have low levels of this enzyme (Tan and Tan, 1988; Tan and Ponnudurai, 1990a,d, 1991a,c). Recently, Aird (2002) suggested that, in addition a digestive function, these enzymes could contribute to envenomation through their ability to release or form purines from endogenous sources in the envenomed animal.

The snake *Bothrops alternatus* occurs in southeastern and southern Brazil, Paraguay, Uruguay and northern Argentina (Campbell and Lamar, 1989). Most of the enzymes characterized so far from the venom of *B. alternatus* are related directly to the effects observed following clinical or experimental envenomation (coagulopathy, hemorrhage and lethality) (Bauab *et al.*, 1994), and include a thrombin-like enzyme (Smolka *et al.*, 1998) and a non-enzymatic thrombin inhibitor (Castro *et al.*, 1998), a metalloproteinase (Souza *et al.*, 2000) and phospholipase (Nisenbom *et al.*, 1986a,b, 1988). Little is known of enzymes which have no immediately apparent involvement in the local and systemic effects of envenomation. In this report, we describe the purification and characterization of a phosphodiesterase from this venom.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Reagents

Acrylamide, adenosine 5'-monophosphate (5'-AMP), ammonium persulfate, bovine casein, bovine serum albumin, bromophenol blue, 4-chloro-1-naphthol, ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA, sodium salt), β -mercaptoethanol, N,N-methylene-bis-acrylamide, molecular weight markers for electrophoresis, nitrocellulose membrane (0.45 μ m), *p*-nitrophenyl phosphate, *bis*(*p*-nitrophenyl)-phosphate, O-phenylenediamine, rabbit anti-horse IgG-peroxidase conjugate, sodium dodecyl sulfate, N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine (TEMED) and Tween 20 were from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). Glycine, rainbow molecular weight markers for blotting, Tris and all chromatographic media were from Amersham-Pharmacia Biotech (Piscataway, NJ, USA). All other reagents were of analytical grade. Ninety-six well microtiter plates were from Labsystems (Labsystems Oy, Helsinki, Finland).

2.2. Venom and antivenom

B. alternatus venom was purchased from a private supplier (Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil). Commercial antivenom raised against a pool of *Bothrops* venoms (*B. alternatus*, *B. jararaca*, *B. jararacussu*, *B. moojeni*, *B. neuwiedi*) was obtained from the Instituto Butantan (São Paulo, SP, Brazil).

2.3. Purification of PDE

2.3.1. Gel filtration chromatography on Superdex 75

B. alternatus venom (100-200 mg) was dissolved in 0.05 M Tris-HCl buffer, pH 7.0 and applied to a column (1.6 cm x 60 cm column) of Superdex 75 equilibrated with the above buffer at

20°C. The venom was eluted with the same buffer at a flow rate of 30 ml/h and the elution profile was monitored at 280 nm using an ÄKTAprime chromatography system (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, USA). Fractions of 2 ml were collected and screened for PDE activity. The active fractions were pooled for the next step.

2.3.2. Anionic ion-exchange chromatography on DEAE-Sephadex A25

The PDE pool from gel filtration was fractionated on a column (1.6 cm x 10 cm) of DEAE-Sephadex A25 equilibrated with 0.05 Tris-HCl, pH 7.0. After washing the column with this buffer to remove unbound material, the enzyme was eluted (30 ml/h) with a linear gradient (0-1.0 M) of NaCl in Tris buffer. The elution profile was monitored at 280 nm and 2 ml fractions were collected and screened for enzyme activity. Active fractions were pooled for the next step.

2.3.3. 'Affinity' chromatography on Blue Sepharose®

The PDE pool from the previous step was loaded onto a 5 ml HiTrap column of Blue-Sepharose® equilibrated with 0.05 Tris-HCl, pH 7.0. After washing with this buffer to remove unbound material, PDE was eluted (30 ml/h) with a linear gradient (0-1.0 M) of NaCl in Tris buffer. The elution profile was monitored at 280 nm and 1 ml fractions were collected and screened for enzyme activity. Active fractions were again pooled and dialyzed against Tris buffer without NaCl.

2.3.4. Cationic ion-exchange chromatography on SP-Sepharose

The PDE pool from the previous step was loaded onto a 5 ml HiTrap column of SP-Sepharose equilibrated with 0.05 Tris-HCl, pH 7.0. After washing with this buffer to remove

unbound proteins, PDE was eluted with a linear gradient (0-1.0 M) of NaCl in Tris buffer at a flow rate of 30 ml/h. The elution profile was monitored at 280 nm and 1 ml fractions were collected and screened for enzyme activity. Active fractions were pooled and concentrated by centrifugation prior to the final chromatographic step.

2.3.5. Gel filtration on Sephacryl S200 HR

PDE from the preceding step was applied to a column (1 cm x 30 cm) of Sephacryl S200 HR equilibrated with 0.05 Tris-HCl, pH 7.0, containing 0.2 M NaCl. The sample was eluted with the same buffer at a flow rate of 30 ml/h and the elution profile was monitored at 280 nm. One milliliter fractions were collected and screened for PDE activity. Active fractions were pooled, concentrated by centrifugation and stored at -20°C .

2.4. Enzyme assays

PDE activity was assayed as described by Bjork (1963), but modified for 96-well plates. The reaction mixture contained 100 μl of substrate (1 mM *bis*(*p*-nitrophenyl)-phosphate in 0.1 M glycine-NaOH buffer, pH 8.9), 75 μl of glycine-NaOH buffer, 25 μl of 30 mM MgSO_4 and 50 μl of venom or chromatographic fraction in a final reaction volume of 250 μl . After incubation at 37°C for the desired time, the reaction was terminated by adding 50 μl of 0.05 M NaOH and the resulting absorbance read at 400 nm using a SpectraMax 340 microplate reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA). In some cases, the original incubation volumes were used (final volume after stopping the reaction = 3 ml) and the absorbance of 300 μl of this solution then read in the microplate reader as above. In either case, one unit of activity corresponded to an increase of 1.0 A_{400}/min .

Alkaline phosphatase activity was assayed as described by Sulkowski *et al.* (1963) using glycine-NaOH buffer and *p*-nitrophenyl phosphate as substrate. 5'-Nucleotidase was assayed using 5'-AMP as substrate (Sinsheimer and Koerner, 1952) with the released phosphate being determined as described by Ames (1966). Proteolytic activity was assayed by the method of Kunitz (1947) using casein as substrate.

2.4. Protein concentrations

The protein content of the venom solutions and chromatographic fractions was determined at 280 nm, assuming that an absorbance of 1.0 at 280 nm = 1 mg/ml.

2.5. Electrophoresis

The purity of the enzyme obtained was checked by SDS-PAGE in 10% gels (Laemmli, 1970). Samples were prepared in 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. In some cases, β -mercaptoethanol (final concentration, 10%) was added to the samples. After electrophoresis at 100 V constant (Mighty Small SE260 apparatus, Hoefer-Pharmacia, San Francisco, CA, USA), the gels were silver stained and documented. Protein markers were run in parallel with the samples.

2.6. Immunological studies

Following electrophoresis as described above, proteins were transferred to nitrocellulose membranes (Towbin *et al.*, 1979) in a Mighty Small TE22 transfer chamber (Hoefer-Pharmacia). The efficiency of transfer was confirmed by staining the gel with silver and the membrane with

Ponceau S 0.2%. Molecular mass markers were included in the runs. After transfer, non-specific sites on the membranes were blocked overnight by incubating with phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.4) containing 5% non-fat milk and 0.05% Tween 20. Subsequent to six washes with PBS, the membranes were incubated with commercial bothropic antivenom diluted 1:1000 in PBS for 12 h at room temperature. Following a further six washes, the membranes were incubated with a rabbit anti-horse IgG-peroxidase conjugate diluted 1:1500 in PBS. At the end of 2 h, the membranes were washed and the immunoreactive bands were detected with a solution of 4-chloro-1-naphthol + H_2O_2 after incubation for 10-30 min at room temperature and then documented.

The cross-reactivity of commercial bothropic antiserum with PDE was examined by ELISA. Wells of microtiter plates were coated with 100 μ l of antiserum (diluted 1:1000 in 0.1 M ammonium carbonate, pH 8.9; coating buffer) overnight at 4°C. The wells were subsequently washed five times with PBS and various amounts of venom and PDE (in 100 μ l) then added followed by incubation for 1 h at room temperature. After further washes, the wells were incubated for 1 h at room temperature with 100 μ l of an equine anti-bothropic IgG-peroxidase conjugate prepared as described elsewhere (Catty and Raykundalia, 1989). The IgG was initially isolated from commercial bothropic antiserum by affinity chromatography on protein G-Sepharose as described by the manufacturer (Amersham-Pharmacia). Following a final series of washes, substrate solution (100 μ l of 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 μ l of 5% M H_2SO_4 and the final absorbance was read at 492 nm in a SpectraMax 340 plate reader.

2.7. Enzymatic properties

The K_m of the PDE was determined from a Lineweaver-Burk plot (Segel, 1975) obtained using a fixed amount of enzyme ($\sim 1 \mu\text{g}$) and varying amounts of substrate. The K_m was calculated using the GraphPad Prism software package, version 2.01 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA).

The pH optimum of the enzyme was determined by measuring the enzymatic activity in 0.05 M Hepes and Tris, and 0.1 M glycine buffer at different pH values using the standard assay described above. The heat stability of the PDE was examined initially by measuring the enzyme activity after a fixed period (30 min) at different temperatures in 0.1 M glycine-NaOH, pH 8.9. The time-dependent inactivation of the enzyme was subsequently studied at selected temperatures in this same buffer. In both of these assays, the activity was expressed as the increase in absorbance at 400 nm.

The influence of various metals, EDTA and β -mercaptoethanol on PDE activity was investigated by co-incubating enzyme in 0.1 M glycine-NaOH buffer, pH 8.9, with different concentrations (1, 10 and 100 mM) of these substances and assaying the residual activity.

3. RESULTS

3.1. Purification of PDE

Fractionation of *B. alternatus* venom by gel filtration on Superdex 75 resulted in four main peaks, the first of which contained PDE, 5'-nucleotidase and alkaline phosphatase activities (the latter two not shown in the figure) (Fig. 1A). The active fractions of peak I were pooled and chromatographed on a column of DEAE-Sephadex A25. All of the PDE activity eluted in the

unbound fraction of protein before the linear salt gradient (Fig. 1B). The active fractions were again pooled and chromatographed on Blue Sepharose® (Fig. 1C); this step was fundamental for removing 5'-nucleotidase activity which eluted in two peaks, one before the gradient and the other after the PDE. The active fractions containing PDE were pooled and chromatographed on SP-Sepharose, with PDE eluting as a single peak with the salt gradient. The active fractions were concentrated and chromatographed on Sephacryl S200 HR to yield pure enzyme. The specific activity of the purified enzyme was 148.8 units/mg (activity of venom = 0.21 units/mg; 709-fold purification) with a protein yield of 0.17%. The purified enzyme showed no contamination with alkaline phosphatase, 5'-nucleotidase or protease activities.

3.2. Molecular mass determination

SDS-PAGE of the purified enzyme yielded a single band following silver staining, and had an estimated molecular mass of 105 kDa (Fig. 2A). This result was not altered by treatment with β -mercaptoethanol (not shown), indicating that the enzyme was a single chain polypeptide.

3.3. Immunological characterization

Immunoblotting of *B. alternatus* PDE with commercial bothropic antiserum and subsequent detection with a rabbit anti-horse IgG-peroxidase conjugate gave a single immunoreactive band with a molecular mass equal to that of the native protein (Fig. 2B). Sandwich (direct) ELISA of the purified enzyme yielded an immunoreactivity which paralleled that of the venom, but with a shift to the right (Fig. 3).

3.4. Enzymatic properties

The K_m of *B. alternatus* PDE calculated from a Lineweaver-Burk plot was 2.69 mM (Fig. 4). In glycine-NaOH buffer, the pH optimum for PDE activity was 8.0, whereas in Hepes and Tris buffers maximum activity was obtained over the pH range 7.5-9.0. (Fig. 5A). Enzyme activity in the latter two buffers was slightly higher than in glycine-NaOH. The optimum temperature for PDE activity was 60°C, with activity decreasing at $\geq 65^\circ\text{C}$ (Fig. 5B). The loss of activity at elevated temperatures ($>70^\circ\text{C}$) occurred within 1 min (Fig. 5C). Although PDE retained activity for up to 72 h at 4°C, 25°C and 37°C in 0.1 M glycine-NaOH, pH 8.9, repeated freeze-thaw cycles lead to loss of enzyme activity (data not shown).

Figure 6 shows that cobalt stimulated the activity of PDE; a high concentration of calcium (100 mM) and a low concentration of zinc (1 mM) also stimulated the enzyme, but to a much lesser extent than did cobalt. Copper, manganese, and concentrations of zinc ≥ 10 mM were inhibitory. Sodium sulfate and magnesium chloride had little effect on enzyme activity whereas magnesium sulfate produced about 40% inhibition at the highest concentration (100 mM). EDTA inhibited PDE activity by $\geq 90\%$; β -mercaptoethanol was also inhibitory, but to a lesser extent.

4. DISCUSSION

Snake venom PDE has been isolated from numerous species, including *Agkistrodon acutus* (Sugihara *et al.*, 1984), *Agkistrodon halys blomhoffii* (Tatsuki *et al.*, 1975), *Agkistrodon piscivorus* (Butler, 1956), *Bothrops atrox* (Bjork, 1963; Frischauf and Eckstein, 1973; Philipps, 1979), *Cerastes cerastes* (Halim *et al.*, 1987), *Crotalus atrox* (Oka *et al.*, 1978), *Crotalus adamanteus* (Sinsheimer and Koerner, 1952; Privat de Garilhe and Laskowski, 1955; Razzell and Khorana, 1959; Razzell, 1963; Richards *et al.*, 1967; Tatsuki *et al.*, 1975; Philipps, 1975; Oka *et*

al., 1978; Laskowski, 1980), *Crotalus durissus terrificus* (Philipps, 1975) *Crotalus ruber ruber* (Mori *et al.*, 1987), *Trimeresurus flavoviridis* (Kini and Gowda, 1984), *Trimeresurus mucroquamatus* (Sugihara *et al.*, 1986), *Vipera aspis* (Ballario *et al.*, 1977) and *Vipera palestinae* (Levy and Bdolah, 1976). However, the purity of PDE obtained by the methods described in the above reports varied considerably, especially in early attempts at purification, mainly because of the difficulty in removing contaminating alkaline phosphatase (EC 3.1.3.1) and 5'-nucleotidase (EC 3.1.3.5) activities. The purification protocol described here apparently provided PDE free of these contaminants as shown by the single protein following SDS-PAGE and immunoblotting, and by the absence of 5'-nucleotidase and alkaline phosphatase in the enzyme preparation. The yield of protein (0.17%) was within the range (0.04%-0.53%) reported for many other venom PDE purified by a variety of procedures (Felix *et al.*, 1960; Williams *et al.*, 1961; Björk, 1963; Frischauf and Eckstein, 1973; Dolapchiev *et al.*, 1974; Philipps, 1976; Laskowski, 1980; Sugihara *et al.*, 1986; Mori *et al.*, 1987). The high protein yields reported with some protocols (Ehrlich *et al.*, 1971; Kini and Gowda, 1984; Halim *et al.*, 1987) probably reflect peculiarities of the venoms in question.

PDE are generally high molecular mass (>90 kDa) glycoproteins consisting of a single polypeptide chain with isoelectric points between 7.5 and 10.5 (Philipps, 1975, 1976; Laskowski, 1980; Kini and Gowda, 1984; Sugihara *et al.*, 1986; Mori *et al.*, 1987). The molecular mass of *B. alternatus* PDE (105 kDa) thus agrees with that of other PDE; the lack of effect of β -mercaptoethanol on the molecular mass indicates that the protein is a single chain polypeptide, as is generally the case for venom PDE. An exception to this rule appears to be the PDE from *Crotalus ruber ruber* venom which exists as a homodimer with subunits of 49 kDa (Mori *et al.*, 1987). Throughout the purification protocol and in SDS-PAGE, only one peak of activity and one

protein band were obtained for *B. alternatus* PDE, indicating that this enzyme probably does not occur in isoforms, unlike those of *T. flavoviridis* (Kini and Gowda, 1984) and *Vipera palestinae* (Levy and Bdolah, 1976).

The pH optimum of *B. alternatus* PDE was similar to other venom PDE (pH 8-9.8; Razzell and Khorana, 1959; Björk, 1963; Philipps, 1976; Halim *et al.*, 1987), but varied with the buffer, being broader with Hepes and Tris than with glycine-NaOH. An influence of buffer type on the pH optimum has also been reported for PDE from *C. adamanteus* venom (Privat de Garilhe and Laskowski, 1955). In this case, whereas the pH optimum in glycine-NaOH buffer was 8, the pH optimum in borate buffer covered a broader range (7-8.5) and enzyme activity was also lower in borate buffer than in Tris-NaOH.

The temperature optimum of PDE is between 55-60°C, and many of these enzymes rapidly lose activity (within 1-4 min) at temperatures >65-70°C (Björk, 1963; Philipps, 1975, 1976; Sugihara *et al.*, 1986; Halim *et al.*, 1987; Mori *et al.*, 1987); both of these characteristics were also confirmed here for *B. alternatus* PDE.

The K_m of *B. alternatus* PDE (2.69 mM) was lower than that of 4.33 mM for *C. cerastes* PDE using the same substrate and also less than the 5.6 mM for *T. mucrosquamatus* (Sugihara *et al.*, 1986) and 8.3 mM for *C. r. ruber* (Mori *et al.*, 1987), the latter two values being obtained with *p*-nitrophenyl thymidine-5'-phosphate as substrate.

B. alternatus PDE was inhibited by EDTA, a finding which agrees with observations that metal chelators such as EDTA, EGTA and *o*-phenanthroline generally inhibit PDE activity (Razzell and Khorana, 1959; Philipps, 1976; Kini and Gowda, 1984; Sugihara *et al.*, 1986; Halim *et al.*, 1987; Mori *et al.*, 1987), and indicates that these proteins are metalloenzymes. In the case of *C. r. ruber* (Mori *et al.*, 1987) venom PDE, the metal involved is zinc whereas calcium,

magnesium and zinc have been found in *C. adamanteus* PDE (Dolapchiev *et al.*, 1980). The latter authors proposed that zinc was necessary for catalysis whereas calcium and magnesium were involved in substrate binding. Curiously, zinc also inhibits PDE activity (Sugihara *et al.*, 1986; Mori *et al.*, 1987), and this was clearly seen for the *B. alternatus* enzyme. The influence of other ions on the activity of *B. alternatus* PDE generally agreed with that for venom PDE. Whilst Mg^{2+} has been reported to stimulate venom PDE (Philipps, 1975, 1976; Halim *et al.*, 1987), this effect is not consistent (Razzell and Khorana, 1959) and, as shown here, the *B. alternatus* enzyme was not dependent on Mg^{2+} (indeed, when tested as Mg_2SO_4 , Mg^{2+} was inhibitory at high concentrations). Copper inhibits *C. adamanteus* PDE (Razzell and Khorana, 1959) and this was also the case for *B. alternatus* PDE.

Although numerous PDE have been isolated from venoms, very little is known of their immunological properties. Levy and Bdolah (1976) used rabbits to produce antiserum to PDE purified from *V. palestinae* venom and Sugihara *et al.* (1986) used commercial polyvalent antivenom to *T. gramineus* and *T. mucrosquamatus* venoms to assess the purity of *T. mucrosquamatus* PDE by immunodiffusion. However, there are still no comparative immunological studies of venom PDE. As shown here, commercial bothropic antivenom reacted with *B. alternatus* PDE both in immunoblotting and in ELISA, indicating that the enzyme is immunogenic and that antivenom may neutralize the activity of the enzyme *in vivo*.

In conclusion, the properties of *B. alternatus* PDE isolated in this work were similar to those of other snake venom PDE. The purification protocol described here should prove useful in providing pure protein for investigations into the contribution of this enzyme to the biological activities of *B. alternatus* venom, and of venom PDE in general (Aird, 2002).

ACKNOWLEDGMENTS

This work was partly supported by the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP). A.A.V. and P.C.P. were the recipients of studentships from the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). The authors thank José Ilton dos Santos for technical assistance.

REFERENCES

- Aird, S. (2002). *Toxicon* **40**, 335-393.
- Ames, B. (1966). *Meth. Enzymol.* **8**, 115-118.
- Bailey, G. (ed.) (1998). *Enzymes from Snake Venom*. Alaken Press, Inc., Fort Collins.
- Ballario, P., Bergami, M. and Pedone, F. (1977). *Anal. Biochem.* **80**, 646-651.
- Bauab, F. A., Junqueira, G. R., Corradini, M. C., Silveira, P. V., and Nishioka, A. S. (1994). *Trop. Med. Parasitol.* **45**, 243-245.
- Björk, W. (1963). *J. Biol. Chem.* **238**, 2487-2490.
- Butler, G. C. (1956). *Meth. Enzymol.* **3**, 561-565.
- Campbell, J. A. and Lamar, W. W. (1989). *The Venomous Reptiles of Latin America*. Comstock Publishing Associates/Cornell University Press, Ithaca.
- Castro, H. C., Dutra, D. L., Oliveira-Carvalho, A. L., and Zingali, R. B. (1998). *Toxicon* **36**, 1903-1912.
- Catty, D. and Raykundalia, C. (1989). In *Antibodies – a Practical Approach*. Vol. II. (Catty, D., ed.). IRL Press, Oxford, pp. 97-154.
- Dolapchiev, L. B., Sulkowski, E. and Laskowski Sr, M. (1974). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **61**, 273-281.
- Dolapchiev, L. B., Vassileva, R. A. and Koumanov, K. S. (1980). *Biochim. Biophys. Acta* **622**, 331-336.
- Ehrlich, S. D., Torti, G. and Bernardi, G. (1971). *Biochemistry* **10**, 2000-2009.

- Ehrlich, S. D., Torti, G. and Bernardi, G. (1971). *Biochemistry* **10**, 2000-2009.
- Elliott, W. B. (1978). In *Biology of the Reptilia. Vol. 8. Physiology B.* (Gans, C. and Gans, K.A., eds.). Academic Press, London, pp. 163-436.
- Felix, F., Potter, J. L. and Laskowski, M. (1960). *J. Biol. Chem.* **235**, 1150-1154.
- Frischauf, A.-M. and Eckstein, F. (1973). *Eur. J. Biochem.* **32**, 479-485.
- Halim, H. Y., Shaban, E. A., Hagag, M. M., Daoud, E. W. and El-Asmar, M. F. (1987). *Toxicon* **25**, 1199-1207.
- Iwanaga, S. and Suzuki, T. (1979). In *Snake Venoms. Handbook of Experimental Pharmacology.* Vol. 52. (Lee, C. Y., ed.). Springer Verlag, Berlin, pp. 61-158.
- Kini, R. M. and Gowda, T. V. (1984). *J. Chromatogr.* **291**, 299-305.
- Kunitz, M. (1947). *J. Gen. Physiol.* **32**, 291-310.
- Laemmli, U. K. (1970). *Nature* **227**, 680-685.
- Laskowski Sr., M. (1980). *Meth. Enzymol.* **65**, 276-284.
- Levy, Z. and Bdolah, A. (1976). *Toxicon* **14**, 389-391.
- Mackessy, S. P. (1998). In *Enzymes from Snake Venom* (Bailey, G. S., ed.), Alaken Press, Inc., Fort Collins, pp.361-404.
- Mori, N., Nikai, T. and Sugihara, H. (1987). *Int. J. Biochem.* **19**, 115-119.
- Nisenbom, H. E., Perazzo, J. C., Monserrat, A. J. and Vidal, J. C. (1986a). *Toxicon* **24**, 807-817.
- Nisenbom, H. E., Perazzo, J. C., Monserrat, A. J. and Vidal, J. C. (1988). *Toxicon* **26**, 1137-1144.
- Nisenbom, H. E., Seki, C., and Vidal, J. C. (1986b). *Toxicon* **24**, 259-272.
- Oka, J., Ueda, K. and Hayaishi, O. (1978). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **80**, 841-848.
- Philipps, G. R. (1975). *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **356**, 1085-1096.
- Philipps, G. T. (1976). *Biochim. Biophys. Acta* **432**, 237-244.
- Privat de Garilhe, M. and Laskowski, M. (1955). *Biochim. Biophys. Acta* **18**, 370-378.
- Razzell, W. E. (1963). *Meth. Enzymol.* **6**, 236-258.

- Razzell, W. E. and Khorana, H. G. (1959). *J. Biol. Chem.* **234**, 2105-2113.
- Richards, G. M., Tutas, D. J., Wechter, W. J. and Laskowski Sr., M. (1967). *Biochemistry* **6**, 2908-2914.
- Segel, I. (1975). *Biochemical Calculations*. 2nd ed. John Wiley & Sons, New York.
- Sinsheimer, L. and Koerner, J. F. (1952). *J. Biol. Chem.* **198**, 293-296.
- Smolka, M. B., Marangoni, S., Oliveira, B. and Novello, J. C. (1998). *Toxicon* **36**, 1059-1063.
- Souza, D. H., Iemma, M. R., Ferreira, L. L., Faria, J. P., Oliva, M. L., Zingali, R. B., Niewiarowski, S. and Selistre de Araujo, H. S. (2000). *Arch. Biochem. Biophys.* **382**, 341-350.
- Sugihara, H., Nikai, T., Komori, Y., Katada, H., Mori, N. and Kishida, M. (1984). *Jpn. J. Trop. Med. Hyg.* **12**, 247-254.
- Sugihara, H., Nikai, T., Naruse, M., Kishida, M. and Mori, N. (1986). *Int. J. Biochem.* **18**, 203-207.
- Sulkowski, E., Björk, W. and Laskowski Sr., M. (1963). *J. Biol. Chem.* **238**, 2477-2486.
- Tan, N. H., Armugam, A. and Tan, C. S. (1989). *Comp. Biochem. Physiol.* **93B**, 757-765.
- Tan, N. H. and Ponnudurai, G. (1990a). *Comp. Biochem. Physiol.* **95C**, 105-109.
- Tan, N. H. and Ponnudurai, G. (1990b). *Comp. Biochem. Physiol.* **95B**, 577-582.
- Tan, N. H. and Ponnudurai, G. (1990c). *Comp. Biochem. Physiol.* **96B**, 683-688.
- Tan, N. H. and Ponnudurai, G. (1990d). *Comp. Biochem. Physiol.* **97C**, 99-106.
- Tan, N. H. and Ponnudurai, G. (1991a). *Comp. Biochem. Physiol.* **99B**, 351-354.
- Tan, N. H. and Ponnudurai, G. (1991b). *Comp. Biochem. Physiol.* **99C**, 455-461.
- Tan, N. H. and Ponnudurai, G. (1991c). *Comp. Biochem. Physiol.* **99C**, 463-466.
- Tan, N. H. and Ponnudurai, G. (1991d). *Comp. Biochem. Physiol.* **100B**, 361-365.
- Tan, N. H. and Tan, C. S. (1988). *Comp. Biochem. Physiol.* **90B**, 745-750.
- Tatsuki, T., Iwanaga, S. and Suzuki, T. (1975). *J. Biochem. (Tokyo)* **77**, 831-836.

Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J. (1979). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**, 4350-4354.

Williams, E. J., Sung, S.-C. and Laskowski Sr., M. (1961). *J. Biol. Chem.* **236**, 1130-1134.

Figure legends

Figure 1. Purification of PDE from *B. alternatus* venom.

(A) Gel filtration of *B. alternatus* venom on a column of Superdex 75 (1.6 cm x 70 cm). The venom (100 mg) was prepared and applied to the column as described in Methods. The column was eluted at a flow rate of 30 ml/h and the elution profile was monitored at 280 nm. Fractions of 2 ml were collected and assayed for PDE activity. The active fractions were pooled and applied to a column (1.6 cm x 10 cm) of DEAE-Sephadex A25 (B) equilibrated with 0.05 M Tris-HCl, pH 7.0; proteins were eluted with a linear salt gradient. The active fractions were pooled and applied to a 5 ml column of Blue Sepharose® (C) equilibrated with 0.05 M Tris-HCl, pH 7.0; proteins were eluted with a linear salt gradient. The active fractions were pooled, dialyzed against Tris buffer without salt and applied to a 5 ml column of SP-Sepharose (D) equilibrated with 0.05 M Tris-HCl, pH 7.0; proteins were eluted with a linear salt gradient. The active fractions were pooled, concentrated and applied to a column (1 cm x 30 cm) of Sephacryl S200 HR (E) equilibrated with 0.05 M Tris-HCl, pH 7.0, containing 0.2 M NaCl; the column was eluted with this same buffer. Active fractions were pooled and stored at -20°C. Note that in (B-D), the linear salt gradient is indicated by the dashed line; 1 M NaCl reached at the intersection with the right vertical axis.

Figure 2. Electrophoretic profile of venom and purified PDE

(A) and reactivity of the enzyme with commercial bothropic antivenom assessed by immunoblotting (B). Venom (V, 50 µg) and PDE (10.6 µg) were run on 10% gels at 100 V and the gels then either silver stained (A) or the proteins transferred to nitrocellulose membranes for

immunoblotting with bothropic antivenom (B), as described in Methods. The molecular mass markers (kDa) are indicated in (A). Note that in (B), the PDE migrated at the same position as a recombinant protein (105 kDa) (not shown).

Figure 3. Immunoreactivity of commercial bothropic antivenom with PDE of *B. alternatus* venom.

The wells were coated with bothropic antiserum followed by incubation with venom or PDE and then with an anti-bothropic IgG-peroxidase conjugate. The absorbance at 492 nm was determined after incubating with substrate and stopping the reaction with H₂SO₄. For further details, see Methods.

Figure 4. Lineweaver-Burk plot for *B. alternatus* PDE.

The points represent the mean $\pm$ SEM of 4-5 determinations, each in duplicate.

Figure 5. pH (A) and temperature (B) optima and heat stability (C) of *B. alternatus* PDE.

The effects of pH and temperature on enzyme activity were determined as described in Methods.

The points represent the mean $\pm$ SEM of 4-5 determinations, each in duplicate.

Figure 6. Influence of metals, EDTA and β -mercaptoethanol on PDE activity.

The different compounds were included in the standard enzyme assay (see Methods) to give the final concentrations indicated. The points represent the mean $\pm$ SEM of 4-5 determinations, each in duplicate.

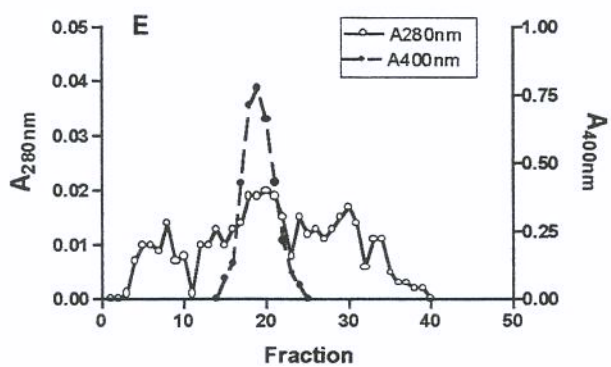
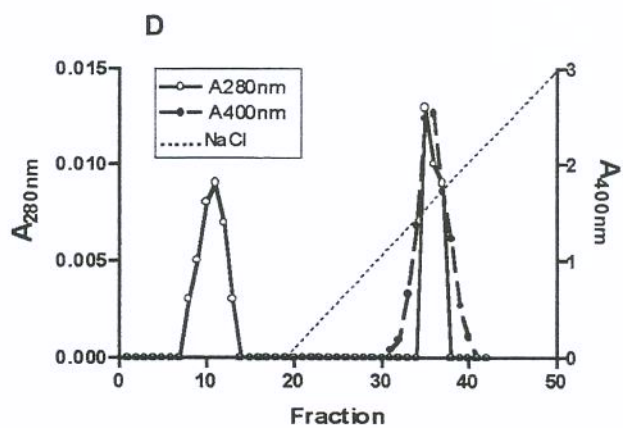
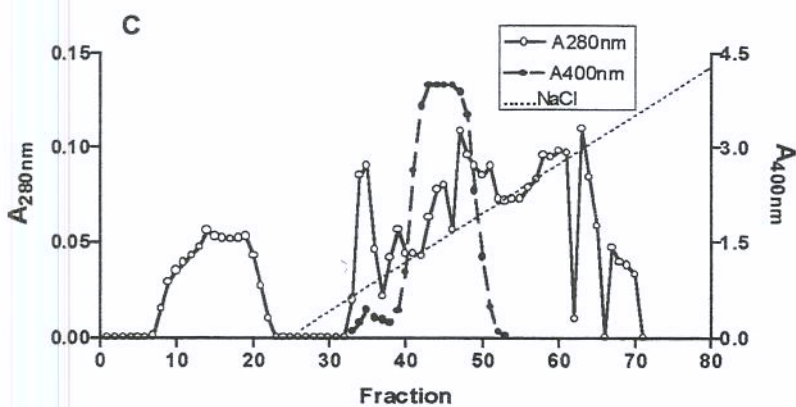
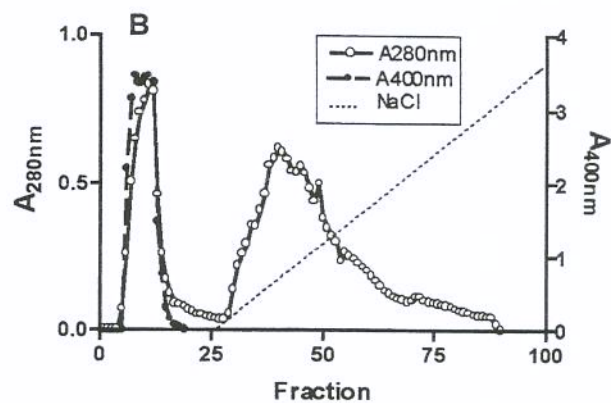
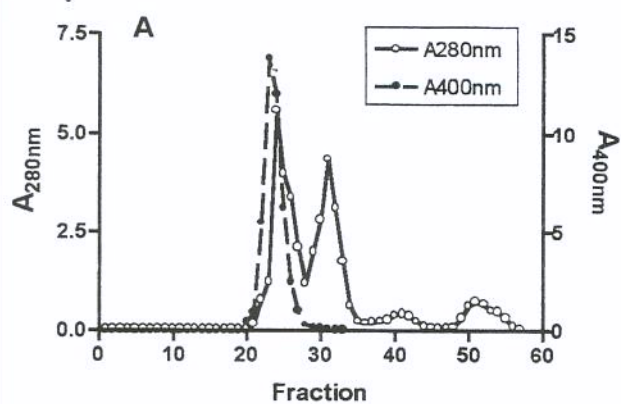
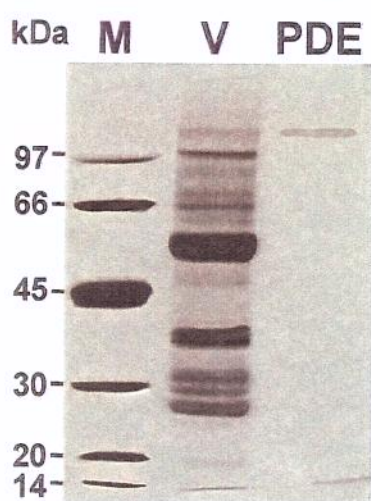


Figure 1

A



B

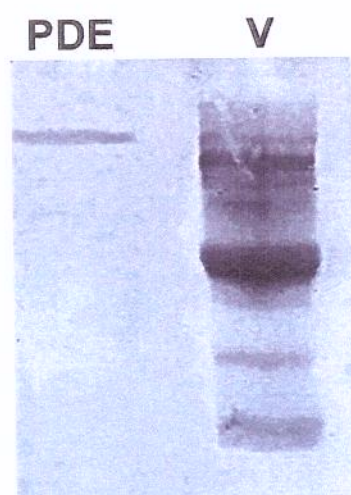


Figure 2

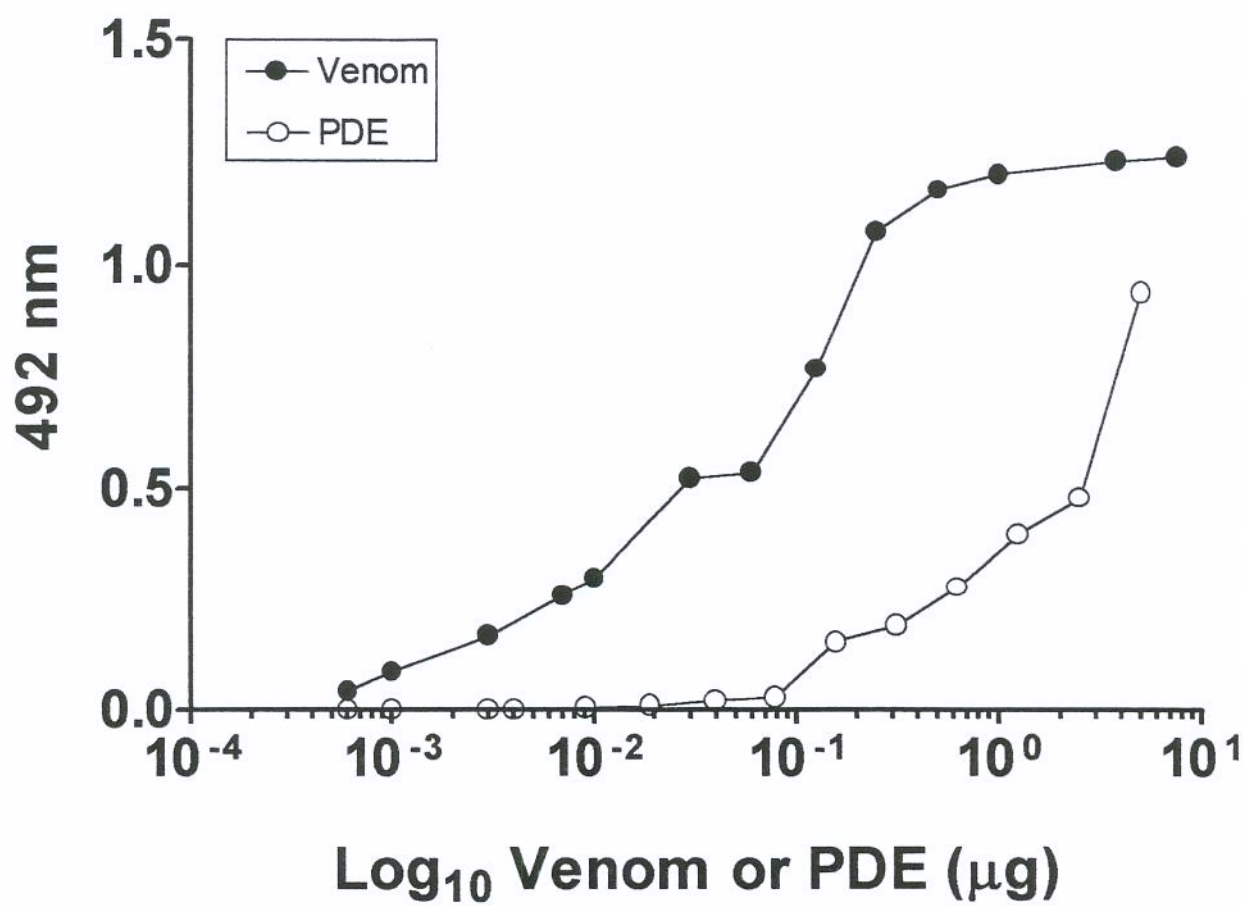


Figure 3

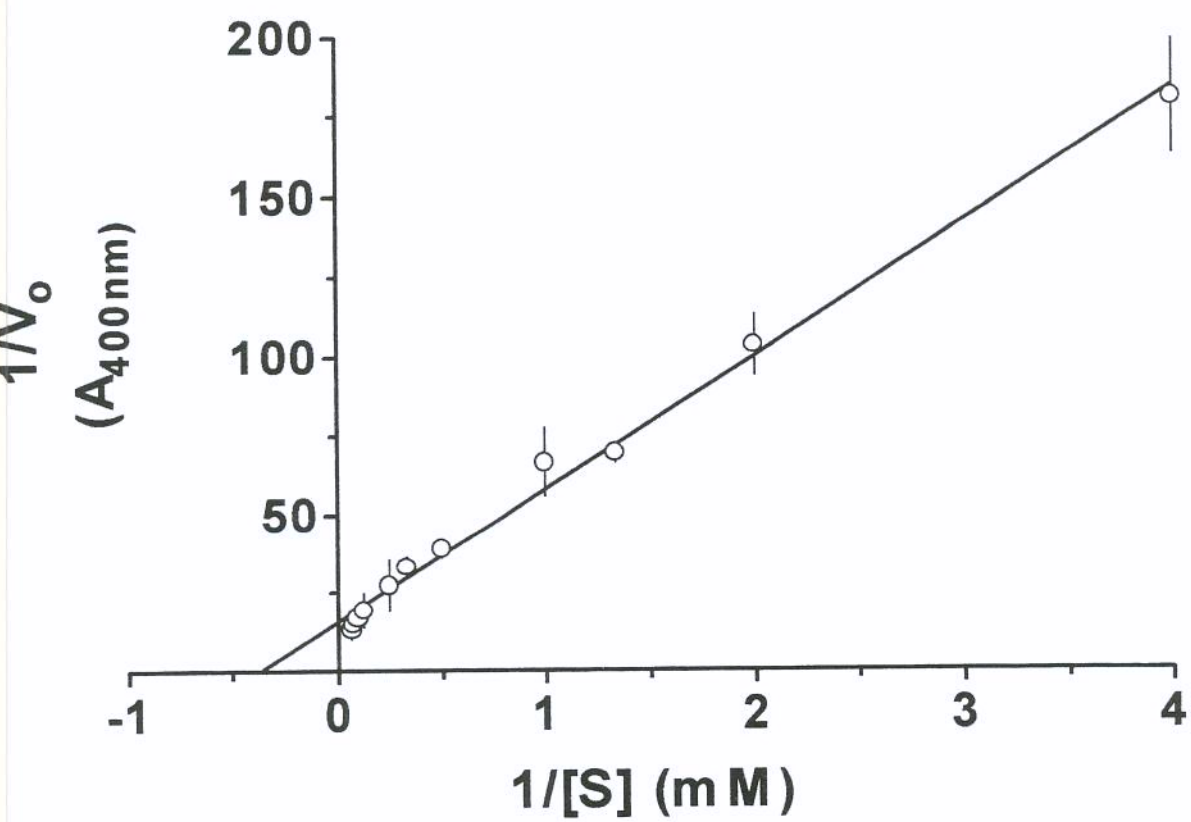


Figure 4

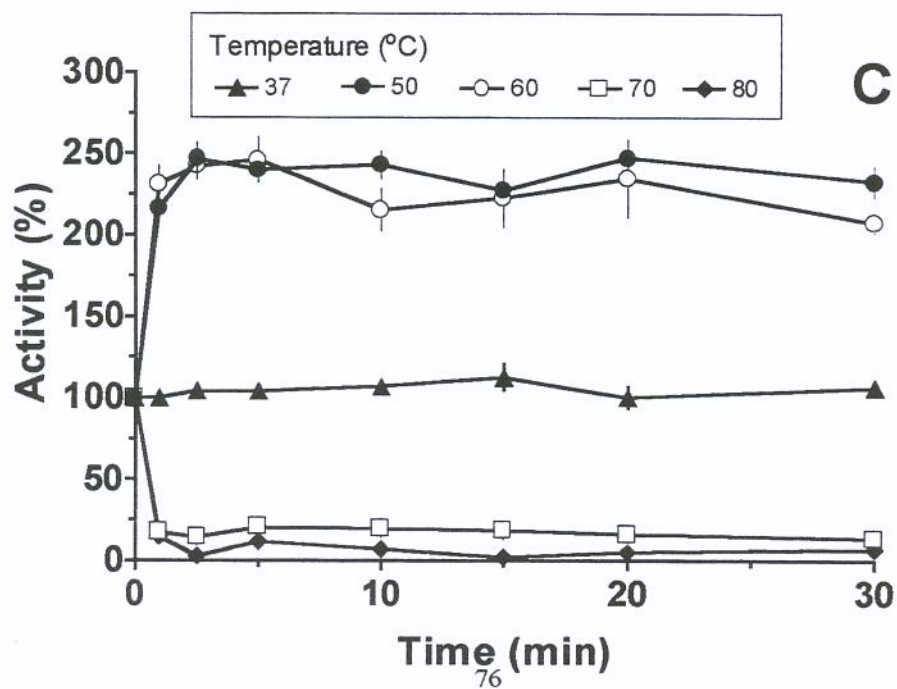
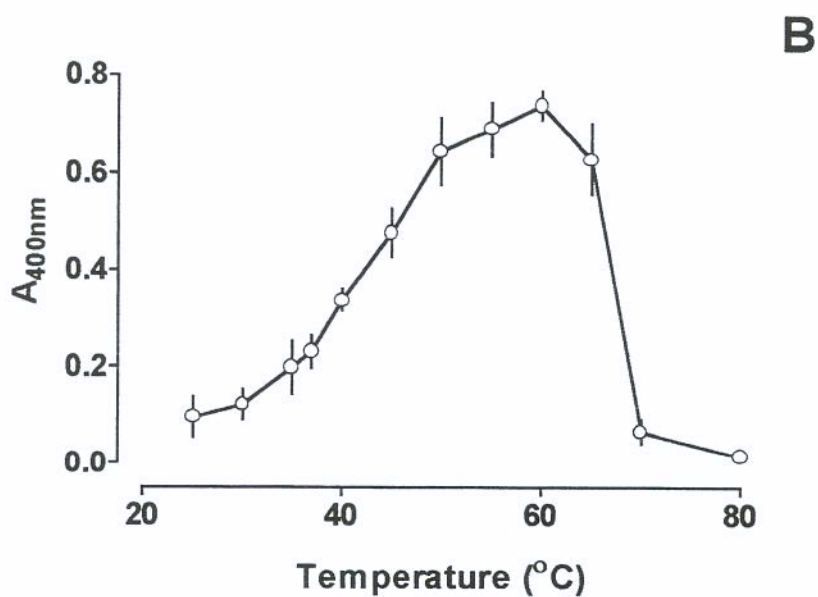
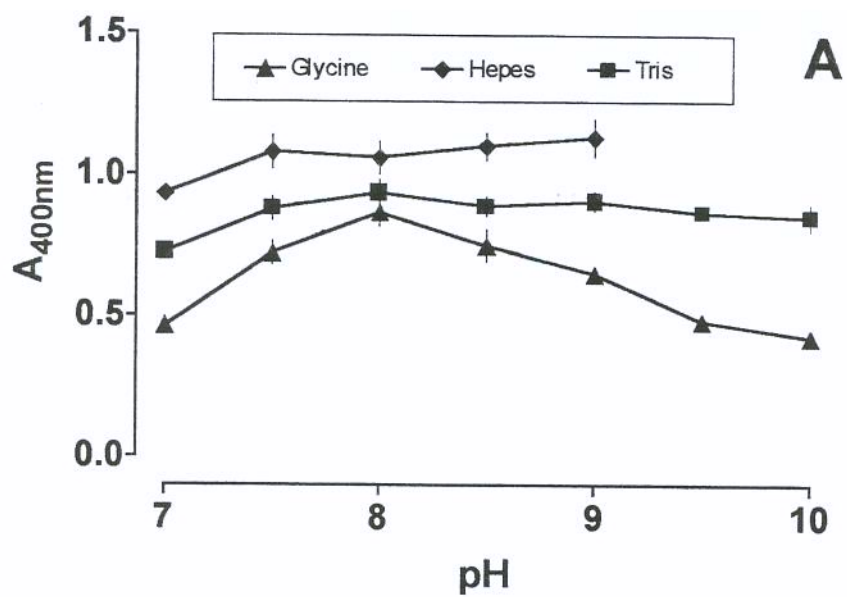


Fig. 5

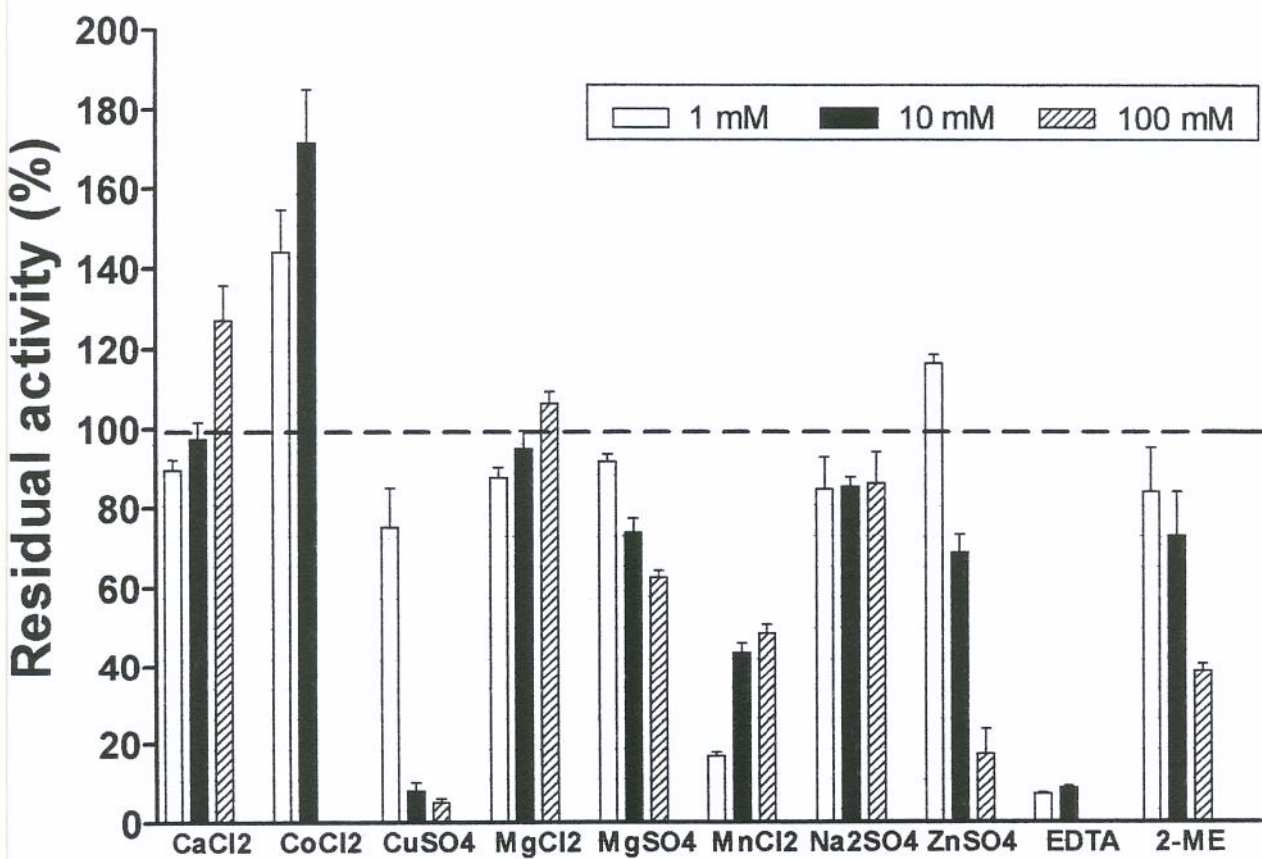


Figure 6

4. CONCLUSÕES

4. CONCLUSÕES

Fosfodiesterases têm sido isoladas da peçonha de várias espécies de serpentes, incluindo *Agkistrodon acutus* (SUGIHARA *et al.*, 1986), *Agkistrodon halys blomhoffii* (TATSUKI *et al.*, 1975), *Agkistrodon piscivorus* (BUTLER, 1956), *Bothrops atrox* (BJÖRK, 1963; FRISCHAUF & ECKSTEIN, 1973; PHILIPPS, 1976), *Cerastes cerastes* (HALIM *et al.*, 1987), *Crotalus atrox* (OKA *et al.*, 1978), *Crotalus adamanteus* (SINSHEIMER & KOERNER, 1952; PRIVAT de GARILHE & LASKOWSKI, 1955; RAZZELL & KHORANA, 1959; RAZZELL, 1963; RICHARDS *et al.*, 1967; TATSUKI *et al.*, 1975; PHILIPPS, 1975; OKA *et al.*, 1978; LASKOWSKI, 1980), *Crotalus durissus terrificus* (PHILIPPS, 1975) *Crotalus ruber ruber* (MORI *et al.*, 1987), *Trimeresurus flavoviridis* (KINI & GOWDA, 1984), *Trimeresurus mucroquamatus* (SUGIHARA *et al.*, 1986), *Vipera aspis* (BALLARIO *et al.*, 1977) e *Vipera palestinae* (LEVY & BDOLAH, 1976), porém apenas algumas destas já foram caracterizadas em detalhes, principalmente a PDE de *C. adamanteus*.

A Tabela 1 resume as propriedades físico-químicas de algumas destas enzimas, comparando-se com a PDE de *B. alternatus*. Conforme pode-se ver, as características destas enzimas (peso molecular alto, pH ótimo alcalino, temperatura ótima entre 50° C e 60° C, perfil de inibição, etc.) se assemelham bastante entre si

Tabela 1. Propriedades físico-químicas de PDE de peçonhas ofídicas.

Espécie	Rend. prot. (%)	Massa mol. (kDa)	Subunid.	pI	CHO	pH ótimo	Temp. ótima (°C)	K _m (mM)	Inibidores	Ref.
<i>Bothrops alternatus</i>	0,17	105	Não	---	---	8-9	60	2,64 ^b	Cobre, zinco, EDTA, β-ME, EDTA	Este trabalho
<i>Bothrops atrox</i>	0,03-50,14	~130	Não	---	---	9,2	45-55 ^a	---	Cisteína, DTT	2, 4, 5, 12, 18
<i>Cerastes cerastes</i>	1,67	110	Não	---	Não	9	56	4,33 ^b	glutathiona, β-ME, ADP, AMP, EDTA	6
<i>Crotalus adamanteus</i>	0,08-0,17	115-140	Não	---	Sim	8-9,8	45-50	0,12-12 ^d	---	3, 7, 8, 11, 13-16
<i>Crotalus ruber ruber</i>	0,48	98	2 x 49 kDa	10,5	Sim	---	---	8,3 ^c	Cádmio, cisteína, DTT, EDTA, EGTA, PCMB, zinco	9
<i>Trimeresurus mucrosquamatus</i>	0,53	140	---	7,94	Não	---	---	5,6 ^c	Cádmio, cisteína, EDTA, EGTA, o-fenantrolina, PCMB, zinco	17
<i>Vipera aspis</i>	5	150	---	---	---	---	---	0,03 ^c	---	1

^aTemperatura ótima durante os primeiros 5 min da reação, mas depois de 20 min, caiu para 35°C. CHO, carboidrato; DTT, ditioneitol; β-ME, β-mercaptoetanol; PCMB, ácido p-cloromercuribenzoico; --, não determinado.

^bCom bis(p-nitrofenil)fosfato como substrato. ^cCom p-nitrofenil timidina-5'-fosfato como substrato, ^dcom diversos substratos.

Referências: 1. BALLARIO *et al.* (1977). 2. BJÖRK (1963). 3. DOLAPACHIEV *et al.* (1980). 4. FELIX, POTTER & LASKOWSKI (1960). 5. FRISCHAUF & ECKSTEIN (1973). 6. HALIM *et al.* (1987). 7. LASKOWSKI (1955). 8. LASKOWSKI (1980). 9. MORI *et al.* (1987). 10. PHILIPPS (1974). 11. PHILIPPS (1975). 12. PHILIPPS (1976). 13. PRIVATE DE GARILHE & LASKOWSKI (1959). 14. RAZZELL (1963). 15. RAZZELL & KHORANA (1959). 16. RICHARDS *et al.* (1967). 17. SUGIHARA *et al.* (1986). 18. WILLIAMS *et al.* (1961).

Embora o pH ótimo (8,0-9,0) das PDE esteja numa faixa acima da fisiológica, conforme mostrado aqui e também por outros, ainda há atividade enzimática na faixa de pH 7-7.5, o que garantiria uma atuação da enzima após a inoculação da peçonha.

Apesar da atividade destas enzimas ter sido bastante estudada *in vitro*, pouco se sabe da sua atuação *in vivo*, e da sua contribuição real nos efeitos no envenenamento. A hipótese de Eller (1977) e de AIRD (2002) sobre a participação de PDE na liberação de purinas endógenas e a contribuição destas ao envenenamento (Figura 2) ainda precisa ser confirmada.

A caracterização imunogênica das PDE não tem acompanhado a caracterização bioquímica, de modo que pouco se sabe da imunologia da molécula destas enzimas. O alto peso molecular das PDE e sua natureza glicoprotéica indicam que elas devem ser bastante antigênicas/imunogênicas. De fato, conforme demonstrado aqui, o anti-soro botrópico foi capaz de reconhecer a PDE de *B. alternatus* no ELISA e "immunoblot". SUGIHARA *et.al.* (1986) também observaram, através da imunodifusão, que a PDE de *T. mucrosquamantus* foi reconhecida por um anti-soro comercial produzido contra peçonha *T. mucrosquamantus* e *T. gramineus*.

Resta saber se este reconhecimento imunológico traduz em uma neutralização eficaz das atividades biológicas da enzima *in vivo*.

Em conclusão, os resultados deste estudo demonstraram a semelhança da PDE de *B. alternatus* a outras PDE ofídicas. O protocolo de purificação

apresentado poderá fornecer enzima suficiente para estudos *in vivo*, e também para determinação da composição de aminoácidos e seqüenciamento.

Neste contexto vale ressaltar que a composição de aminoácidos é conhecida para apenas três PDE ofídicas [*C. adamanteus* (DOLAPCHIEV *et.al.*, 1980), *C. r. ruber* (MORI *et al.*, 1987), *T. mucrosquamantus* (SUGIHARA *et al.*, 1986)], enquanto que para nenhuma é conhecida a seqüência parcial ou completa de aminoácidos.

5. SUMMARY

5. SUMMARY

A phosphodiesterase was purified from the venom of the snake *Bothrops alternatus* by a combination of gel filtration and ion exchange chromatographies. In SDS-PAGE, the enzyme gave a single band with a molecular mass of 105 kDa which was unaltered in the presence of β -mercaptoethanol, indicating that the protein contained no subunits. There were no contaminating 5'-nucleotidase, alkaline phosphatase and protease activities. The enzyme was recognized by commercial bothropic antiserum and gave a single band in immunoblotting. The enzyme had a pH optimum in the range of 7.5-9.5 and the optimum temperature was 60°C, with activity being rapidly lost within 1 min at $\geq 70^\circ\text{C}$. The K_m of the enzyme was 2.69 mM. PDE activity was potentiated by cobalt and, to a lesser extent, by calcium, whereas copper, manganese, zinc, EDTA and β -mercaptoethanol were inhibitory. These properties show that this enzyme is very similar to that isolated from other snake venoms.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AIRD, S. - Ophidian envenomation strategies and the role of purines. **Toxicon**, **40**: 335-93, 2002.
- ANDRIÃO-ESCARSO, S.H.; SOARES, A.M.; RODRIGUES, V.M.; ÂNGULO Y DIAZ, C.; LOMONTE, B.; GUTIÉRREZ, J.M.; GIGLIO, J.R. - Myotoxic phospholipases A₂ in *Bothrops* snake venoms: effect of chemical modification on the enzymatic and pharmacological properties of bothropstoxins from *Bothrops jararacussu*. **Biochimie**, **82**: 755-63, 2000.
- ANTUNES, E.; RODRIGUES-SIMIONI, L.; PRADO-FRANCESCHI, J. - Cross-neutralization on the histamine-releasing activity of snake venoms. **Acta Physiol Pharmacol Latinoam**, **39**: 431- 38, 1989.
- BAILEY, G.S. - Phosphodiesterases, ribonucleases and deoxyribonuclease. In: (Bailey, G.S., ed.) **Enzymes from Snake Venom**. Fort Collins , Alaken Press, Inc, 1998. pp. 361-404. Vol. 8
- BALLARIO, P.; BERGAMI, M.; PEDONE, F. - A simple method for the purification of phosphodiesterase from *Vipera aspis* venom. **Anal Biochem** **80**: 646-51, 1977.
- BAUAB, F.A.; JUNQUEIRA, G.R.; CORRADINI, M.C.; SILVEIRA, P.V.; NISHIOKA, A.S. - Clinical and epidemiological aspects of the 'urutu' lance-headed viper (*Bothrops alternatus*) bite in a Brazilian hospital. **Trop Med Parasitol**, **45**: 243-45, 1994.
- BIEBER, A. - Metal and nonprotein constituents in snake venom. In: (LEE, C.Y ed) **Snake Venoms. Handbook of Experimental Pharmacology**, Berlin, Springer Verlag, , 1979 pp. 295-306. Vol. 52.
- BJÖRK, W. - Purification of phosphodiesterase from *Bothrops atrox* venom, with special consideration of the elimination of monophosphatases. **J Biol Chem**, **238**: 2487-90, 1963.
- BOMAN, H.G. & KALETTA, U. - Chromatography of rattlesnake venom and separation of three phosphodiesterases. **Biochim Biophys Acta**, **24**: 619-631, 1957.
- BUTLER, G.C. - Phosphodiesterase from snake venom. **Meth Enzymol**, **2**: 561-5, 1956.
- CAMPBELL, J.A. & LAMAR, W.W. - **The Venomous Reptiles of Latin America**. Ithaca, NY; Comstock Publishing Associates/Cornell University Press., 1989.

- CASTRO, H.C.; DUTRA, D.L.; OLIVEIRA-CARVALHO, A.L.; ZINGALI, R.B. - Bothroaltermnin, a thrombin inhibitor from the venom of *Bothrops alternatus*. **Toxicon**, **36**: 1903-12, 1998.
- COHN, W.E. & VOLKIN, E. - On the structure of ribonucleic acids. I. Degradation with snake venom diesterase and the isolation of pyrimidine diphosphates. **J Biol Chem**, **203**: 319-32, 1953.
- CULP, J.S. & BUTLER, L.G. - Phosphorylated threonine as the covalent intermediate in snake venom phosphodiesterase. **Arch Biochem Biophys**, **246**: 245-9, 1986.
- DE ROODT, A.R.; DOLAB, J.A.; DOKMETJIAN, J.C.; LITWIN, S.; SEGRE, L.; VIDAL, J.C. - A comparison of different methods to assess the hemorrhagic activity of *Bothrops* venoms. **Toxicon**, **38**: 865-73, 2000.
- DE ROODT, A.R.; DOLAB, J.A.; FERNÁNDEZ, T.; SEGRE, L.; HAJOS, S.E. - Cross reactivity and heterologous neutralization of crotaline antivenoms used in Argentina. **Toxicon**, **36**: 1025-38, 1998a.
- DE ROODT, A.R.; DOLAB, J.A.; GALARCE, P.P.; LITWIN, S.; GOULD, E.; DOKMETJIAN, J.C.; SEGRE, L.; VIDAL, J.C. - A study on the venom yield of venomous snake species from Argentina. **Toxicon**, **36**: 1949-57, 1998b.
- DE ROODT, A.R.; DOLAB, J.A.; SEGRE, L.; SIMONCINI, C.; HAJOS, S.E.; FERNÁNDEZ, T.; DOKMETJIAN, J.C.; LITWIN, S.; ACCATTOLI, C.; VIDAL, J.C. - Immunochemical reactivity and neutralizing capacity of polyvalent anti*Vipera* (European) antivenom on enzymatic and toxic activities in the venoms of crotalids from Argentina. **J Venom Anim.Toxins**, **5**: 67-83, 1999.
- DIAS DA SILVA, W.; GUIDOLIN, R.; RAW, I.; HIGASHI, H.G.; CARICATTI, C.P.; MORAIS, J.F.; LIMA, M.L.; YAMAGUCHI, I.K.; NISHIKAWA, A.K.; STEPHANO, M.N.; MARCELINO, J.R.; PINTO, J.R.; SANTOS, M.J. - Cross-reactivity of horse monovalent antivenoms to venoms of ten *Bothrops* species. **Mem Inst Butantan**, **51**: 153-68, 1989.
- DOLAPCHIEV, L.B.; SULKOWSKI, E.; LASKOWSKI Sr, M. - Purification of exonuclease (phosphodiesterase) from the venom of *Crotalus adamanteus*. **Biochem Biophys Res Commun**, **61**: 273-81, 1974.
- DOLAPCHIEV, L.B.; VASSILEVA, R.A.; KOUMANOV K.S. - Venom exonuclease II. Amino acid composition and carbohydrate, metal ion and lipid content in the *Crotalus adamanteus* venom exonuclease. **Biochim Biophys Acta**, **622**: 331-6, 1980.

- ELLIOTT, W. B. – Chemistry and immunology of reptilian venoms. In: (GANS, C. & GANS, K.A., eds) **Biology of the Reptilia. Physiology B**, London, Academic Press, 1978, pp. 163-436. Vol. 8.
- EHRlich, S.D.; TORTI, G.; BERNARDI G. – Studies on acid deoxyribonuclease. XI . 5'-Hydroxy-terminal and penultimate nucleotides of oligonucleotides obtained from calf thymus deoxyribonucleic acid. **Biochemistry**, **10**: 2000-9, 1971.
- ESTEVÃO-COSTA, M.I.; MARTINS, M.S.; SANCHEZ, E.F.; DINIZ, C.R.; CHÁVEZ-OLÓRTEGUI, C. - Neutralization of the hemorrhagic activity of *Bothrops* and *Lachesis* snake venoms by a monoclonal antibody against mutalysin-II. **Toxicon**, **38**: 139-44, 2000.
- FAN, H.W. & CARDOSO, J.L.C. - Clinical toxicology of snake bites in South America. In: (MEIER, J.; WHITE, J. ed). **Handbook of Clinical Toxicology of Animals Venoms and Poisons.**, Boca Raton, CRC Press, 1995. pp. 667-688
- FELIX, F.; POTTER, J.L.; LASKOWSKI, M. – Action of venom phosphodiesterase on deoxyribonucleotides carrying a monoesterified phosphate on carbon 3'. **J Biol Chem**, **235**: 1150-4, 1960.
- FERNANDES, I.; LIMA, E.X.; TAKEHARA, H.A.; MOURA-DA-SILVA, A.M.; TANJONI, I.; GUTIÉRREZ, J.M. - Horse IgG isotypes and cross-neutralization of two snake antivenoms produced in Brazil and Costa Rica. **Toxicon**, **38**: 633-44, 2000.
- FLORES, C.A.; ZAPPELLINI, A.; PRADO-FRANCESCHI, J. - Lipoxigenase-derived mediators may be involved in *in vivo* neutrophil migration induced by *Bothrops erythromelas* and *Bothrops alternatus* venoms. **Toxicon**, **31**: 1551-59, 1993.
- FRANCISCHETTI, I.M.; CASTRO, H.C.; ZINGALI, R.B.; CARLINI, C.R.; GUIMARÃES, J.A. - *Bothrops* sp. snakes venoms: comparison of some biochemical and physicochemical properties and interference in platelet functions. **Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol**, **119**: 21-29, 1998.
- FRISCHAUF, A.M. & ECKSTEIN, F. - Purification of a phosphodiesterase from *Bothrops atrox* venom by affinity chromatography. **J Biochem**, **32**: 479-85, 1973.
- FURTADO, M.F.D.; MARUYAMA, M.; KAMIGUTI, A.S.; ANTONIO, L.C. - Comparative study of nine *Bothrops* snake venoms from adult female snakes and their offspring. **Toxicon**, **29**: 219-26, 1991.

- GANS, C. – Reptilian venoms: some evolutionary considerations. In: (GANS, C. and GANS, K.A., eds) **Biology of the Reptilia. Physiology B**. London, Academic Press, 1978. pp. 1-42. Vol. 8
- GULLAND, J.M. & JACKSON, E.M. - Phosphoesterases of bone and snake venoms. **Biochem J**, **32**: 590-6, 1938.
- GUTIÉRREZ, J.M. & LOMONTE, B. - Local tissue damage induced by *Bothrops* snake venoms. A review. **Mem Inst Butantan**, **51**: 211-23, 1989.
- GUTIÉRREZ, J.M. & LOMONTE, B. – Phospholipase A₂ myotoxins from *Bothrops* snake venoms. **Toxicon**, **33**: 1405-1424, 1995.
- GUTIÉRREZ, J.M. & LOMONTE, B. – Phospholipase A₂ myotoxins from *Bothrops* snake venoms. In: (KINI, R.M., ed). **Venom Phospholipase A₂ Enzymes. Structure, Function and Mechanism**. Wiley, Chichester, 1997. . pp. 321-352.
- GUTIÉRREZ, J.M. & RUCAVADO, A. - Snake venom metalloproteinases: their role in the pathogenesis of local tissue damage. **Biochimie**, **82**: 841-50, 2000.
- HALIM, H.Y.; SHABAN, E.A.; HAGAG, M.M.; DAOUD, E.W.; EL-ASMAR, M.F. - Purification and characterization of phosphodiesterase (exonuclease) from *Cerastes cerastes* (Egyptian sand viper) venom. **Toxicon**, **25**: 119-1207, 1987.
- HENEINE, L.G.; ARAUJO DOS SANTOS, M.R.; DUTRA DE CARVALHO Jr A.; DA SILVA GONTIJO, S. – A capture enzyme-linked immunosorbent assay for species-specific detection of *Bothrops* venoms. **J Immunoassay**, **20**: 91-101, 1999.
- HO, N.W.Y. & GILHAM, P.R. – The analysis of polydeoxyribonucleotides by digestion with phosphatase and phosphodiesterases. **Biochim Biophys Acta**, **308**: 53-8, 1973.
- HURST, R.O. & BUTLER, G.C. - The chromatographic separation of phosphatases in snake venoms. **J Biol Chem**, **193**: 91-96, 1951.
- IVANOV, Ch.P. & IVANOV, O.Ch. – The evolution and ancestors of toxic proteins. **Toxicon**, **17**: 205-20, 1979.
- IWANAGA, S. & SUZUKI, T. – Enzymes in snake venom. In: (LEE, C.Y., ed) **Snake Venoms. Handbook of Experimental Pharmacology**. Berlin, Springer Verlag, 1979. Vol. 52. pp. 61-158

- JORGE, M.T. & RIBEIRO, L.A.R. - Acidentes por serpentes peçonhentas do Brasil. **Rev Ass Med Bras**, **36**: 66-77, 1990.
- JORGE DA SILVA Jr., N. & AIRD, S.D. - Prey specificity, comparative lethality and compositional differences of coral snake venoms. **Comp Biochem Physiol**, **128C**: 425-56, 2001.
- KAMIGUTI, A.S. & CARDOSO, J.L.C. - Haemostatic changes caused by the venoms of South American snakes. **Toxicon**, **27**: 955-63, 1989.
- KAMIGUTI, A.S.; HAY, C.R.M.; THEAKSTON, R.D.G.; ZUZEL, M. - Insights into the mechanism of hemorrhage caused by snake venom metalloproteinases. **Toxicon**, **34**: 627-642, 1996.
- KAMIGUTI, A.S. & SANO-MARTINS, I. - South American snake venoms affecting haemostasis. **J Toxinol - Toxin Rev**, **14**: 359-74, 1995.
- KAMIGUTI, A.S.; ZUZEL, M.; THEAKSTON, R.D.G. - Snake venom metalloproteinases and disintegrins: interactions with cells. **Braz J Med Biol Res**, **31**: 853-62, 1998.
- KARDONG, K.V. - Evolutionary patterns in advanced snakes. **Am Zool**, **20**: 269-82, 1980.
- KELLER, E.B. - The hydrolysis of "soluble" ribonucleic acid by snake venom phosphodiesterase. **Biochem Biophys Res Commun**, **17**: 412-15, 1964.
- KHORANA, H.G. - Phosphodiesterases. In: (BOYER, P.D.; LARDY, H; MYRBÄCK, K., ed). **The Enzymes**. New York .Academic Press, 1961. Vol. 5. 2 ed. pp. 79-94.
- KINI, R.M. & GOWDA, T.V. - Rapid method for separation and purification of four isoenzymes of phosphodiesterase from *Trimeresurus flavoviridis* (habu snake) venom. **J Chromatogr**, **291**: 299-305, 1984.
- KOCHOLATY, W.F.; LEDFORD, E.B.; DALY, J.G.; BILLINGS, T.A. - Toxicity and some enzymatic properties and activities in the venoms of Crotalidae, Elapidae and Viperidae. **Toxicon**, **9**: 131-8, 1971.
- KOCHVA, E.; NAKAR, O.; OVADIA, M. - Venom toxins: plausible evolution from digestive enzymes. **Am Zool**, **23**: 427-30, 1983.
- LASKOWSKI Sr, M. - Purification and properties of venom phosphodiesterase. **Meth Enzymol** **65**: 276-84, 1980.
- LEVY, Z. & BDOLAH, A. - Multiple molecular forms of snake venom phosphodiesterase from *Vipera palastinae*. **Toxicon**, **14**: 389-91, 1976.

- LO, K.W.; FERRAR, W.; FINEMAN, W.; TSOU, K.C. – Fluorimetric assay of serum 5'-nucleotide phosphodiesterase in normal humans and cancer patients. **Anal Biochem**, **47**: 609-613, 1972.
- MACKESSY, S.P. - Phosphodiesterases, ribonucleases and deoxyribonuclease. In: (Bailey, G.S., ed.) **Enzymes from Snake Venom**. Fort Collins , Alaken Press, Inc, 1998. pp. 361-404. Vol. 8
- MARUNAK, S.L.; ACOSTA DE PEREZ, O.; RUÍZ DE TORRENT, R.M.; TEIBLER, G.P.; KOSCINCZUK, P.; NEGRETTE, S.M. - Hemorrhagic, edema-forming, proteolytic and myonecrotic activities of viper venoms of *Bothrops alternatus*. **Acta Physiol Pharmacol Ther Latinoam**, **49**: 149-54, 1999.
- MEBS, D. - A comparative study of enzyme activities in snake venoms. **Int. J. Biochem**, **1**: 335-42, 1970.
- MEBS, D. – Pharmacology of reptilian venoms. In: (GANS, C; GANS, K.A., eds) **Biology of the Reptilia. Physiology B**. London, Academic Press, 1978. pp. 437-560. Vol. 8.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE - **Manual de Diagnóstico e Tratamento de Acidentes por Animais Peçonhentos**, Brasília, Fundação Nacional de Saúde, 1998, p. 131.
- MORI, N.; NIKAI, T.; SUGIHARA, H. – Phosphodiesterase from the venom of *Crotalus ruber ruber*. **Int J Biochem**, **19**: 115-9, 1987.
- MOURA-DA-SILVA, A.M.; CARDOSO, D.F.; TANIZAKI, M.M. - Differences in distribution of myotoxic proteins in venoms from different *Bothrops* species. **Toxicon**, **28**: 1293-301, 1990a.
- MOURA-DA-SILVA, A.M.; DESMOND, H.; LAING, G.; THEAKSTON, R.D. - Isolation and comparison of myotoxins isolated from venoms of different species of *Bothrops* snakes. **Toxicon**, **29**: 713-23, 1991.
- MOURA-DA-SILVA, A.M.; D'IMPÉRIO LIMA, M.R.; NISHIKAWA, A.K.; BRODSKIN, C.I.; DOS SANTOS, M.C.; FURTADO, M.F.; DIAS DA SILVA, W.; MOTA, I. - Antigenic cross-reactivity of venoms obtained from snakes of genus *Bothrops*. **Toxicon** **28**, 181-88, 1990b.
- MOURA-DA-SILVA, A.M.; LAING, G.D.; PAINE, M.J.I.; DENNISON, J.M.T.J.; POLITI, V.; CRAMPTON, J.M.; THEAKSTON, R.D.G. – Processing of pro-tumor necrosis factor- α by venom metalloproteinases: a hypothesis explaining local tissue damage following snake bite. **Eur J Immunol**, **26**: 2000-2005, 1996.

- NISENBOM, H.E.; PERAZZO, J.C.; MONSERRAT, A.J.; VIDAL, J.C. - Contribution of phospholipase A₂ to the lethal potency of *Bothrops alternatus* (vibora de la cruz) venom. **Toxicon**, **24**: 807-17, 1986b.
- NISENBOM, H.E.; PERAZZO, J.C.; MONSERRAT, A.J.; VIDAL, J.C. - Effect of chemical modification with *p*-bromophenacyl bromide on the enzymatic and lethal properties of phospholipase A₂ from *Bothrops alternatus* (vibora de la cruz) venom. **Toxicon**, **26**: 1137-44, 1988.
- NISENBOM, H.E.; SEKI, C.; VIDAL, J.C. - Phospholipase A₂ from *Bothrops alternatus* (vibora de la cruz) venom. Purification and some characteristic properties. **Toxicon**, **24**: 259-72, 1986a.
- OKA, J.; UEDA, K.; HAYAISHI, O. - Snake venom phosphodiesterase: simple purification with Blue Sepharose and its application to poly(ADP-ribose) study. **Biochem Biophys Res Commun**, **80**: 841-8, 1978.
- PÉREZ, A.O.; KOSCINCZUK, P.; FLINTA, S.M.; MAIDANA, H.R.; NEGRETTE, M.S. - *Bothrops alternatus* envenoming in young dogs. **J. Venom. Anim. Toxins**, **3**: 43-47, 1997a.
- PÉREZ, O.A.; KOSCINCZUK, P.; TEIBLER, P.; NEGRETTE, M.S.; RUÍZ, R.; MARUNAK S.; BOGARIN, G. - Hemorrhagic and edema-forming activity and histologic changes in the mouse footpad induced by venoms from Argentinian *Bothrops* and *Crotalus* genera. **Toxicon**, **36**: 1165-1172, 1998.
- PÉREZ, O.A.; MARUNAK, S.; RUÍZ, R.; KOSCINCZUK, P.; TEIBLER, P. - Hemorrhage induced by snake venoms in Argentina. **Acta Physiol Pharmacol Ther Latinam**, **47**: 221-4, 1997b.
- PETROVA, M.; PHILIPPS, P.; ZACHAU, H.G. - Partial degradation of transfer RNAs by different preparations of snake venom exonuclease. **Biochim. et Biophys Acta**, **395**: 455-67, 1975.
- PETRICEVICH, V.L.; TEIXEIRA, C.F.; TAMBOURGI, D.V.; GUTIÉRREZ, J.M. - Increments in serum cytokine and nitric oxide levels in mice injected with *Bothrops asper* and *Bothrops jararaca* snake venoms. **Toxicon**, **38**: 1253-66, 2000.
- PHILIPPS, G.R. - Purification and characterization of phosphodiesterase from *Crotalus* venom. **Hoppe-Seyler's Z Physiol Chem**, **356**: 1085-96, 1975.
- PHILIPPS, G.R. - Purification and characterization of phosphodiesterase I from *Bothrops atrox*. **Biochim Biophys Acta**, **432**: 237-44, 1976.
- PHILIPPS, G.R.; CHIEMPRASERT T. - **Hoppe-Seyler's Z Physiol Chem**, **356**: 1097-1104, 1975.

- POLLACK, S.E. & AULD, D.S. – Fluorescent nucleotide triphosphate substrates for snake venom phosphodiesterase. **Anal Biochem**, **127**: 81-8, 1982.
- PRITCHARD, A.E.; KOWALSKI, D.; LASKOWSKI Sr, M. – An endonuclease activity of venom phosphodiesterase specific for single-stranded and superhelical DNA. **J Biol Chem**, **252**: 8652-9, 1977.
- PRIVAT DE GARILHE, M. & LASKOWSKI, M. – Studies of the phosphodiesterase from rattlesnake venom. **Biochim Biophys Acta**, **18**: 370-8, 1955.
- QUEIROZ, L.S. & PETTA, C.A. – Histopathological changes caused by venom of urutu snake (*Bothrops alternatus*) in mouse skeletal muscle. **Rev Inst Med Trop São Paulo**, **26**: 247-53, 1984.
- RAZZELL, W.E. – Phosphodiesterases. **Meth Enzymol**, **6**: 236-58, 1963.
- RAZZELL, W.E. & KHORANA, H.G. – Studies on polynucleotidase III. Enzymic degradation. Substrate specificity and properties of snake venom phosphodiesterase. **J Biol Chem**, **234**: 2105-13, 1959.
- ROSENFELD, G. – Symptomatology, pathology, and treatment of snake bites in South America. In: (BÜCHERL, W. & BUCKLEY, E.E., ed). **Venomous Animals and their Venoms**, New York, Academic Press, 1971. pp. 345-84 Vol. 2.
- RICHARDS, G.M.; TUTAS, D.J.; WECHTER W.J.; LASKOWSKI S. M. – Hydrolysis of dinucleoside monophosphates containing arabinose in various internucleotide linkages by exonuclease from the venom of *Crotalus adamanteus*. **Biochemistry**, **6**: 2908-14, 1967.
- RUSSELL, F.E.; BUSS, F.W.; WOO, M.Y. – Zootoxicological properties of venom phosphodiesterase. **Toxicon**, **1**: 99-108, 1963.
- RUSSELL, F.E.; WALTER, F.G.; BEY, T.A.; FERNANDEZ, M.C. – Snakes and snakebite in Central America. **Toxicon**, **35**: 1469-1522, 1997.
- SANCHEZ, E.F.; FREITAS, T.V.; FERREIRA-ALVES, D.L.; VELARDE, D.T.; DINIZ, M.R.; CORDEIRO, M.N.; AGOSTINI-COTTA, G.; DINIZ, C.R. – Biological activities of venoms from South American snakes. **Toxicon**, **30**: 95-103, 1992.
- SCHMIDT, J.O.; BLUM, M.S.; OVERAL, W.L. – Comparative enzymology of venoms from stinging Hymenoptera. **Toxicon**, **24**: 907-21, 1986.

- SETOGUCHI, Y.; MORISAWA, S.; OBO, F. - Sea snake venom III. Acid and alkaline phosphatases (phosphodiesterase, phosphomonoesterase, 5'-nucleotidase and ATPase) in sea snake (*Laticauda semifasciata*) venom. **Acta Med Univ Kagoshima**, **10**: 53-60, 1968.
- SILES VILLARROEL, M.S.; FURLANETTO, R.S.; ROLIM ROSA, R.; ZELANTE, F.; NAVAS, J. - Contribuição ao estudo imunoquímico de venenos botrópicos III. Análise dos componentes antigênicos comuns através da dupla difusão em gel de ágar. **Mem Inst Butantan**, **40/41**: 241-50, 1976/1977.
- SILES VILLARROEL, M.S.; ROLIM ROSA, R.; ZELANTE, F.; GUIDOLIN, R. - Evidenciação em camundongos da soroneutralização paraspecífica entre venenos e antivenenos botrópicos. **Mem Inst Butantan**, **42/43**: 337-44, 1978/1979.
- SILES VILLARROEL, M.S.; ZELANTE, F.; FURLANETTO, R.S.; ROLIM ROSA, R. - Contribuição ao estudo imunoquímico de venenos botrópicos I. Análise comparativa dos componentes antigênicos de seis espécies de venenos frente a seus respectivos antivenenos, através das técnicas de dupla difusão e imunolectroforese em gel de ágar. **Mem Inst Butantan**, **38**: 13-30, 1974.
- SINSHEIMER, L. & KOERNER, J.F. - A purification of venom phosphodiesterase **J Biol Chem**, **198**: 293-6, 1952.
- SMOLKA, M.B.; MARANGONI, S.; OLIVEIRA, B.; NOVELLO, J.C. - Purification and partial characterization of a thrombin-like enzyme, balterobin, from the venom of *Bothrops alternatus*. **Toxicon**, **36**: 1059-63, 1998.
- SOARES, A.M.; RODRIGUES, V.M.; BORGES, M.H.; ANDRIÃO-ESCARSO, S.H.; CUNHA, A.O.; HOMSI-BRANDEBURGO, M.I.; GIGLIO, J.R. - Inhibition of proteases, myotoxins and phospholipases A₂ of *Bothrops* venoms by the heteromeric protein complex of *Didelphis albiventris* opossum serum. **Biochem Mol Biol Int**, **43**: 1091-99, 1997.
- SOUZA, D.H.; IEMMA, M.R.; FERREIRA, L.L.; FARIA, J.P.; OLIVA, M.L.; ZINGALI, R.B.; NIEWIAROWSKI, S.; SELISTRE-DE-ARAUJO, H.S. - The disintegrin-like domain of the snake venom metalloprotease alternagin inhibits alpha2beta1 integrin-mediated cell adhesion. **Arch Biochem Biophys**, **382**: 341-50, 2000.
- SUGIHARA, H.; NIKAI, T.; NARUSE, M.; KISHIDA, M.; MORI, N. - Purification and characterization of phosphodiesterase from the venom of *Trimeresurus mucrosquamatus*. **Int J Biochem**, **18**: 203-7, 1986.

- SULKOWSKI, E.; BJÖRK, W.; LASKOWSKI Sr, M. – A specific and nonspecific alkaline monophosphatase in the venom of *Bothrops atrox* and their occurrence in the purified venom phosphodiesterase. **J Biol Chem**, **238**: 2477-2486, 1963.
- TAKAHASHI, H. – **J Biochem, (Tokyo)**, **16** : 463, 1932.
- TAN, N.H.; ARMUGAM, A.; TAN, C.S. – A comparative study of the enzymatic and toxic properties of venoms of the Asian lance-headed pit viper (genus *Trimeresurus*). **Comp Biochem Physiol**, **93B**: 757-65, 1989.
- TAN, N.H.; POH, C.H.; TAN, C.S. – Lethal and biochemical activities and properties of *Bungarus candidus* (Malayan krait) venom and venom fractions. **Toxicon**, **27**: 1065-70, 1989.
- TAN, N.H. & PONNUDURAI, G. – A comparative study of the biological properties of krait (genus *Bungarus*) venoms. **Comp Biochem Physiol**, **95C**: 105-9, 1990a.
- TAN, N.H. & PONNUDURAI, G. – A comparative study of the biological activities of venoms from snakes of the genus *Agkistrodon* (moccasins and copperheads). **Comp Biochem Physiol**, **95B**: 577-82, 1990b.
- TAN, N.H. & PONNUDURAI, G. – A comparative study of the biological properties of venoms from snakes of the genus *Vipera* (true adders). **Comp Biochem Physiol**, **96B**: 683-88, 1990c.
- TAN, N.H. & PONNUDURAI, G. – A comparative study of the biological activities of Australian elapid venoms. **Comp Biochem Physiol**, **97C**: 99-106, 1990d.
- TAN, N.H. & PONNUDURAI, G. – A comparative study of the biological properties of some sea snake venoms. **Comp Biochem Physiol**, **99B**: 351-4, 1991a.
- TAN, N.H. & PONNUDURAI, G. – A comparative study of the biological activities of rattlesnake (genera *Crotalus* and *Sistrurus*) venoms. **Comp Biochem Physiol**, **99C**: 455-61, 1991b.
- TAN, N.H. & PONNUDURAI, G. – A comparative study of the biological properties of *Dendroaspis* (mamba) snake venoms. **Comp Biochem Physiol** **99C**: 463-6, 1991c.
- TAN, N.H. & PONNUDURAI, G. - A comparative study of the biological properties of some venoms of snakes of the genus *Bothrops* (American lance-headed viper). **Comp Biochem Physiol**, **100B**: 361-5, 1991d.

- TAN, N.H. & PONNUDURAI, G. – A comparative study of the enzymatic, hemorrhagic, procoagulant and anticoagulant activities of some animal venoms. **Comp Biochem Physiol**, **103**: 229-302, 1992.
- TAN, N.H. & TAN, C.S. – A comparative study of cobra (*Naja*) venom enzymes. **Comp Biochem Physiol**, **90B**: 745-750, 1988.
- TATSUKI, T.; IWANAGA, S.; SUZUKI, T. – A simple method for preparation of snake venom phosphodiesterase almost free from 5'-nucleotidase. **J Biochem**, **77**: 831-6, 1975.
- THOMAS, R.G. & POUGH, F.H. – The effect of rattlesnake venom on digestion of prey. **Toxicon**, **17**: 221-8, 1979.
- TU, A.T. - **Venoms: Chemistry and Molecular Biology**. Marcel Dekker: New York, 1977.
- UZAWA, S. – Über die Phosphomonoesterase und die Phosphodiesterase. **J. Biochem, (Tokyo)**, **15**: 19-28, 1932.
- WATT, G. - Snakebite treatment and first aid. In: (CAMPBELL, J.A.; LAMAR, W.W., ed). **The Venomous Reptiles of Latin America**. Ithaca, NY Comstock Publishing/Cornell University Press, 1989. pp. 6-13
- WILLIAMS, E.J.; SUNG, S.; LASKOWSKI Sr. M. - Action of venom phosphodiesterase on deoxyribonucleic acid. **J Biol Chem**, **236**: 1130-4, 1961.
- ZELLER, E.A. – Enzymes of snake venoms and their biological significance. **Adv Enzymol**, **8**: 459-95, 1948.
- ZELLER, E.A. – Snake venom action: are enzymes involved in it? **Experientia**, **33**: 143-50, 1977.