

Christina Maria de Sant'Ana

Atividade plasmina s milde e seq ncia parcial
de enzima fibrino(geno)lítica do veneno de
Bothrops lanceolatus (Fer de lance).

Campinas
2005

Christina Maria de Sant'Ana

Atividade plasmina s milde e seq ncia parcial
de enzima fibrino(geno)lítica do veneno de
Bothrops lanceolatus (Fer de lance).

Disserta o apresentada ao
Departamento de Farmacologia da
Faculdade de Ciências Médicas da
Universidade Estadual de Campinas para
obten o do Título de Mestre em
Farmacologia.

Orientadora: Prof^a Dr^a Albetiza Lôbo de Araújo

Campinas
2005

ME / 118 /
MADA _____
EX
BC/ 67961
16. 123-06
D
11-09-0

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

Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

Sa59a

Sant'Ana, Christina Maria de
Atividade plasmina símile e seqüência parcial de enzima
fibrino(geno)lítica do veneno de *Bothrops lanceolatus* (Fer de lance).
/ Christina Maria de Sant'Ana. Campinas, SP : [s.n.], 2005.

Orientador: Albetiza Lobo de Araújo
Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas.

1. Plasmina. 2. Hemorragia. 3. Envenenamento. 4. Bothrops.
5. Fibrinolíticos. 6. Plasminogênio. 7. Mordeduras de cobra. I.
Araújo, Albetiza Lobo de. II. Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

(Slp/fcm)



UNICAMP

Banca Examinadora da Dissertação de Mestrado

Orientador:

Profa. Dra. Albetiza Lôbo de Araújo

Membros:

Profa Dra. Albetiza Lôbo de Araújo

Prof. Dra. Heloísa Helena de Araújo Ferreira

Profa. Dr. Sérgio Marangoni

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

Data: 23/08/2005

“Alegrai-vos sempre no Senhor! Eu repito, alegrai-vos!
Não vos inquieteis com nada, em toda circunstância orai
ao Senhor, apresentai a Deus as vossas preocupações em
orações, súplica e louvor. E a paz do nosso Deus, que é
maior que a inteligência, haverá de guardar os vossos
pensamentos, os vossos corações em Jesus Cristo, Nosso
Senhor.” – Carta de São Paulo aos Filipenses (4,4;6-7).

Ao **Deus do meu Batismo**,
pelos dons com os quais me
presenteou, pela família admirável
que me deu, onde pude me
desenvolver como pessoa.

Ao Sr. Mario e Dona Deize,
meus pais, pelos exemplos de moral
cristã que me deram, pelos esforços em
minha educação e formação
profissional, pelos incentivos em seguir
a carreira científica.

Aos meus irmãos
**Eduardo e Laura, Matheus e
Eliana e aos meus sobrinhos,**
porque foi com eles que conheci
melhor a vida e por causa deles soube
o que realmente vale à pela dar
importância.

Ao **Renato**, pelo amor e amizade,
pelo carinho, respeito e incentivos,
por fazer parte de minha vida,
estando sempre presente no meu
coração.

Aos **meus tios e avós**, pelo carinho, amizade e confiança - sentimentos que me fizeram andar sempre em frente.

Agradecimentos

À minha orientadora, Prof^a Dr^a Albetiza Lôbo de Araújo pela confiança em mim depositada, dando a oportunidade de desenvolver um projeto, o qual tornou-se este belo trabalho. Agradeço ainda pela amizade, fruto do convívio diário.

Ao Dr. José Luiz Donato, por me abrir as portas do fascinante mundo da ciência, dando sempre valiosas sugestões, que deixaram meu trabalho mais completo.

Às amigas Alessandra Stroka, Leyge, Raquel, Carol, Lucimara, Paula, Renata, Letícia, pela companhia, pela colaboração, pelas sugestões, por tantos bons momentos. Agradeço também à Anita, Cristina, Alessandra Linardi, Renata Pereira, Priscila, Christiane, Pâmela, Patrícia, Thomas, Lourdes, Gustavo, Sílvia, Samanta, Carol, Daniel pela companhia e ajuda em diversas ocasiões.

Aos professores Dr. Stephen Hyslop, Dr. Edson Antunes, Dr. Heitor Moreno Jr. pela utilização dos recursos disponíveis em seu laboratório, sem a qual não seria possível a conclusão deste trabalho.

Ao Dr. Sergio Lilla, da Unidade de Pesquisa Galeno, pelo uso dos equipamentos e seqüenciamento da proteína.

Aos técnicos de laboratório José Ilton e Gildo, pelo convívio e auxílio no desenvolvimento deste trabalho.

Aos funcionários do Departamento de Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas, pelo apoio em diversos momentos.

A CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) e ao FAEP (Fundo de Amparo ao Ensino e Pesquisa), pelo apoio financeiro.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para a conclusão deste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	xiv
LISTA DE FIGURAS	xvi
RESUMO	xvii
ABSTRACT	xix
1. INTRODUÇÃO	21
1.1 Histórico	22
1.2 Descrição Taxonômica	24
1.3 Acidentes Botrópicos no Brasil	26
1.4 Atividades	28
1.5 Hemostase	31
1.5.1 Coagulação	33
1.5.1.1 Via Extrínseca da Coagulação	34
1.5.1.2 Via Intrínseca da Coagulação	35
1.5.2 Sistema Fibrinolítico	37
1.6 Quadro Clínico do Acidente Botrópico	39
1.7 Tratamento	41
1.8 Bothrops lanceolatus	43

2. OBJETIVOS	47
3. ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO	49
4. DISCUSSÃO	71
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	76

LISTA DE ABREVIATURAS

Abs	Absorbância
μL	Microlitro
μM	Micromol
ATPase	Adenosina trifosfatase
<i>B. lanceolatus</i>	<i>Bothrops lanceolatus</i>
CIVD	Coagulação Intravascular Disseminada
cm	Centímetro
CU	Casein Units
Da	Dalton
DNA	Ácido desoxiribonucléico
ECA	Enzima Conversora de Angiotensina
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
FPB	Fator Potenciador de Bradicinina
h	Hora
HCl	Ácido Clorídrico
ICC	Insuficiência Cardíaca Congestiva
M	Molar
mg	Miligramas
min	Minuto

mM	Milimolar
nm	Nanômetro
OD	Óptic Density
pNA	Para-nitroanilida
pseudo-DIC	Pseudo Coagulação Intravascular Disseminada
RNA	Ácido Ribonucléico
SNC	Sistema Nervoso Central
TAME	N α -p-tosyl-L-arginina methyl éster
TCA	Ácido tricloroacético
TFA	Ácido trifluoracético
tPA	Ativador de Plasminogênio Tecidual
Tris	Tris-(hidroximetil)-aminometano
uPA	Ativador de Plasminogênio Tipo Uroquinase
UV	Ultra Violeta

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Cascata da Coagulação esquemática.

Figura 2. Fibrinólise esquemática.

Figura 3. *Bothrops lanceolatus* (Fer de lance)

Figuras no Artigo para Publicação

Figure 1. Purification of PII1A protein.

Figure 2. Activities of Protein.

Figure 3. Amino acid partial sequence of protein from *B. lanceolatus*.

LISTA DE TABELAS

Tabelas no Artigo para Publicação

Tabel 1. Comparison between N-terminal of *B. lanceolatus* and other Bothrops.

Tabel 2. Amino acid partial sequence of protein from *B. lanceolatus*

RESUMO

RESUMO

O envenenamento botrópico leva ao desenvolvimento de eventos como necrose, hemorragia e distúrbios da coagulação, gerando um quadro fisiopatológico de grande complexidade. O trabalho de Lôbo de Araújo *et al.* de 1998 descreveu uma proteína de cadeia polipeptídica simples (PII1A), a qual apresentou atividade enzimática tipo esterolítica, proteína esta, proveniente do veneno da *Bothrops lanceolatus*, uma serpente habitante da ilha da Martinica, no Caribe. A imunodifusão e a imunoeletroforese apresentaram uma linha simples de imunoprecipitado. A fração em questão ainda hidrolisou as cadeias α e β do fibrinogênio, o que levou a classificar esta proteína como uma enzima fibrino(geno)lítica. No presente trabalho, nos propusemos a dar continuidade ao estudo desta proteína parcialmente purificada e caracterizada e investigar sua atividade como ativadora de plasminogênio ou portadora de atividade fibrinolítica, assim a atividade plasmina símile foi determinada pela ação da proteína diretamente sobre substrato cromogênico específico (S-2251™), estando de acordo com achados publicados por Lôbo de Araújo *et al.* (1998) e que revelou também discreta atividade ativadora de plasminogênio, quando compara-se incubação na presença e ausência deste. Determinamos 71% da seqüência de aminoácidos da PII1A por espectrometria de massa – Q-tof, este método revelou um peso molecular de 28.360 kDa. A análise da seqüência em base de dados mostrou homologia com outras proteínas se serpentes e com enzimas como tripsina e fatores da cascata de coagulação.

ABSTRACT

ABSTRACT

The main symptoms following bothropic envenoming are necroses, hemorrhage and coagulopathies, originating a characteristic and complex physiopathology. The work of Lôbo de Araújo *et al.* (1998) described a single polipeptide chain protein (PII-1A) purified from *Bothrops lanceolatus* venom, a snake inhabitant of the Martinica island. The immunodiffusion and immunoelectrophoresis analysis showed a single immunoprecipitin line. This protein was characterized as a fibrino(geno)lytic enzyme since was able to hydrolyze the α and β chains of fibrinogen. Using synthetic substrates, the authors demonstrated a strong sterolytic activity against p-TAME. In the present work we continue to study this protein (PII-1A) investigating its activity to activate plasminogen or to present a direct fibrinolytic activity using S-2251TM substrate. The determination of its partial sequence, including N-terminal, was carried through by mass spectrometry - Q-tof that showed molecular weight 28.369 kDa.

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1. HISTÓRICO

Serpentes são animais que sempre nos inspiraram admiração e medo. Relatos a seu respeito são encontrados nos mais antigos documentos, como na Bíblia, onde a serpente personifica o mal e Deus declara que ela será maldita entre os animais (gen. 3), ou ainda simboliza a cura (num. 21-09), contribuindo para povoar a imaginação popular e enriquecer o folclore universal. No Brasil, os primeiros relatos a cerca das serpentes foram feitos pelo Pe. José de Anchieta, da ordem de Santo Inácio de Loyola. Padre Anchieta relata a existência de “diversos gêneros de cobras venenosas” com cores chamativas e desenhos peculiares de suas escamas, as quais eram encontradas inclusive nas casas e cuja picada podia matar em vinte e quatro horas. Nesta carta ele relata ainda que, pessoas picadas que sobrevivessem ao acidente, quando novamente picadas, sentiam menos dor e já não corriam risco de vida. Este já era o início das observações a respeito da soroterapia ofídica, mais tarde comprovada por Sewall, que demonstrou o desenvolvimento de resistência contínua e gradativa em pombas que receberam repetidas doses muito diluídas de veneno de serpente do gênero *Sistrurus* (WEN F. H. 2003).

Atualmente a pesquisa sobre venenos de serpentes, através dos mais sofisticados métodos, pode auxiliar na recuperação de pessoas picadas, além de poder desenvolver-se novos medicamentos a partir deste mesmo veneno. Exemplo disso é a descoberta do Fator Potenciador de Bradicinina (FPB), o captopril (Capoten[®]), por Ferreira e Rocha e Silva, em 1965, uma pró-droga que auxilia na manutenção da pressão arterial, na insuficiência cardíaca congestiva (ICC) e na doença arterial coronária, fazendo parte do grupo dos inibidores da enzima conversor de angiotensina (ECA) (BENOWITZ N. L., 2003).

1.2. DESCRIÇÃO E TAXONOMIA

Serpentes podem ser descritas como seres extremamente longos, com ausência de apêndices locomotores e cintura escapular, sínfise mandibular substituída por um ligamento elástico, perda de pálpebras móveis, pele recoberta por escamas e fechamento lateral da caixa craniana. Elas povoam praticamente todo o globo terrestre, exceto os pólos, uma vez que a temperatura destas regiões impossibilita a sobrevivência de animais ectodérmicos ou pessilotermos. Podem ser encontradas em matas e florestas tropicais, em savanas e desertos, sobrevivem em ambientes aquáticos e terrestres, em água doce ou marinha, assim como podem apresentar hábitos terrestres, arborícolas e fossoriais (FRANCO F. L. 2003).

Serpentes são chamadas de peçonhentas quando apresentam veneno que pode produzir acidente de importância médica com frequência e gravidade consideráveis, além de serem dotadas de aparelho inoculador eficaz (WÜSTER, GOLAY, WARRELL, 1997). Sabe-se atualmente que há cerca de 2.900 espécies de serpentes no mundo, sendo que apenas 300 são classificadas como peçonhentas (VARANDA e GIANNINI, 1994), compondo 465 gêneros, em 20 famílias, das quais 10% das espécies são encontradas no Brasil (FRANCO F. L. 2003).

A Classificação taxonômica das serpentes as distribui em cinco famílias, a saber: *Crotalidae*, *Elapidae*, *Hydrophidae*, *Colubridae* e *Viperidae*. Esta última se divide ainda em duas subfamílias: *Viperinae* e *Crotalinae* (WÜSTER, GOLAY, WARRELL, 1997). A serpente que produz o veneno estudado neste trabalho pertence à família *Viperidae*, sub-família *Crotalinae*, gênero *Bothrops* (THOMAS, L. *et al.*, 1995). A *Viperidae* é composta por três sub-famílias: *Viperinae*, *Azemiopinae* e *Crotalinae*. Uma característica da sub-família *Crotalinae* é a fosseta loreal que são dois orifícios situados nas laterais esquerda e direita da cabeça entre o olho e a narina, este órgão tem a função de captar variações de temperatura, permitindo à serpente formar imagens de infra-vermelho e luminosa. Nesta sub-família os exemplares mais conhecidos são jararacas, urutus, jararacuços, surucucus, cascavéis (FRANCO F. L. 2003).

1.3. ACIDENTES BOTRÓPICOS NO BRASIL

No Brasil, as serpentes são chamadas popularmente de cobras e há aproximadamente 321 espécies delas em nosso território (FRANCO F. L. 2003), destas, o gênero *Bothrops* é responsável por 90% dos acidentes ofídicos, tornando-se um problema de saúde pública, tamanha incidência, gravidade e seqüelas deixadas nos pacientes (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 1998). O Ministério da Saúde registra cerca de 18.000 casos de acidentes botrópicos por ano, dos casos tratados 0,3% evoluem para óbito. O maior número de casos ocorre em áreas rurais, envolve homens, com idade entre 15 a 49 anos, tendo como locais mais atingidos as pernas e os pés. O fato de os acidentes ocorrerem em áreas rurais é um dos problemas enfrentados no tratamento, pois estas áreas são, na maioria das vezes, de difícil acesso e o tempo entre a picada e a chegada ao serviço de saúde passa ser grande, propiciando o agravamento do quadro clínico do paciente (FRANÇA e MÁLAQUE, 2003).

No anseio de encontrar solução para melhor recuperação do paciente, várias alternativas foram propostas, principalmente referentes aos efeitos locais. Foram propostos uso de permanganato de potássio, fitoterapia envolvendo *aristolochia*, *curcuma* e compostos de vários vegetais, variando de estado para estado, baseado em conhecimento popular, infelizmente sem eficácia comprovada (CARDOSO, 2003). Atualmente, o único tratamento empregado no acidente

ofídico é a soroterapia, introduzida por Calmette em 1894 e, posteriormente, adaptada e aplicada em nosso país por Vital Brazil, sendo de grande valia para os sintomas sistêmicos, mas com pouca ação sobre sintomas locais, o que pode relacionar-se a evolução lenta dos sinais sistêmicos, mas evolução rápida dos locais (GUTIÉRREZ *et al.* 1981, 1985, 1987; LOMONTE *et al.* 1987).

Além da soroterapia aplicam-se tratamentos adjuvantes, com o intuito de melhorar o quadro geral instalado com a picada. O uso de antibioticoterapia é feito pois, com freqüência, ocorre instalação de microorganismos presentes na cavidade oral da serpente assim como na pele do próprio paciente (FRANÇA e MÁLAQUE, 2003).

1.4. ATIVIDADES

Os venenos botrópicos apresentam três principais atividades patológicas distintas, que são: hemorrágica, coagulante e proteolítica, esta última leva a inflamação aguda e necrose (HELUANY *et al.*, 1992; COGO *et al.*, 1993; ZAMUNÉR *et al.*, 1996; FRANCESCHI *et al.*, 2000).

No veneno existem substâncias com capacidade de causar hemorragias, são as metaloproteinases que contém zinco em sua estrutura e são chamadas de hemorraginas. Estas agem por fragilizar a integridade do endotélio vascular, degradando colágeno, fibronectina e laminina; têm atividade de desintegrina além de serem potentes anti agregantes plaquetários. Seu mecanismo de ação pode se dar por digestão enzimática da lâmina basal da microvasculatura e ruptura completa de células endoteliais. Acredita-se que a clivagem específica em pontos-chave possa levar ao desencadeamento de um mecanismo endógeno amplificador, tendo um ataque proteolítico da lâmina basal vascular (FRANÇA e MÁLAQUE, 2003).

A alteração da coagulação se dá pelo grande número de proteínas presentes em venenos botrópicos que atuam em componentes do sistema hemostático humano, como enzimas degradadoras de fibrinogênio, ativadores de

plasminogênio, ativadores de protrombina, ativadores de fator V e X, enzimas com atividade hemorrágica, indutores de agregação plaquetária e inibidores de agregação plaquetária (MARKLAND, 1997).

Sabe-se também da capacidade do veneno em ativar fatores da cascata da coagulação, levando ao consumo de fibrinogênio e conseqüente formação de fibrina. As toxinas que atuam diretamente sobre o fibrinogênio são serinoproteinases chamadas trombina-símile, sendo que a maioria dessas toxinas hidrolisam somente a região N-terminal da cadeia $A\alpha$ do fibrinogênio (HESSELL e BLOMBACK, 1971), liberando apenas o fibrinopeptídeo A, enquanto a trombina atua também na cadeia $B\beta$ do fibrinogênio produzindo fibrinopeptídeo A e B. Já foram também caracterizadas serinoproteinases nesses venenos que atuam sobre o Fator VIII (KIRBY *et al.*, 1979; NIEWIAROWSKI *et al.*, 1979; HILL-EUBANKS *et al.*, 1989; NISHIDA *et al.*, 1994; VON KLOBUSITZKY E KONIG, 1935/36).

São descritos ainda frações com atividade sobre plaquetas agregando-as e aglutinando-as, além de ser observada trombocitopenia, desde as primeiras horas após a picada (FRANÇA e MÁLAQUE, 2003).

A fração com atividade proteolítica presente no veneno é composta de enzimas com capacidade de agir em diferentes substratos (ROSENFELD G., 1971), o que leva a necrose e edema inflamatório no local da picada (BRAZIL, 1911; JORGE e RIBEIRO, 1989; GUTIERREZ e LOMONTE, 1989). A ação

inflamatória é devida à frações do veneno que têm ação local, como aminas tipo histamina, proteínas como a fosfolipase A_2 , esterases, proteases, enzimas liberadoras de cinina e lectinas, as quais apresentam ação direta. Mas esta ação também pode ser de ordem indireta, pela indução ou liberação de autacóides como bradicinina, prostaglandinas e leucotrienos. A inflamação está ligada a ação coagulante do veneno, levando a formação de trombos o que aumenta a hipóxia tecidual com conseqüente agravamento da necrose (FRANÇA e MÁLAQUE, 2003).

Foram caracterizadas algumas frações purificadas de venenos botrópicos, as quais apresentam atividade fibrinolítica e/ou fibrinogenolítica como provenientes da *Bothrops jararaca*: jararafibrase I, II, III e IV (proteínas fibrinolíticas, ativadoras de plasminogênio e/ou hemorrágicas) (MARUYAMA *et al.*, 1992a,b/1993; TANIGAWA *et al.*, 1994; ANAI *et al.*, 1998), botrojararacina (enzima fibino(geno)lítica) (ZINGALI *et al.*, 1993) e jararhagina, uma metaloproteinase fibrinolítica e hemorrágica (SUGIKI *et al.*, 1995), da *Bothrops atrox moojeni*: batroxobina (enzima fibrino(geno)lítica) (BELL, 1997), e da *Bothrops lanceolatus*: enzima com atividade esterásica que atua rapidamente na cadeia $A\alpha$ e mais lentamente na cadeia $B\beta$ do fibrinogênio (LÔBO DE ARAÚJO *et al.*, 1998).

A coagulopatia observada nos envenenamentos sistêmicos desenvolve nos pacientes uma pseudocoagulação intravascular disseminada (pseudo-DIC), resultando em incoagulabilidade sangüínea decorrente do consumo dos fatores da coagulação, principalmente do fibrinogênio, trombocitopenia e ativação do sistema fibrinolítico (KAMIGUTI *et al.*, 1986; RIBEIRO, 1989; DEMPFLÉ *et al.*, 1990). Algumas proteinases agem como anticoagulantes pela sua atividade fibrinolítica ou fibrinogenolítica (BAJWA *et al.*, 1980; KOMORI *et al.*, 1985., DAOUD *et al.*, 1986; SANCHEZ *et al.*, 1997., SERRANO *et al.*, 1993).

1.5. HEMOSTASE

Hemostase é o processo pelo qual condições fisiológicas normais do sangue são mantidas ao mesmo tempo que a perda de sangue é sanada ou prevenida a partir de diversos mecanismos.

Em casos de lesão vascular, inicialmente é observada a constrição vascular, tão logo o vaso seja lesado. Este evento ocorre por reflexos nervosos, espasmos miogênicos e fatores humorais locais, além da liberação de tromboxano A_2 pelas plaquetas e formação do tampão plaquetário - este conjunto de eventos é chamado de hemostase primária. A secundária envolve fatores ativadores de trombina e fibrina, ou seja, a cascata de coagulação. E finalmente há o crescimento de tecido fibroso que tem a função de recompor a região do orifício vascular (GUYTON e HALL, 2002).

1.5.1. COAGULAÇÃO

A coagulação pode ocorrer de modo extrínseco ou intrínseco, dependendo de quais substâncias desencadearam sua ocorrência.

Os mecanismos envolvidos na coagulação podem tornar-se ativos em decorrência de traumas na parede vascular, no sangue (via extrínseca) ou em contato do sangue com células lesadas (via intrínseca). Em qualquer dos modos que desencadeie o processo, estarão presentes proteínas chamadas de Fatores de Coagulação. Estas são enzimas proteolíticas inativas, as quais dependem de um precursor, ou zimógeno, para tornarem-se ativas, a partir do que, agem de modo sucessivo em uma reação em cascata, tendo como resultado a formação efetiva do coágulo pela presença de polímero estável de fibrina. As duas vias ocorrem simultaneamente, pois enquanto o fator tecidual desencadeia a via extrínseca, o fator XII e as plaquetas, em contato com o colágeno, deflagram a via intrínseca.

1.5.1.1. VIA EXTRÍNSECA DA COAGULAÇÃO

A via Extrínseca da Coagulação depende de um trauma no tecido vascular ou em células próximas a ele, dando início à formação de ativador de protrombina.

Tal evento leva a liberação do Fator Tecidual, composto de fosfolipídeos da membrana tecidual a qual contém uma importante enzima proteolítica. Esta por sua vez, age como ativador de fator VII. Tanto o fator tecidual como o fator VII ativado (VIIa) irão atuar como ativadores de fator X. O fator X ativado (Xa) irá se combinar com fosfolipídios do fator tecidual e com fator V gerando um complexo chamado de ativador de protrombina, o qual age clivando a protrombina em trombina na presença de Ca^{+2} . A trombina reage com o fibrinogênio que é transformado em monômeros de fibrinogênio, também em presença de íons Ca^{+2} . Os filamentos de fibrina instável passam a ser estáveis quando em contato com fator estabilizador da fibrina ativado, assim as moléculas de fibrina ligam-se de maneira cruzada formando o coágulo propriamente dito.

1.5.1.2 VIA INTRÍNSECA DA COAGULAÇÃO

Esta via tem início com um trauma no próprio sangue ou com a exposição do sangue ao colágeno. O trauma leva a alteração do fator XII e das plaquetas. O fator XII torna-se ativo enquanto as plaquetas mudam sua conformação para melhor aderirem-se ao colágeno exposto e liberam fosfolipídeos. Em seguida, o fator XII ativado (XIIa) exerce ação enzimática sobre o fator XI de modo a ativá-lo. O fator XI ativado (XIa) age sobre o fator IX e este passa a ser também ativo. O fator X então é ativado pela ação conjunta do fator IX ativado (IXa), fator VIII ativado (VIIIa) e com os fosfolipídeos plaquetários. O fator X ativado (Xa) combina-se com o fator V e com fosfolipídeos plaquetários ou teciduais formando o complexo ativador de protrombina. Este complexo promove a lise de protrombina em trombina, prosseguindo como descrito para a via extrínseca (GUYTON e HALL, 2002).

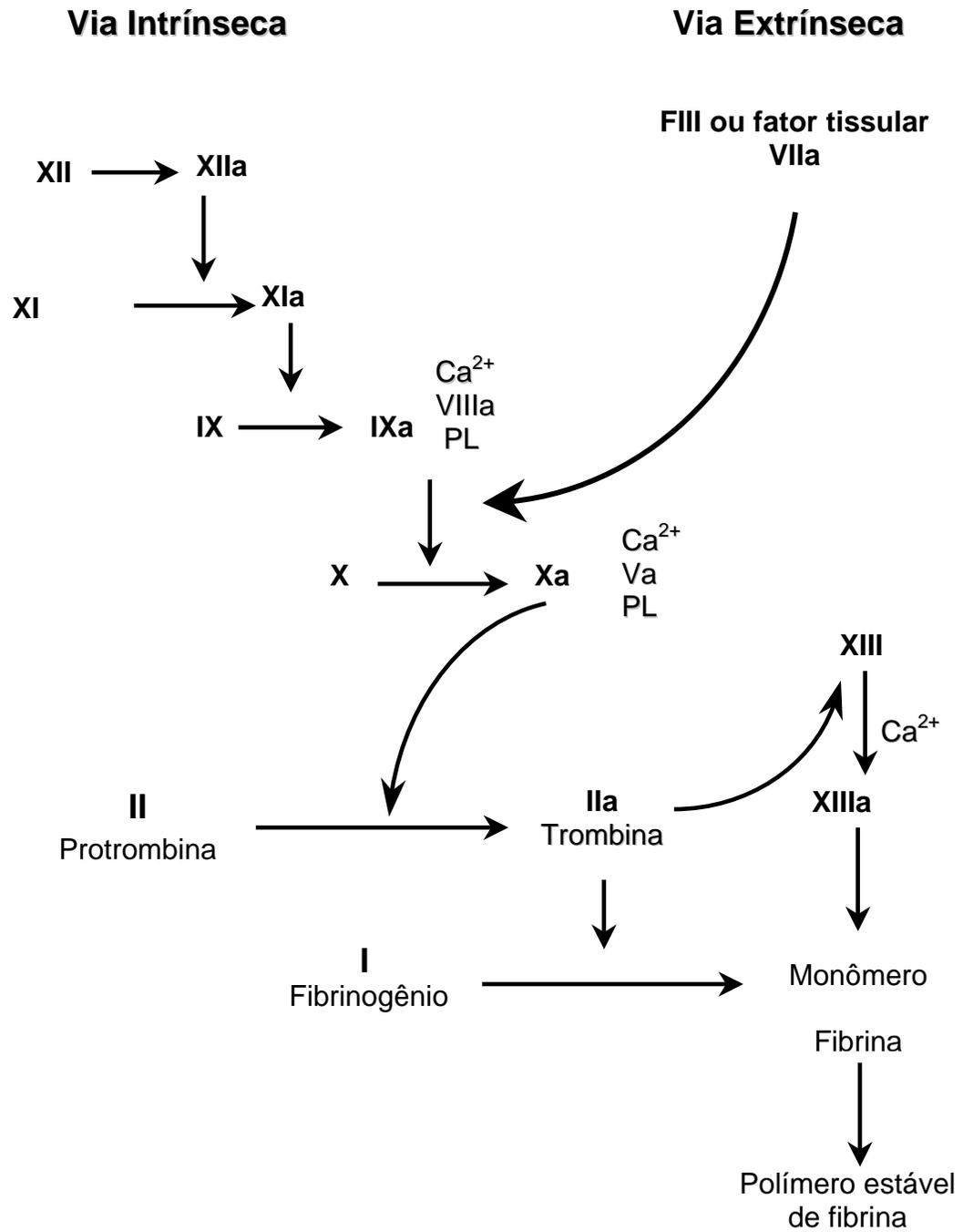


Figura 1. Cascata da coagulação sangüínea.

1.5.2 SISTEMA FIBRINOLÍTICO

- Mecanismo de Ação e Bioquímica

No interior do coágulo ficam aprisionadas moléculas de plasminogênio, uma euglobulina inativa. Após alguns dias da formação do coágulo este plasminogênio passa a ter atividade devido a ação de proteínas como o ativador tecidual de plasminogênio, com isso o plasminogênio que era inativo, torna-se plasmina. A plasmina é uma enzima com características digestivas semelhantes a tripsina, ela atua no sentido de digerir os filamentos de fibrina, além de outros fatores da coagulação, removendo o coágulo, assim vasos com fluxo sanguíneo interrompido são reabertos e seu fluxo é re-estabelecido. Sabe-se que a fibrinólise ocorre em duas etapas. Na primeira, o plasminogênio se liga à fibrina intacta, iniciando a fibrinólise, em consequência novos sítios de ligação para plasminogênio são observados. Na segunda fase, a ligação do plasminogênio a estes sítios é aumentada levando a um aumento na velocidade de reação de fibrinólise (GUYTON e HALL, 2002).

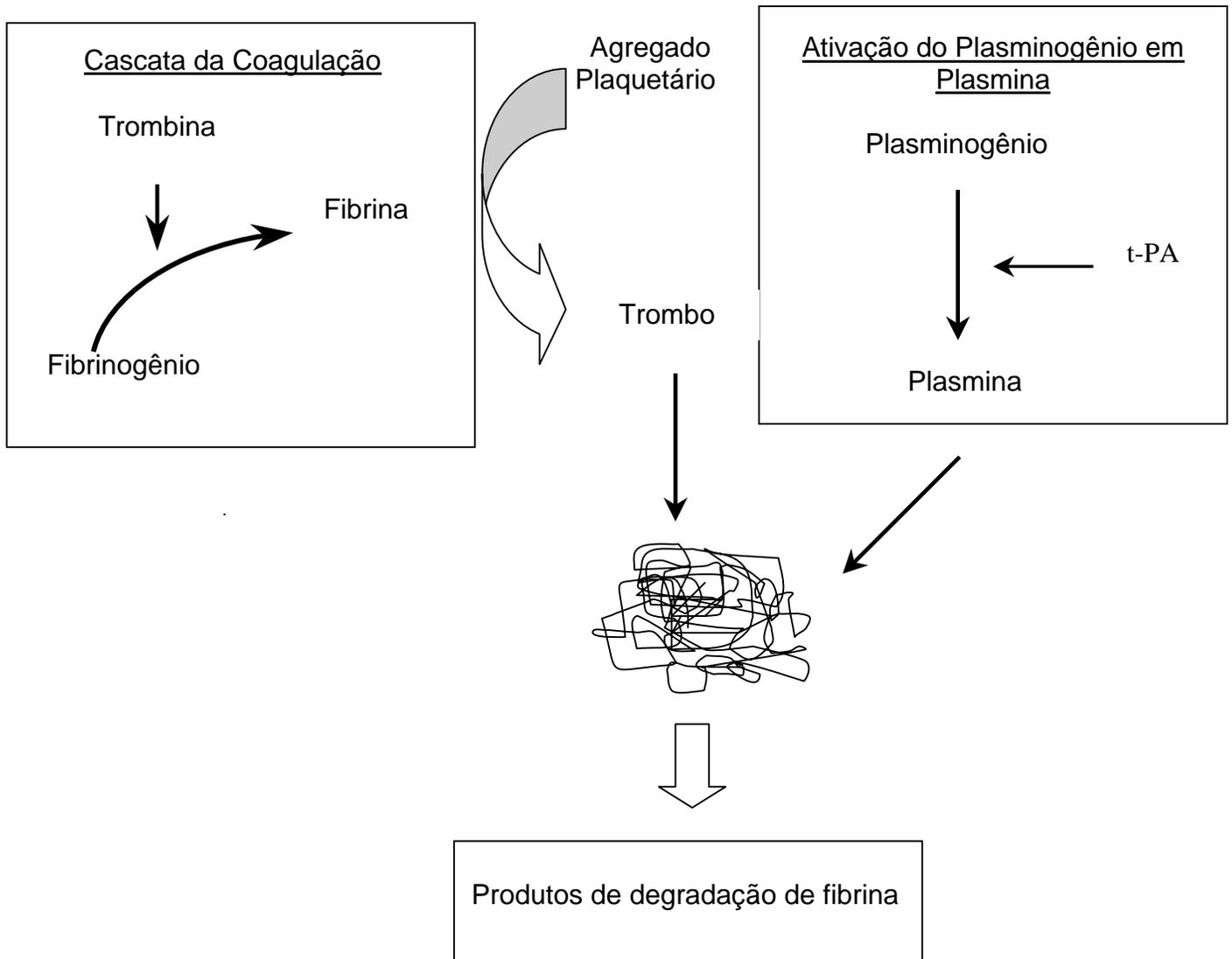


Figura 2. Fibrinólise

1.6. QUADRO CLÍNICO DO ACIDENTE BOTRÓPICO

No local da picada observa-se sangramento e edema imediato, sendo que este pode ocorrer em toda a extensão do membro acometido em um período de 24 horas, além de equimose e dor, proporcional ao edema. Com a evolução do quadro observa-se linfadenomegalia regional e equimose no trajeto dos vasos que drenam a região atingida, além de bolhas com material seroso, hemorrágico ou necrótico (FRANÇA e MÁLAQUE, 2003).

Os efeitos sistêmicos descritos com maior freqüência são gengivorragia, hematúria microscópica, púrpuras e sangramento de ferimentos recentes. Com menor freqüência são descritos hematúria macroscópica, hemoptise, sangramento conjuntival, entre outros. Em casos mais severos, já foram descritos hemorragias intensas em regiões vitais, choque e insuficiência renal, podendo evoluir para óbitos quando instala-se quadro de hemorragia digestiva e de sistema nervoso central (KAMIGUTI *et al.* , 1991).

As complicações locais observadas são abscesso, celulite e erisipela devido a instalação de microorganismos que fazem parte da microbiota normal da serpente, principalmente bactérias anaeróbias e gram-negativas. As complicações crescem proporcionalmente ao tempo que se demora para a instalação da soroterapia. As infecções locais podem ser muitas vezes mascaradas pelos próprios sinais do acidente botrópico, dificultando a avaliação da presença de microorganismos.

A necrose é outro sinal observado no local da picada, sua ocorrência está ligada ao uso de torniquetes e geralmente acomete tecidos superficiais, embora possa chegar a se instalar em tecidos ósseos. Ocorre na maioria das vezes após o segundo dia do acidente. Nos casos onde acomete estruturas profundas faz-se necessária a amputação do membro atingido, mas em raras ocasiões.

Como complicações sistêmicas, tem-se coagulação intravascular disseminada (CIVD), hipotensão e hemólise. A CIVD leva a complicações renais devido a deposição de fibrina no glomérulo que pode contribuir para a necrose tubular por interromper a chegada de sangue no local. O acidente botrópico causa importantes alteração no equilíbrio hemodinâmico do paciente, por reduzir o volume de líquidos no local da picada, pela hemorragia causada, vômitos, liberação de autacóides, neurotransmissores e prostaglandinas vaso ativas, falta de reidratação, levando a uma hipotensão considerável. No quadro, ainda estão presentes consumo de complemento, hipersensibilidade a proteínas do soro, septicemia, estes e outros motivos podem levar o paciente a desenvolver uma insuficiência renal aguda, que pode ser constatada pela presença de necrose tubular aguda e algumas vezes também necrose cortical e nefrite intersticial (FRANÇA e MÁLAQUE, 2003).

1.7. TRATAMENTO

O tratamento é feito com o paciente internado, permanecendo em repouso e em posição de drenagem postural, propiciando a redução do edema (BARRAVIERA e PEREIRA, 1994; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 1998). A administração de analgésicos ou depressores do SNC é importante quando o paciente estiver inquieto. O local da picada deve ser higienizado com água e sabão ou banho com outras soluções anti-sépticas. O monitoramento constante dos sinais vitais do paciente é de extrema importância para que, havendo qualquer alteração, tenha-se a chance de reverter o quadro, que costuma evoluir com grande velocidade. Uma vez assistido, deve-se proceder a administração do soro anti-botrópico, o qual constitui a principal terapia para o acidente botrópico. Ele deve ser diluído em soro glicosado ou fisiológico e aplicado o mais rápido possível, por via endovenosa (FRANÇA e MÁLAQUE, 2003). Nesta etapa o monitoramento sistêmico do paciente e observações do local da picada são importantes para que, quando necessário, possa-se administrar doses adicionais de soro ou outros fármacos apropriados caso o quadro evolua para uma síndrome do soro ou choque. Caso o paciente passe a apresentar prurido, tosse, rubor, hipotensão, dispnéia a administração do soro deve ser suspensa e é feita a administração subcutânea inicial de adrenalina 0,25mg, podendo chegar a aplicação de uma ampola ou mais, de acordo com a necessidade. Com a estabilização do quadro, retoma-se o uso do soro em infusão mais lenta (ALMEIDA *et al.*, 2002).

A adoção de antibioticoterapia é feita com o intuito de prevenir a instalação de microorganismos presentes na cavidade oral da serpente e na pele do próprio paciente. O uso de cloranfenicol e amoxicilina associada ao ácido clavulânico tem se mostrado muito eficiente.

Após a neutralização do veneno, o uso de heparina e fatores da coagulação é feita com o objetivo de corrigir distúrbios da coagulação provocados pelo veneno.

É administrado ainda soro antitetânico ao paciente envolvido com acidentes ofídicos para se prevenir a instalação do *Clostridium tetani* que pode estar presente na boca da serpente ou em materiais usados para torniquete, incisão ou sucção (FRANÇA e MÁLAQUE, 2003).

1.8. *Bothrops lanceolatus*

A serpente em questão é chamada popularmente de Fer-de-lance (ponta de lança), pertence à família *Viperidae* e sub-família *Crotalinae*, sendo descrita primeiramente por Lacépède em 1789 (LÔBO DE ARAÚJO *et al.*, 1998), tem porte grande, apresentando comprimento entre 1,5 e 2 metros. É preferencialmente encontrada em florestas úmidas e encostas rochosas da ilha da Martinica, no Caribe e tem hábitos arborícolas ou semi-arborícolas, nesta ilha a *B. lanceolatus* é responsável por aproximadamente vinte acidentes por ano (THOMAS *et al.*, 1995, 1998). Sua coloração varia de cinza a marrom, podendo apresentar tons amarelados, seu dorso tem as mesma cores do corpo, embora com tons mais escuros, chegando próximo ao preto. Esta variação de cores e tons, forma no dorso da serpente, listras e desenhos peculiares, conforme o exemplar e a idade. O nome Fer-de-lance é empregado também para outras *Bothrops* como *B. atrox* e *B. asper*, embora de modo indevido, pois se aplica somente para a espécie habitante da Ilha da Martinica (CAMPBELL e LAMAR, 1989).

Foram feitos testes comparativos entre veneno da *B. lanceolatus* e das serpentes brasileiras deste mesmo gênero e pôde-se observar com esta comparação que os venenos estudados apresentam atividades muito semelhantes, tais como caseinólítica, fosfolipásica, esterásica e hemorrágica (LÔBO DE ARAÚJO *et al.*, 1990).

Sabe-se que, até o momento, o veneno de *B. lanceolatus* contém uma fosfolipase A₂ (PLA₂) ácida, isolada e caracterizada como não tóxica para camundongos e pintainhos. Esta mesma fração foi, mais tarde, classificada como anticoagulante (LÔBO de ARAÚJO *et al.*, 1994, 2001). Um outro estudo mostrou também que o veneno em questão, de modo semelhante a outros venenos ofídicos, apresenta atividade hemorrágica devido a uma metaloproteinase com peso molecular estimado em 28kDA (STROKA *et al.*, 2005).

Em 1998, LÔBO de ARAÚJO *et al.*, isolaram e caracterizaram uma fração com ação fibrino(geno)lítica capaz de hidrolisar cadeias α e β do fibrinogênio, estando de acordo com a coagulopatia observada.

Quanto a ação neuromuscular, foi documentado bloqueio pós-sináptico e contração em preparações de músculo *biventer cervis* de pintainhos e diafragma de camundongos na presença de fração caseinolítica do veneno em estudo (LÔBO de ARAÚJO *et al.*, 2002). Uma outra observação é que o veneno total leva a redução da amplitude e frequência de contração em modelo de placa terminal em miniatura tanto na presença de neostigmina quanto de 4-aminopiridina (RIBEIRAL *et al.*, submitted).

A injeção de veneno total leva a edema devido ao aumento da permeabilidade vascular e infiltrado leucocitário em pata de camundongos (LÔBO de ARAÚJO *et al.*, 2000), isto foi comprovado em estudo subsequente, que

mostrou também, além de inflamação, hemorragia; sendo que, quando o veneno sofreu tratamento térmico com aumento de temperatura, o edema foi consideravelmente reduzido e a hemorragia deixava de ser vista (FARIA *et al.*, 2001). O mesmo pôde ser observado quando o veneno foi submetido ao EDTA, nesta caso, documentou-se redução também de distúrbios renais (GUIMARÃES *et al.* 2004). Um outro trabalho mostrou que a atividade inflamatória do veneno é devida a liberação de metabólitos de ácido aracdônico pela via lipooxigenase, resultados observados na cavidade peritoneal de camundongos (ARRUDA *et al.*, 2003).

Relatos de observação clínica incluem como sinais locais edema, dor e sangramento e como sinais sistêmicos embolia pulmonar, enfarto do miocárdio e cerebral, o que pôde ser experimentalmente provado como descrito acima. O tratamento já foi relatado anteriormente e inclui soroterapia específica, o que interfere muito pouco nos sinais locais, mas elimina complicação trombóticas quando aplicado em até seis horas após a picada (THOMAS *et al.*, 1995, 1998; BUCHER *et al.*, 1997).



Fonte: Campbell e Lamar, 1989.

Figura 3. *Bothrops lanceolatus* (Fer de lance).

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

- Prosseguir o estudo da enzima com atividade fibrino(geno)lítica (PII1A);
- Repurificar a PII1A com método diferente do anteriormente realizado;
- Verificar a ação da enzima em questão sobre substrato cromogênico S-2251™, específico para plasmina e estreptoquinase-plasminogênio ativado;
- Verificar presença de atividade ativadora de plasminogênio;
- Determinar parte de sua seqüência de aminoácidos.

***ARTIGO PARA
PUBLICAÇÃO***

**Plasmin-like activity and partial amino acid sequence of a
fibrinogenolytic enzyme from *Bothrops lanceolatus*
(Fer-de-lance) venom**

Christina Maria de Sant'Ana^a, José Luiz Donato^a, Stephen Hyslop^a,
Sergio Lilla^b, Cassian Bon^c, Albetiza Lôbo de Araújo^{a,*}

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

^bDepartamento de Farmacologia, Instituto de Ciências Biomédicas,
Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, SP, Brazil

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

Running title: Plasmin-like enzyme from *B. lanceolatus* venom

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

E-mail address: albetiza@fcm.unicamp.br (A. Lôbo de Araújo)

Abstract

Envenomation by *Bothrops lanceolatus* (Fer-de-lance) can cause coagulopathy. Previous work has shown that the venom of this species contains a fibrinogenolytic enzyme capable of hydrolyzing the α and β chains of fibrinogen. Here, we show that this protein degraded the chromogenic substrate S-2251™, which is specific for plasmin and activated plasminogen, and that the activity was enhanced by incubation with plasminogen. Analysis of this protein by mass spectrometry showed that it had a molecular mass of 28.369 KDa and that it shared sequence homology with a variety of snake venom proteins that affect coagulation, especially in the N-terminal region. These results indicate that the fibrinogenolytic enzyme of *B. lanceolatus* venom also contains plasminogen-activating and plasmin-like activities. These activities, together with the anticoagulant phospholipase A₂ present in this venom, could contribute to the coagulopathy seen in patients envenomed by *B. lanceolatus*.

Keywords: *Bothrops lanceolatus*; Coagulopathy; Esterase; Fibrinogenolytic enzyme; Snake venom

1. Introduction

The venoms of *Bothrops* snakes can cause severe hemostatic alterations in humans (Rosenfeld, 1971; Kamiguti and Cardoso, 1989; Watt, 1989; Fan and Cardoso, 1995; França and Málaque, 2003) by interfering with the coagulation cascade (Nahas et al., 1979; Zingali et al., 1988; Gené et al., 1989; Tan and Ponnudurai, 1991; Santoro and Sano-Martins, 1993) and platelet function (Zingali et al., 1988; Francischetti et al., 1998; Laing and Moura-da-Silva, 2005; Kamiguti, 2005). In agreement with this, several thrombin-like and fibrinolytic enzymes have been isolated from these venoms (Holleman and Weiss, 1976; Stocker and Barlow, 1976; Grabrijelcic et al., 1982; Smolka et al., 1998; Serrano et al., 1998, 2000; Bortoleto et al., 2002; Vieira et al., 2004).

Bothrops lanceolatus (Fer de lance) is a species endemic to the Caribbean island of Martinique. Human envenoming by this species produces effects similar to those of other *Bothrops* species, including edema, necrosis and coagulation disturbances (Bucher et al., 1997; Thomas et al., 1994, 1995, 1996, 1998). Experimentally, *B. lanceolatus* venom causes edema and increased vascular permeability (Lôbo de Araújo et al., 2000; Faria et al., 2001), as well as neutrophil migration into the mouse peritoneal cavity (Arruda et al., 2003). In vitro, this venom has thrombin-like activity but does not clot human plasma (Lôbo de Araújo et al., 2001). An acidic phospholipase A₂ with anti-coagulant activity (Lôbo de Araújo et al., 1994), a fibrinolytic enzyme (Lôbo de Araújo et al., 1998), and a hemorrhagic metalloproteinase (Stroka et al., 2005) have been purified from this venom. In this report, we describe the plasmin-like activity and partial amino-acid sequence of the fibrinolytic enzyme previously purified from this venom.

2. Material and methods

2.1. Reagents and venom

Bovine serum albumin, casein, TAME (N α -*p*-tosyl-L-arginine methyl ester) were from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). The synthetic substrate S-2251™ and plasminogen were from Chromogenix Instrumentation Laboratory

(Milan, Italy), Tris-(hydroxymethyl)-aminomethane (Tris base) was from Merck (Darmstadt, Germany), acetonitrile was from Mallinckrodt (Mexico City, Mexico), and TCA (trichloroacetic acid) and TFA (trifluoroacetic acid) were from Synth (Diadema, SP, Brazil). Sephadex G-100 was purchased from Pharmacia (Uppsala, Sweden) and DEAE-cellulose was from Serva (Heidelberg, Germany). C18 PEP MAP LC-packings were obtained from Dionex (Amsterdam, Holland). All of the reagents used were of analytical grade. Ninety-six well plates were from Corning (Corning, MA, USA).

Bothrops lanceolatus venom was supplied by the Unité des Venins, Pasteur Institute (Paris, France).

2.2. Protein purification

The fibrinolytic enzyme was purified by a combination of gel filtration and ion exchange chromatography, essentially as described by Lôbo de Araújo et al. (1998).

2.2.1. Gel filtration chromatography

Lyophilized venom was dissolved in 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, and centrifuged at 10,000 x g for 5 min at 4°C. The clear, yellowish supernatant was then applied to a Sephadex G-100 column (1.2 cm x 75 cm) and eluted with the same buffer at a flow rate of 5 mL/h. The elution profile was monitored at 280 nm and fractions of 1.5 ml were collected and assayed for enzymatic activities as described below. The active fractions were pooled, dialyzed against highly purified water (Milli-Q water purification system) and lyophilized.

2.2.3. Ion-exchange chromatography

The fraction containing esterolytic activity was dissolved in 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, centrifuged, and the supernatant applied to a DEAE-cellulose column (1.1 cm x 15 cm) that was equilibrated and eluted with the same buffer at a flow rate of 15 ml/h. Bound proteins were eluted with a linear gradient of NaCl (0-0.4 M) in 50 mM Tris-HCl, pH 7.5) after washing the column with one volume of buffer without

salt. The elution profile was monitored at 280 nm and fractions of 2 ml were collected and assayed for enzymatic activities. The fractions containing esterolytic activity were pooled, dialyzed and lyophilized.

2.2.3. Reverse phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC)

RP-HPLC was done using a Shimadzu system consisting of two binary pumps (LC-10Advp) and a UV detector (SPD-10Avp). All of the modules were controlled by an SCL-10Advp unit connected to a computer running Class VP software. The esterolytic fraction was dissolved in solvent A (0.1% trifluoroacetic acid - TFA in water) and injected manually through a Rheodyne valve onto a 218TP54 Vydac C18 column (5 μ m, 4.6 mm x 250 mm) equilibrated with 5% of solvent B (acetonitrile in 0.1% TFA). A linear gradient (5-70%) of solvent B was used to elute the bound proteins at a flow rate of 1 ml/min for 90 min. The elution profile was monitored at 220 and 280 nm.

2.3. Enzymatic assays

2.3.1. Esterolytic activity

Esterolytic activity was assayed in 0.1 M Tris-HCl, pH 7.8, as described by Viljoen et al. (1979), using TAME as substrate. The increase in absorbance at 247 nm was recorded continuously and the rate of change/min was calculated. One unit of activity was defined as an increase of 0.001 absorbance units/min.

2.3.2. Proteolytic (caseinolytic) activity

Caseinolytic activity was assayed in 0.1 M Tris-HCl, pH 7.8, using casein as substrate (Delpierre, 1968). One unit of activity was defined as an increase of 0.001 absorbance units/min at 280 nm.

2.3.3. Enzymatic activity towards the chromogenic substrate S-2251™

S-2251™, a synthetic substrate specific for plasmin and activated plasminogen, was dissolved in 0.05 M Tris-HCl, pH 7.4, to a final concentration of 12 mM and then aliquoted and stored at -70°C. Plasminogen was dissolved in

distilled water to give a solution containing 10 CU/ml (CU = casein units). Immediately prior to use, aliquots of S-2251 and plasminogen were diluted in Tris buffer to concentrations of 800 μ M and 0.1 CU/ml, respectively. The enzymatic activity of the streptokinase-plasminogen complex was assayed by monitoring the increase in absorbance at 405 nm in a mixture consisting of 20 μ l of buffer alone (control) or enzyme (venom, chromatographic fraction or purified enzyme), 30 μ l of S-2251™ and 100 μ l of plasminogen. Enzyme activity was expressed as the rate of change/min.

2.4. Protein quantification

The protein concentrations of the venom, chromatographic fractions and purified protein were determined by the method of Lowry et al. (1951), using bovine serum albumin as standard.

2.5. Treatment of the purified protein

2.5.1. Reduction and alkylation

Lyophilized protein from RP-HPLC was resuspended in 8 M urea containing 10 mM DTT at pH 8.0 and the disulfide bridges were reduced at 37°C for 2 h. Since the number of cysteine residues in the protein was initially unknown, the optimum concentration of iodoacetamide for alkylating the free thiols were derived empirically, based on results obtained from incubations using various concentrations of iodoacetamide and different amounts of protein, with each mixture being analyzed by mass spectrometry. Based on these preliminary experiments, a 30% molar excess of iodoacetamide relative to the total number of thiols was eventually used, and the mixture was incubated for 1.5 h at 37°C in the dark. The reaction was stopped by injecting the mixture onto the RP-HPLC column followed by freeze-drying of the peak that was collected.

2.5.2. Enzymatic digestion

Purified protein was digested with sequencing-grade bovine pancreatic trypsin in 0.4% ammonium bicarbonate, pH 8.5, for 4 h at 37°C, at an enzyme-to-substrate ratio of 1:100 (w/w). The reaction was stopped by lyophilization.

2.6. Mass spectrometry

All mass spectra were acquired using a quadrupole time-of-flight (TOF) hybrid mass spectrometer (Q-TOF Ultima, Micromass, Manchester, UK) equipped with a nano Z-spray source operating in the positive ion mode. The ionization conditions used included a capillary voltage of 2.3 kV, a cone voltage of 30 and 100 V, respectively, and a collision energy of 10 eV. The source temperature was 70°C and the cone gas was N₂ at a flow-rate of 80 l/h; no nebulizing gas was used to obtain the sprays. Argon was used in the collision cell. External calibration with sodium iodide was done over the mass range from m/z 50 to 2500. All spectra were acquired with the TOF analyzer in 'V-mode' (TOF voltage = 9.1 kV) and the MCP voltage set at 2150 V.

2.7. Analysis of the intact protein

Lyophilized RP-HPLC fractions of intact native and alkylated protein were dissolved in 90% H₂O – 10% acetonitrile in 0.1% TFA and introduced into the mass spectrometer source with a syringe pump at a flow rate of 500 nl/min. Mass spectra were acquired over the mass range m/z 1000-2400 for the native protein and m/z 600-2000 for alkylated protein, both at a scan rate of 1 s per scan. The masses were calculated using a MassLynx-MaxEnt 1 deconvolution algorithm.

3. Results

3.1. Protein purification

The *B. lanceolatus* protein was purified in three chromatographic steps. Fractionation of the venom on Sephadex G-100 yielded three peaks (PI, PII and PIII), with PII showing the highest esterolytic activity (Fig. 1a). The active fractions

of PII were pooled and chromatographed on DEAE-cellulose and resulted in three peaks (PII-1, PII-2 and PII-3), of which PII-1 showed the highest esterolytic activity (Fig. 1b). HPLC of this fraction resulted in a major well-defined peak (PII-1A; Fig. 1c) which was considered to be the esterolytic enzyme based on the molecular mass and enzymatic activity.

3.2. Enzymatic activity

PII-1A showed esterolytic activity towards TAME, with a specific activity of 7.88 U/mg (Fig. 2a), but had lower caseinolytic activity (133.6 U/mg – not showed) than the venom (208 U/mg). The enzymatic activity of PII-1A towards S-2251™ was 912.9 U/mg, and was 3.86-fold greater than that of the venom (236.7 U/mg) (Fig. 2b). In the presence of plasminogen, there was an increase in the hydrolysis of S-2251™, indicating that the enzyme was able to activate plasminogen (Fig. 2c). However, this increase was considerably greater with peak PII-1 than with PII-1A. This discrepancy may reflect partial inactivation of the enzyme by the solvent or column used for HPLC, as also suggested by the decrease in TAME hydrolysis by PII-1A compared to PII-1 (Fig. 2a).

3.3. Partial sequence determination by mass spectrometry

Mass spectrometry of PII-1A yielded a molecular mass of 28.360 kDa. Digestion of the purified protein with trypsin followed by separation of the peptides and sequencing by mass spectrometry resulted in the partial sequence shown in Fig 3a. Approximately 71% of the protein was sequenced and showed strong homology with the platelet-aggregating protein PA-BJ from *B. jararaca* venom. In addition, the N-terminal region of the protein was very similar to that of other venom proteins such as ancrod, the batroxobin precursor and bothrombin (Fig. 3b).

4. Discussion

Although *Bothrops lanceolatus* venom does not clot human citrated plasma, it contains a thrombin-like enzyme since it clots fibrinogen (Stocker et al., 1974; Lôbo de Araújo et al., 2001). A fibrinogenolytic enzyme purified from this venom

was found to be a single polypeptide chain with a molecular mass of 38 kDa and contains a reactive serine residue with strong hydrolytic activity towards TAME (Lôbo de Araújo et al., 1998). These properties are similar to those for thrombin-like enzymes and fibrinogenases purified from other snake venoms (Markland and Damus, 1971; Holleman and Weiss, 1976; Nolan et al., 1976; Stocker and Barlow, 1976; Magalhães et al., 1981; Selistre and Giglio, 1987). The *B. lanceolatus* enzyme had low coagulant activity when tested on human citrated plasma or purified fibrinogen, but degraded the α and β -chains of fibrinogen. This finding suggested that this esterase may prevent coagulation by hydrolyzing the α - and β -chains of fibrinogen and/or fibrin. Atroxase, a metalloproteinase purified from *Crotalus atrox* venom (Willis and Tu, 1988), shows similar hydrolytic specificities and is an effective anticoagulant.

To examine the fibrinolytic activity of this enzyme, we used the two initial purification steps described by Lôbo de Araújo et al. (1998) combined with HPLC to purify the protein from *B. lanceolatus* venom. Mass spectrometric analysis gave a molecular mass 10 kDa lower than that initially reported by Lôbo de Araújo et al. (1998). This difference may reflect the partial loss of carbohydrate moieties during the purification or mass spectrometric analysis. Variation in the carbohydrate content of the protein between different lots of venom could also contribute to this discrepancy.

The N-terminal sequence of the purified protein showed high homology to ancrod (McMullen et al., 1989), *Vipera russelli* proteinase (Tokunaga et al., 1988), the batroxobin precursor (Itoh et al., 1987) and bothrombin from *B. jararaca* (Nishida et al., 1994). Approximately 71% of the protein was sequenced and showed homology with trypsin and other serine proteases. This protein also shared 60% homology with PA-BJ, a 30 kDa protein with platelet-aggregating activity isolated from *B. jararaca* venom (Serrano et al., 1995). The gaps in the primary structure indicate regions that were not sequenced because of the presence of carbohydrate structures attached to the tryptic peptides.

The central component of the fibrinolytic system is the glycoprotein plasminogen, which is produced by the liver and is present in plasma and most

extravascular fluids. Plasminogen is a precursor enzyme (zymogen) which, following partial cleavage by a plasminogen activator, is converted to its active and proteolytic form, plasmin. Plasminogen has two physiological activators, tissue-type plasminogen activator (tPA) and urokinase-type plasminogen activator (uPA). These activators are themselves serine proteinases and activate plasminogen by cleavage of a single peptide bond.

The primary target of plasmin is fibrin, but this enzyme is also able to degrade several constituents of the extracellular matrix and to convert a number of pro-hormones and cytokine precursors to their active form. The generation of plasmin occurs preferentially on the fibrin surface, which offers binding sites for plasminogen and its principle activator in blood, t-PA. This binding stimulates plasminogen activation, but also localizes the action of plasmin to sites of fibrin formation that promote efficient clot lysis. Because plasmin cleaves a polypeptide chain preferentially after a lysine residue, new carboxyterminal lysine residues are generated in the fibrin network, which represent additional binding sites for plasminogen. The major part of the plasminogen inside the clot becomes bound to the fibrin and the fibrinolytic process is significantly accelerated (Suenson et al., 1984).

As shown here, the *B. lanceolatus* esterase had direct activity on S2251™, a chromogenic substrate specific for plasmin and streptokinase-activated plasminogen (Hemker, 1983). This finding indicates that the fibrinogenolytic esterase of *B. lanceolatus* venom is also a plasmin-like enzyme. Hence, the fibrino(geno)lytic enzyme of *B. lanceolatus* venom may act synergistically with the anticoagulant phospholipase A₂ of this venom (Lôbo de Araújo et al., 1994) to produce incoagulable blood, one of the main symptoms in patients envenomed by *B. lanceolatus* (Thomas et al., 1994, 1995, 1996).

Acknowledgments

The authors thank Dr. Gilberto de Nucci (Department of Pharmacology, UNICAMP and Fundação Tropical André Tosello) for use of the mass spectrometry facilities. This work was supported by CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento

de Pessoal de Nível Superior) and FAEP-UNICAMP (Fundo de Amparo ao Ensino e Pesquisa - UNICAMP).

References

- Arruda, V.A., Guimarães, A.Q., Hyslop, S., Ferreira de Araújo, P.M., Bon, C., Lôbo de Araújo, A., 2003. *Bothrops lanceolatus* (Fer de lance) venom stimulates leukocyte migration into the peritoneal cavity of mice. *Toxicon* 41, 99-107.
- Bortoleto, R.K., Murakami, M.T., Watanabe, L., Soares, A.M., Arni, R.K., 2002. Purification, characterization and crystallization of jararacussin-I, a fibrinogen-clotting enzyme isolated from the venom of *Bothrops jararacussu*. *Toxicon* 40, 1307-1312.
- Bucher, B., Canonge, D., Thomas, L., Tyburn, B., Robbe-Vicent, A., Choumer, V., Bon, C., Ketterlé, J., Lang, J., 1997. Clinical indicators of envenoming and serum levels of venom antigens in patients bitten by *Bothrops lanceolatus* in Martinique. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 91, 186-190.
- Delpierre, G.R., 1968. Studies on African snake venoms – I. The proteolytic activities of some African Viperidae venoms. *Toxicon* 5, 233-238.
- Fan, H.W., Cardoso, J.L.C., 1995. Clinical toxicology of snake bites in South America. In: Meier, J., White, J. (Eds.), *Handbook of Clinical Toxicology of Animal Venoms and Poisons*. CRC Press, Boca Raton, pp. 667-688.
- Faria, L., Antunes, E., Bon, C., Lôbo de Araújo, A., 2001. Pharmacological characterization of the paw edema induced by *Bothrops lanceolatus* (Fer de lance) venom. *Toxicon* 39, 825-830.
- França, F.O.S., Málaque, C.M.S., 2003. Acidente botrópico. In: Cardoso, J.L.C., França, F.O.S., Wen, F.H., Málaque, C.M.S., Haddad Jr. V. (Eds.), *Animais Peçonhentos no Brasil: Biologia, Clínica e Terapêutica dos Acidentes*. Sarvier/FAPESP, São Paulo, pp. 72-86.
- Francischetti, I.M., Castro, H.C., Zingali, R.B., Carlini, C.R., Guimarães, J.A., 1998. *Bothrops* sp. snake venoms: comparison of some biochemical and

- physicochemical properties and interference in platelet functions. *Comp. Biochem. Physiol. C. Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.* 119, 21-29.
- Gabrijelcic, D., Drujan, B., Gubensek, F., 1982. Coagulant proteinase from *Bothrops colombiensis* venom. *Toxicon* 20, 275-278.
- Gené, J.A., Roy, A., Rojas, G., Gutiérrez, J.M., Cerdas, L., 1989. Comparative study on coagulant, defibrinating, fibrinolytic and fibrinogenolytic activities of Costa Rican crotaline snake venoms and their neutralization by a polyvalent antivenom. *Toxicon* 27, 841-848.
- Hemker, H.C., 1983. *Handbook of Synthetic Substrates for the Coagulation and Fibrinolytic System*. Martinus Nijhoff Publishers, The Hague.
- Holleman, W.H., Weiss, L.J., 1976. The thrombin-like enzyme from *Bothrops atrox* venom. *J. Biol. Chem.* 251, 1663-1669.
- Itoh, N., Tanaka, N., Mihashi, S., Yamashina, I., 1987. Molecular cloning and sequence analysis of cDNA for batroxobin, a thrombin-like snake venom enzyme. *J. Biol. Chem.* 262, 3132-3135.
- Kamiguti, A.S., 2005. Platelets as targets of snake venom metalloproteinases. *Toxicon* 45, 1041-1049.
- Kamiguti, A.S., Cardoso, J.L., 1989. Haemostatic changes caused by the venoms of South American snakes. *Toxicon* 27, 955-963.
- Laing, G.D., Moura-da-Silva, A.M., 2005. Jararhagin and its multiple effects on hemostasis. *Toxicon* 45, 987-996.
- Lôbo de Araújo, A., Donato, J.L., Bon, C., 1998. Purification from *Bothrops lanceolatus* (Fer de lance) venom of a fibrino(geno)lytic enzyme with esterolytic activity. *Toxicon* 36, 745-758.
- Lôbo de Araújo, A., Kamiguti, A., Bon, C., 2001. Coagulant and anticoagulant activities of *Bothrops lanceolatus* (Fer de lance) venom. *Toxicon* 39, 371-375.
- Lôbo de Araújo, A., Radvanyi, F., Bon, C., 1994. Purification of an acidic phospholipase A₂ from *Bothrops lanceolatus* (Fer de lance) venom: molecular and enzymatic properties. *Toxicon* 32, 1069-1081.

- Lôbo de Araújo, A., Souza, A.O., Cruz-Höfling, M.A., Flores, C.A., Bon, C., 2000. *Bothrops lanceolatus* (Fer de lance) venom induces edema formation and increases vascular permeability in the mouse hind paw. *Toxicon* 38, 209-221.
- Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.
- Magalhães, A., de Oliveira, G.J., Diniz, C.R., 1981. Purification and partial characterization of a thrombin-like enzyme from the venom of the bushmaster snake, *Lachesis muta noctivaga*. *Toxicon* 19, 279-294.
- Markland, F.S., Damus, P.S., 1971. Purification and properties of a thrombin-like enzyme from the venom of *Crotalus adamantus* (eastern diamondback rattlesnake). *J. Biol. Chem.* 246, 6460-6473.
- McMullen, B.A., Fujikawa, K., Kisiel, W., 1989. Primary structure of a protein C activator from *Agkistrodon contortrix contortrix* venom. *J. Biochem.* 28, 674-679.
- Nahas, L., Kamiguti, A.S., Barros, M.A., 1979. Thrombin-like and factor X-activator components of *Bothrops* snake venoms. *Thromb. Haemost.* 41, 314-328.
- Nakagaki, T., Kazim, A.L., Kisiel, W., 1990. Isolation and characterization of a protein C activator from tropical moccasin venom. *Thromb. Res.* 58, 593-602.
- Nishida, S., Fujimura, Y., Miura, S., Ozaki, Y., Usami, Y., Suzuki, M., Titani, K., Yoshida, E., Sugimoto, M., Yoshioka, A., Fukui, H., 1994. Purification and characterization of bothrombin, a fibrinogen-clotting serine protease from the venom of *Bothrops jararaca*. *Biochemistry* 33, 1843-1849.
- Nolan, C., Hall, L., Barlow, G.H., 1976. Ancrod, the coagulation enzyme from Malayan pit viper (*Agkistrodon rhodostoma*) venom. *Meth. Enzymol.* 45, 205-214.
- Rosenfeld, G., 1971. Symptomatology, pathology and treatment of snake bites in South America. In: Bücherl, W., Buckley, E., Deulofeu, V. (Eds.), *Venomous Animals and their Venoms*. Vol. 1. Academic Press, New York, pp. 345-403.
- Santoro, M.L., Sano-Martins, I.S., 1993. Different clotting mechanisms of *Bothrops jararaca* snake venom on human and rabbit plasmas. *Toxicon* 31, 733-742.

- Selistre, H.S., Giglio, J.R., 1987. Isolation and characterization of a thrombin-like enzyme from the venom of the snake *Bothrops insularis* (jararaca ilhoa). *Toxicon* 25, 1135-1144.
- Serrano, S.M., Hagiwara, Y., Murayama, N., Higuchi, S., Mentele, R., Sampaio, C.A., Camargo, A.C., Fink, E., 1998. Purification and characterization of a kinin-releasing and fibrinogen-clotting serin proteinase (KN-BJ) from the venom of *Bothrops jararaca*, and molecular cloning and sequence analysis of its cDNA. *Eur. J. Biochem.* 251, 845-853.
- Serrano, S.M., Mentele, R., Sampaio, C.A., Fink, E., 1995. Purification, characterization, and amino acid sequence of a serine proteinase, PA-BJ, with platelet-aggregating activity from the venom of *Bothrops jararaca*. *Biochemistry* 34, 7186-7193.
- Serrano, S.M., Sampaio, C.A., Mentele, R., Camargo, A.C., Fink, E., 2000. A novel fibrinogen-clotting enzyme, TL-BJ, from the venom of the snake *Bothrops jararaca*: purification and characterization. *Thromb. Haemost.* 83, 438-444.
- Smolka, M.B., Marangoni, S., Oliveira, B., Novello, J.C., 1998. Purification and partial characterization of a thrombin-like enzyme, balterobin, from the venom of *Bothrops alternatus*. *Toxicon* 36, 1059-1063.
- Stocker, K., Barlow, G.H., 1976. The coagulant enzyme from *Bothrops atrox* venom (batroxobin). *Meth. Enzymol.* 45, 214-223.
- Stocker, K., Christ, W., Leloup, P., 1974. Characterization of the venoms of various *Bothrops* species by immunoelectrophoresis and reaction with fibrinogen agarose. *Toxicon* 12, 415-417.
- Stroka, A., Donato, J.L., Bon, C., Hyslop, S., Lôbo de Araújo, A., 2005. Purification and characterization of a hemorrhagic metalloproteinase from *Bothrops lanceolatus* (Fer-de-lance) snake venom. *Toxicon* 45, 411-420.
- Suenson, E., Lutzen, O., Thorsen, S., 1984. Initial plasmin-degradation of fibrin as the basis of a positive feed-back mechanism in fibrinolysis. *Eur. J. Biochem.* 140, 513-522.

- Tan, N.H., Ponnudurai, G., 1991. A comparative study of the biological properties of some venoms of snakes of the genus *Bothrops* (American lance-headed viper). *Comp. Biochem. Physiol. B.* 100, 361-365.
- Thomas, L., Tyburn, B., Ketterlé, J., Biao, T., Mehdaoui, H., Moravie, V., Rouvel, C., Plumelle, Y., Bucher, B., Canonne, D., Marie-Nelly, C.A., Lang, J., 1998. Prognostic significance of clinical grading of patients envenomed by *Bothrops lanceolatus* in Martinique. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 92, 542-545.
- Thomas, L., Tyburn, B., Ketterlé, J., Rieux, D., Garnier, D., Smadja, D., et le Groupe de Reserche sur la Morsure de Serpent en Martinique, 1994. Troubles de la coagulation et thromboses induites par la morsure de serpent (*Bothrops lanceolatus*) chez l'homme en Martinique. *Réanim. Urgence* 3, 25-30.
- Thomas, L., Tyburn, B., Pecout, F., Ketterlé, J., Rieux, D., Smadja, D., Garnier, D., Plumelle, Y., 1995. Prevention of thromboses in human patients with *Bothrops lanceolatus* envenoming in Martinique: failure of anticoagulants and efficacy of a monospecific antivenom. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 52, 419-426.
- Thomas, L., Tyburn, B., and the Research Group on Snake Bite in Martinique, 1996. *Bothrops lanceolatus* bites in Martinique: clinical aspects and treatment. In: Bon, C., Goyffon, M. (Eds.), *Envenomings and their Treatments*. Fondation Marcel Mérieux, Lyon, pp. 255-265.
- Tokunaga, F., Nagasawa, K., Tamura, S., Miyata, T., Iwanaga, S., Kisiel, W., 1988. The factor V-activating enzyme (RVV-V) from Russell's viper venom. Identification of isoproteins RVV-V alpha, -V beta, and -V gamma and their complete amino acid sequences. *J. Biol. Chem.* 263, 17471-17481.
- Vieira, D.F., Watanabe, L., Sant'ana, C.D., Marcussi, S., Sampaio, S.V., Soares, A.M., Arni, R.K., 2004. Purification and characterization of jararassin-I, a thrombin-like enzyme from *Bothrops jararaca* snake venom. *Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai)* 36, 798-802.
- Viljoen, C.C., Meehan, C.M., Botes, D.P., 1979. Separation of *Bitis gabonica* (Gaboon adder) venom arginine esterases into kinin-releasing, clotting and fibrinolytic factors. *Toxicon* 17, 145-154.

- Watt, G., 1989. Snakebite treatment and first aid. In: Campbell, J.A., Lamar, W.W. (Eds.), *The Venomous Reptiles of Latin America*. Comstock Publishing Associates/Cornell University Press, Ithaca, pp. 6-13.
- Willis, T.W., Tu, A.T., 1988. Purification and biochemical characterization of atroxase, a nonhemorrhagic fibrinolytic protease from western diamondback rattlesnake venom. *Biochemistry* 27, 4769-4777.
- Zingali, R.D., Francischetti, I.M., Carlini, C.R., Guimarães, J.A., 1988. Biochemical and pharmacological screening of snake (*Bothrops*) venoms: characterization of components acting on blood coagulation and platelet aggregation. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 21, 763-765.

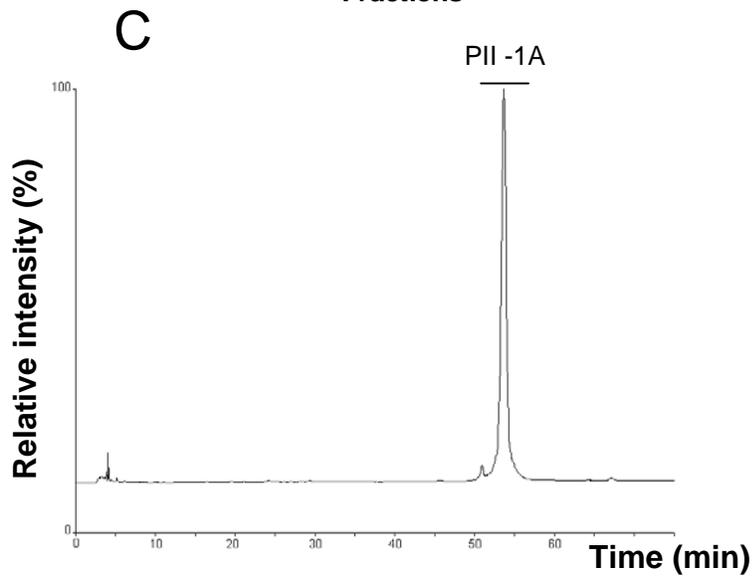
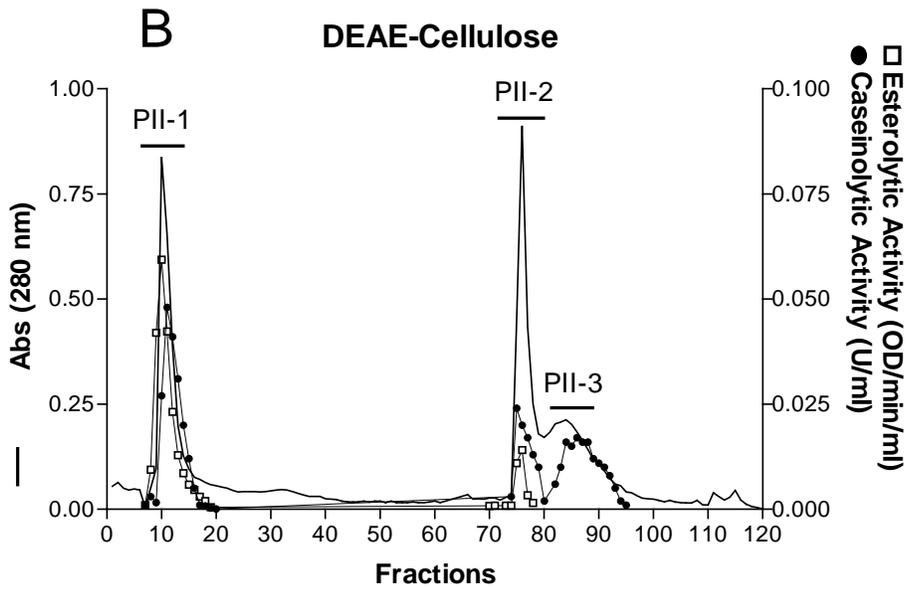
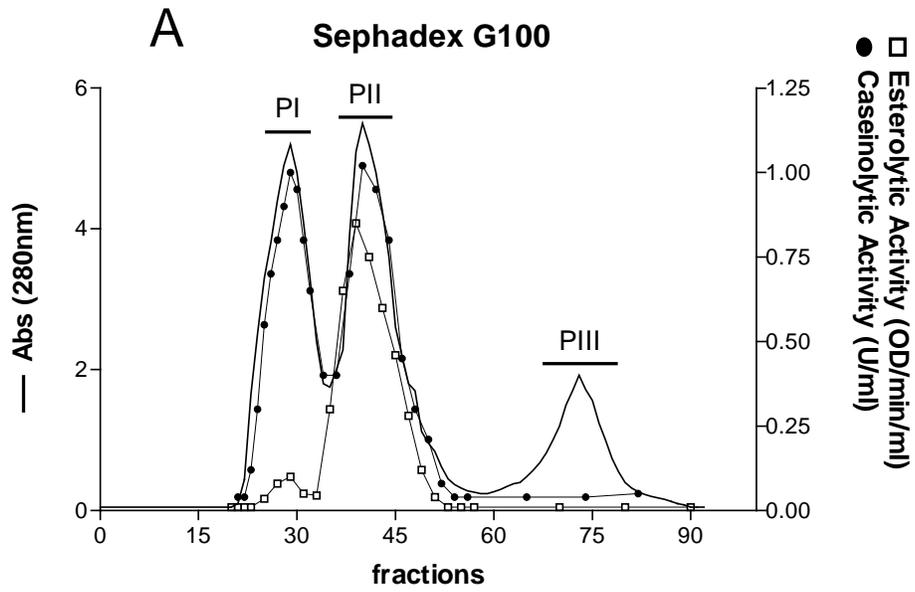
FIGURE LEGENDS

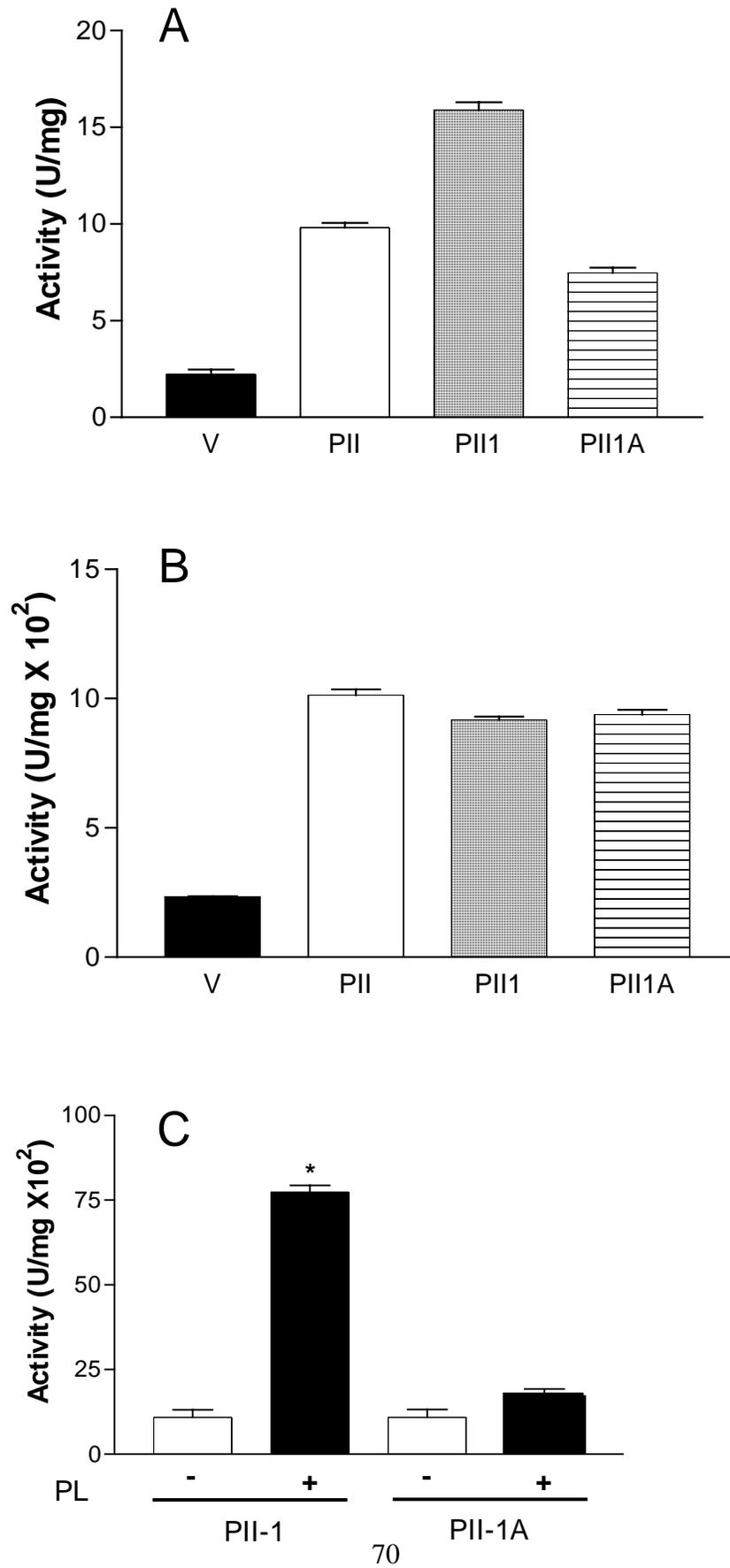
Fig. 1. Purification of the fibrinogenolytic enzyme from *B. laneolatus* venom. (A), Venom was applied to a Sephadex G-100 column (1.2 cm x 75 cm) and eluted with 50 mM Tris-HCl (pH 7.5). Fractions of 1.5 ml were collected at a flow rate of 5 ml/h and those corresponding to peak PII were pooled, dialyzed against highly purified water and lyophilized. (B) Peak PII from the Sephadex G-100 column was dissolved in 50 mM Tris-HCl (pH 7.5) and loaded onto a DEAE-cellulose column (1.1 cm x 15 cm) equilibrated with the same buffer. A linear gradient of NaCl (0-0.4 M) was initiated after collecting one column volume of eluant and fractions of 2.0 ml were collected at a flow rate of 15 ml/h. The fractions containing esterolytic activity (PII-1) were pooled, dialyzed against water and lyophilized. (C) Peak PII-1 from the DEAE-cellulose chromatography was dissolved in 5% acetonitrile with 0.1% TFA (solvent B) and loaded onto a C18 column equilibrated with this same solvent. The bound proteins were eluted with a linear gradient of 5-70% of solvent B at a flow rate of 1 ml/min.

Fig. 2. (A) The esterolytic activity of the venom and peaks obtained with each chromatographic step. (B) Activity of the venom and corresponding peaks on S2251™, showing the strong plasmin-like activity. (C) Hydrolysis of S2251™ in the absence and presence of plasminogen (PL). The columns represent the mean ± S.E.M. of three determinations. V = venom. Statistical analyse was done with Student's t-test followed by one-way analysis of variance (ANOVA). * P < 0,001 was considered significant when compared with the same group without plasminogen.

Fig. 3. (A) Alignment of the deduced amino acid sequence of the protein eluted in peak PII-1A. The minus signs indicate residues that were not determined. Leucine and isoleucine residues are indicated as

I/L and glutamine and lysine are shown as K/Q. PA-BJ - platelet aggregating protein from *B. jararaca* venom. (B) Comparison of the N-terminal sequence of protein PII-1A with those of other serine proteases. The letters in boldface indicate amino acids that differ. The degree (%) of homology with the different proteins is indicated on the right. The sequences were obtained from the SwissProt database <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>.





DISCUSSÃO

4. DISCUSSÃO

Assim como o veneno de outras serpentes do gênero , o veneno de *Bothrops lanceolatus* possui atividade proteolítica, hemorrágica, fosfolipásica, além de uma atividade esterásica muito marcante (Lôbo de Araújo et al, 1998). As enzimas esterolíticas nos venenos de serpentes têm sido comumente associadas a enzimas trombina símile (Kornalik, 1985; Teng et al., 1989). O veneno de *B. lanceolatus* não coagula plasma humano citratado, mas contém uma enzima trombina símile capaz de coagular fibrinogênio (Stocker et al, 1974; Lôbo de Araújo et al., 2001). Uma fosfolipase A₂ ácida foi purificada do veneno em questão (Lôbo de Araújo et al., 1994), sendo determinado que esta possui forte atividade anticoagulante, o que está de acordo com alguns efeitos do veneno na coagulação do sangue. Há poucos anos, Lôbo de Araújo et al (1998) purificaram e caracterizaram a principal enzima esterolítica do veneno de *B. lanceolatus*. A enzima purificada apresentou uma única banda em gel de SDS e em métodos imunquímicos, foi mostrado ainda que o peso molecular da enzima esterolítica é estimado em 39kDa, muito semelhante a enzimas trombina símile e fibrinogenases purificadas de venenos de diferentes serpentes (Markland and Damus, 1971; Holleman and Weiss, 1976; Nolan et al., 1976; Stocker and Barlow, 1976; Magalhães et al., 1981; Selistre and Giglio, 1987). Em comum com estas enzimas, a esterase de *B. lanceolatus* possui um resíduo de serina reativo, exibe forte atividade hidrolítica sobre substrato sintético TAME e consiste em uma cadeia simples de polipeptídeos.

No presente trabalho, nós usamos os dois passos iniciais da purificação da proteína usados por Lôbo de Araújo et al (1998), combinados com uma cromatografia em HPLC para obter a enzima esterolítica purificada do veneno de *B. lanceolatus*. A análise de espectrometria de massa Q-TOF mostrou uma proteína com peso molecular 10 kDa maior que a descrita inicialmente por Lôbo de Araújo et al (1998). Esta diferença pode ser devido a perda de carboidratos durante os passos de purificação ou durante a análise em espectrometria de massa. O processo de purificação aplicado neste trabalho é um pouco diferente do descrito originalmente por Lôbo de Araújo et al (1998). Além disso não está descartada a possibilidade de variação nos carboidratos contidos na proteína entre os diferentes lotes do veneno.

A seqüência amino-terminal mostrou uma homologia muito grande quando comparada com Ancrod (Mc Mullen et al. 1989), Vipera russeli proteinase (Tokunaga et al. 1988), Batroxobin precursor (Itoh et al. 1987) e Bothrombin (Nishida et al 1994). Uma homologia de 100% foi observada entre o 2^o e 12^o aminoácido da esterase de *B. lanceolatus* e os primeiros 11 aminoácidos de Ancrod. Setenta e um por cento da proteína isolada foi seqüenciada e ela mostra homologia com tripsina e outras serino proteases. Esta proteína tem 60% de homologia com PABJ, uma proteína com 30 kDa, proveniente de *B. jararaca*, com atividade de agregação plaquetária (Serrano et al, 1995). Os “gaps” observados durante o processo de seqüenciamento usando Q-TOF são devidos principalmente a carboidratos ligados à peptídeos após a proteólise.

A enzima esterolítica de *B. lanceolatus* mostra grande atividade coagulante muito discreta quando testada em plasma humano citratado ou fibrinogênio

purificado, mas degrada rapidamente cadeias α e β do fibrinogênio Lôbo de Araújo et al (1998). Isto sugere que a esterase purificada de veneno de *B. lanceolatus* pode promover anti coagulação por hidrólise das cadeias α e β do fibrinogênio e/ou fibrina. Atroxase, uma metaloproteinase purificada de *Crotalus atrox* (Willis and Tu, 1988) mostrou especificidade hidrolítica semelhante e promoveu efeito anti coagulante. A esterase de *B. lanceolatus* pode porém agir sinergicamente com fosfolipase A_2 aumentando a ação anticoagulante do veneno total. Um dos principais sintomas do paciente envenenado por *B. lanceolatus* é a presença de incoagulabilidade sangüínea. A fosfolipase A_2 anticoagulante e a fibrinogenase α - β . Ambas com ação anti-coagulante *in vitro* pode contribuir para este importante sintoma do envenenamento.

O componente central do sistema fibrinolítico é uma glicoproteína chamada plasminogênio que é produzido pelo fígado e está presente no plasma e em fluidos extravasculares. Plasminogênio é um zimógeno que quando quebrado parcialmente por ativador de plasminogênio é convertido na sua forma ativa, ou seja proteolítica, chamada plasmina. O alvo primário é a fibrina, mas também é capaz de degradar vários constituintes da matriz extracelular e converte um número de pró-hormônios e precursores de citocinas de sua forma ativa. A formação da plasmina ocorre preferencialmente na superfície da fibrina que oferece sítios de ligação para plasminogênio e seu ativador principal no sangue, t-PA. Esta ligação estimula ativação do plasminogênio, mas também localiza ação da plasmina em sítios de formação da fibrina as quais promovem lise eficiente do coágulo.

Devido ao fato de a plasmina quebrar uma cadeia polipeptídica preferencialmente após a lise de resíduos, novos resíduos da lise do C-terminal são gerados na rede de fibrina o que representa sítios de ligação adicionais para plasminogênio. A parte principal do plasminogênio dentro do coágulo liga-se na fibrina e o processo fibrinolítico é significativamente acelerado (Suenson et al., 1984).

O plasminogênio tem dois ativadores fisiológicos ativador de plasminogênio tecidual (t-PA) e ativador de plasminogênio tipo uroquinase (u-PA). Estes ativadores são serino proteases e ativam plasminogênio por quebrar ligações peptídicas simples.

A esterase de *B. lanceolatus* mostrou atividade direta sobre S2251. Este composto é um substrato cromogênico específico para plasmina e estreptoquinase-plasminogênio ativado (Hemker, 1983). Nossos resultados usando S2251 confirmam a atividade fibrino(geno)lítica da enzima esterolítica purificada de *B. lanceolatus* além de a caracterizar como uma enzima plasmina símile.

De modo semelhante, a proteína homóloga Ancrod também apresenta alta atividade fibrinolítica. A terapia com Ancrod resulta em formação de grande quantidade de fibrina solúvel. Fibrina solúvel apresenta efeito catalítico em ativação de plasminogênio induzida por t-PA. A plasmina formada causa degradação da fibrina e também de fibrinogênio (Dempfle et al., 2000).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, A. R. P. de; BOMFIM, M. G. M.; BARRAL NETTO, M. Farmacologia dos Venenos Animais. In: Silva P. **Farmacologia**. 6^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. p. 1179 – 1189.
- AMARAL, C. F. S. Cuidados Intensivos nos Acidentes por Animais Peçonhentos. In: **Animais Peçonhentos no Brasil: Biologia, Clínica e terapêutica dos acidentes**. São Paulo: Savier, 2003. p. 394 – 401.
- AMARAL, C. F. S.; REZENDE, N. A. Tratamento das Complicações dos Acidentes por Animais Peçonhentos In: Barraviera B. **Venenos Animais – Uma Visão Integrada**. Rio de Janeiro: EPUC (Editora de Publicações Científicas Ltda), 1994. p. 345 – 360.
- ANAI, K.; SUGIKI, M.; YOSHIDA, E.; MARUYAMA, M. Inhibition of a snake venom hemorrhagic metalloproteinase by human and rat alpha-macroglobulins. **Toxicon**, 36: 1127-1139, 1998.
- ARRUDA, V. A.; GUIMARÃES, A. Q.; HYSLOP, S.; FERREIRA DE ARAÚJO, P. M.; BON, C.; LÔBO DE ARAÚJO, A. *Bothrops lanceolatus* (Fer de Lance) venom stimulates leukocyte migration into the peritoneal cavity of mice. **Toxicon**, 41: 99 – 107, 2003.
- ASHE, J. S.; MARX, H. Phylogeny of the viperine snakes (*Viperinae*): Part II. Cladistic analysis and major lineages. **Fieldiana Zool**, 52: 1-23, 1988.

- AURELL, L.; FRIBERGER, P.; KARLASSON, G.; GLAESON, G. A new sensitive and highly appecific chromogenic peptide substrate for factor Xa. **Thromb. Res**, 11: 595, 1977.
- BACHMAN, F.; DUCERT, F.; KOLLER, F. The Stuart-prower Factor Assay and Clinical Significance. **Thromb. Diathes. Haemorrh. (Stutt)**, 2: 1-2, 24, 1959.
- BAJWA, S. S.; MARKLAND, F. S.; RUSSEL, F.E. Fibrinolytic enzyme(s) in western diamondback rattlesnake (*Crotalus atrox*) venom. **Toxicon**, 18: 285-90, 1980.
- BAKHLE, Y. S. Conversion of angiotensin I to angiotensin II by cell free extracts of dog lung. **Nature**, 220: 919, 1968.
- BARRAVIERA, B.; PEREIRA, P. C. M. Acidentes por Serpentes do Gênero *Bothrops* In: BARRAVIERA B. **Venenos Animais – Uma Visão Integrada**. Rio de Janeiro: EPUC (Editora de Publicações Científicas Ltda), 1994. p. 261 – 280.
- BELL, W.R. JR. Defibrinogenating enzymes. **Drugs**, 54: 18-30 1997.
- BENOWITZ, N. L. Agentes Anti-hipertensivos. In: KATZUNG, B. G. **Farmacologia Básica e Clínica**. 8^a ed, Rio de Janeiro: Guanabara koogan, 2003. p. 137 – 159.
- Bíblia Sagrada: Edição Pastoral– Sociedade Bíblica Católica e Paulus – 1990, 41^a impressão – 2000.
- BJARNASON, J. B.; HAMILTON, D.; FOX, J. W. Studies on the mecanism of hemorrhage production by five proteolytic toxins from *Crotalus atrox* venos. **Biol. Chem. Hoppe-seyler**, 369: 121-129, 1988.

- BJARNASON, J. B.; FOX J. W. Hemorrhagic toxins from snake venoms. **J. Toxic – Toxin**, Ver.7: 121-209, 1989.
- BRASIL, V. **La défense contre lóphidisme**. 2^a ed., São Paulo, Pocaí& Weiss:, 1911.
- BUCHER, B.; CANONGE, D.; THOMAS, L.; TYBURN, B.; ROBBE-VICENT, A.; CHOUMER, V.; BON, C.; KETTERLÉ, J.; LANG, J. Clinical indicators of envenoming and serum levels of venom antigens in patients bitten by *Bothrops lanceolatus* in Martinique. **Trans R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, 91: 186-190, 1997.
- CADLE J. E. Geographic distribution: problems in phylogeny and zoogeography. In: SEIGEL R.; COLLINS J.; NOVAK S. , editors. **Snakes: Ecology and Evolutionary Biology**. New York: Macmillian Publishing Co., 77-105, 1987.
- CAMPBELL J. A.; LAMAR W. W. Lanceheads, Genus *Bothrops* Wagler. In: **The Venomous Reptiles of Latin America**. Eds Campbell J. A. e Lamar W. W. Ithaca: Comstock Publishing Associates. p. 180 – 226, 1989.
- CARDOSO D. F.; YAMAGUCHI I. K.; SILVA A. M. M. da. Produção de Soro Antitoxina e Perspectivas de Modernização por Técnicas de Biologia Molecular In: CARDOSO, J. L. C.; FRANÇA, F. O. de S.; WEN, F. H.; MÁLAQUE, C. M. S.; HADDAD JUNIOR V. **Animais Peçonhentos no Brasil: Biologia, Clínica e terapêutica dos acidentes**. São Paulo. Savier, 2003. p. 367 – 363.
- CARDOSO J. L. C. A Fitoterapia Antiveneno na Medicina Brasileira In: CARDOSO, J. L. C.; FRANÇA, F.O. S.; WEN, F. H.; MÁLAQUE, C. M. S.; HADDAD JUNIOR, V. **Animais Peçonhentos no Brasil: Biologia, Clínica e terapêutica dos acidentes**. São Paulo. Savier, 2003. p. 429 – 433.

- CARDOSO J. L. C. José de Anchieta e as Cartas **Animais Peçonhentos no Brasil: Biologia, Clínica e terapêutica dos acidentes**. In: CARDOSO, J. L. C.; FRANÇA, F.O. S.; WEN, F. H.; MÁLAQUE, C. M. S.; HADDAD JUNIOR, V. São Paulo. Savier, 2003. p. 456 – 457.
- CARDOSO J. L. C.; WEN F. H. Introdução ao ofidismo In: CARDOSO, J. L. C.; FRANÇA, F.O. S.; WEN, F. H.; MÁLAQUE, C. M. S.; HADDAD JUNIOR, V. **Animais Peçonhentos no Brasil: Biologia, Clínica e terapêutica dos acidentes**. São Paulo. Savier, 2003. p. 3 – 5.
- COGO, J.C.; PRADO-FRANCESCHI, J.; CRUZ-HÖFLING, M. A.; CORRADO, A. P.; RODRIGUES-SIMIONI, L., Effect of *Bothrops insularis* venom on mouse and chick nerve-muscle preparations . **Toxicon**, 31: 1237 – 1247, 1993.
- CUSHMAN, D. W.; CHEUNG, H. S.; SABO, E. F. & ONDETTI, M. A. Design of potent competitive inhibitors of angiotensin-converting enzyme carboxyalkanoyl and mercaptoalkanoyl amino acids. **Biochemistry**, 16: 5484-5491, 1977.
- DAOUD, E.; TU, A. T.; EL-ASMAR, M.F. Isolation and characterization of an anticoagulant proteinase, cerastase F-4, from *Cerastes cerastes* (*Egyptian sand viper*) venom. **Thromb Res.**, 42: 55-62, 1986.
- DEMPFLE, C. E.; KOHL, R.; HARENBERG, J.; KIRSCHSTEIN, W.; SCHLAUCH, D. & HEENE, D. L. Coagulopathy after snake bite by *Bothrops neuwiedi* case report and results of in vitro experiments. **Blut**, 61: 369-374, 1990.
- DENSON, K. W. The specific assay of Prower-Stuart Factor and Factor VII. **Acta Haemat.**, 25: 105, 1961.
- DENSON, K. W. E & ROUSSEAU, W.E. Separation of the coagulant fractions of *Bothrops jararaca* venom. **Toxicon**, 8: 15, 1970.

- FARIA, L. de; ANTUNES E.; BON, C.; LÔBO de ARAÚJO, A. Pharmacological characterization of the paw edema induced by *Bothrops lanceolatus* (Fer de lance) venom. **Toxicon**, 39: 825 – 830, 2001.
- FERRAREZZI, H. Uma sinopse dos gêneros e classificação das serpentes (*Squamata*) I. Scolecophidia e Alethyinophidia não colubrídeos. In: NASCIMENTO, L. et al editors. **Herpetologia no Brasil**. Belo Horizonte: Fund. Biodiversitas & Fund. Ezequiel Dias, 669-80. p. 1994.
- FERREIRA, S. H.; ROCHA e SILVA, M. Potention of bradykinin and eledoisin by BPF (bradykinin potentainting factor) from *Bothrops jararaca* venom. **Experientia**, 21: 347-349, 1965.
- FERREIRA, S. H. A bradykinin potentiating factor (bpf) present in the venom of *Bothrops jararaca*. **Brit. J. Pharmac.**, 24: 163, 1965.
- FRANÇA, F. O. de S.; MÁLAQUE, C. M. S. Acidente Botrópico In: CARDOSO, J. L. C.; FRANÇA, F.O. S.; WEN, F. H.; MÁLAQUE, C. M. S.; HADDAD JUNIOR, V. **Animais Peçonhentos no Brasil: Biologia, Clínica e terapêutica dos acidentes**. São Paulo. Savier, 2003. p. 72 – 86.
- FRANCESCHI, A.; RUCAVADO, A.; MORA, N.; GUTIÉRREZ, J.M. Purification and characterization of BaH4, a hemorrhagic metalloproteinase from the venom of the snake *Bothrops asper*. **Toxicon**, 38: 63 – 77, 2000.
- FRANCO, F. L. Origem e Diversidade das Serpentes In: CARDOSO, J. L. C.; FRANÇA, F.O. S.; WEN, F. H.; MÁLAQUE, C. M. S.; HADDAD JUNIOR, V. **Animais Peçonhentos no Brasil: Biologia, Clínica e terapêutica dos acidentes**. São Paulo. Savier, 2003. p. 13 – 32.

- FRIEDMAN, M.; KRULL, L.H.; CAVINS, J. The chromatographic determination of cystine and cysteine residues in proteins as s- β -(4-pyridylethylcysteine). **J. Biol. Chem.**, 215: 3868 – 71, 1970.
- FURUKAWA, Y. & HAYASHI, K. Factor X converting and thrombin-like activities of *Bothrops jararaca* venom. **Toxicon**, 15: 97 – 10, 1977.
- GRANELLI-PIPERNO, A.; REICH, E. A study of proteases and protease-inhibitor complexes in biological fluids. **J Exp Med**, 148: 223 – 34, 1978.
- GUIMARÃES, A. Q.; CRUZ-HÖFLING, M. A.; ARAÚJO, P. M. F.; BON, C.; LÔBO de ARAÚJO; A. Pharmacological and histopathological characterization of *Bothrops lanceolatus* (Fer de lance) venom – induced edema. **Toxicon**, 57: 284 – 291, 2004.
- GUTIÉRREZ, J. M.; CHAVES, F.; BOLÃNOS, R.; CERDAS, L.; ROJAS, G., ARROYO O.; PORTILLA. Neutralization de los efectos locales Del veneno de *Bothrops asper* por um antiveneno polivalente. **Toxicon**, 19: 439 - 500, 1981.
- GUTIÉRREZ, J. M.; GÉNE, J. A. ROJAS, G.; CERDAS, L. Neutralization of proteolytic and hemorrhagic activities of Costa Rican snake venoms by a polyvalent antivenom. **Toxicon**, 23: 887 - 893, 1985.
- GUTIÉRREZ, J. M.; LOMONTE, B. Local tissue damage induced by *Bothrops* snake venoms. **Mem. Inst. Butantan**, 51: 211 – 223, 1989.
- GUTIÉRREZ, J. M.; ROJAS, G.; CERDAS, L. Ability of a polyvalent antivenom to neutralize the venom of *Lachesis muta* melanocephal, a new Costa Rican subspecies of the bushmaster. **Toxicon**, 25: 713 - 720, 1987.

- GUYTON A. C.; HALL J. E. Hemostasia e coagulação sangüínea. In: GUYTON A. C., HALL J. E. **Tratado de Fisiologia**. 10^a ed, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. p. 394 - 404.
- HANDY D. L. Alternative in the Field Management of Venomous Snakebite Molecular In: CARDOSO, J. L. C.; FRANÇA, F.O. S.; WEN, F. H.; MÁLAQUE, C. M. S.; HADDAD JUNIOR, V. **Animais Peçonhentos no Brasil: Biologia, Clínica e terapêutica dos acidentes**. São Paulo. Savier, 2003. p. 402 – 428.
- HELUANY, N. F., HOMIS BRADEBURGO, M. I., GIGLIO, J. R., PRADO-FRANCESCHI, J., RODRIGUES-SIMIONI, L., Effects induced by bothropstoxin. A component from *Bothrops jararacussu* snake venom, on mouse and chick muscle preparation. **Toxicon**, 30: 1230 – 1210, 1992.
- HESSEL, B. & BLOMBACK, B. The proteolytic action of snake venom enzymes arvin and reptilase on N-terminal chain fragment of human fibrinogen. **FEBS Lett.**, 18: 318 - 320, 1971.
- HILL-EUBANKS, D.C.; PARKER, C.G.; LOLLAR, P. Differential proteolytic activation of factor VIII-von Willebrand factor complex by Thrombin. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 86: 6508 – 6515, 1989.
- HOGUE, A. R.; ROMANO HOGUE, SARWL Poisonous snakes of the world. Part I – Check list of the pit vipers *Viperoidea*, *Viperidae*, *Crotalinae*. **Mem. Inst. Butantan**: 42/43, 179-310, 1978/1979.
- HOLLEMAN, W. H., WEISS, L. J. The thrombin-like enzyme from *Bothrops atrox* venom. **J. Biol. Chem.**, 251: 1663 – 1669, 1976.

- IWAGANA, S.; SUZUK, T. Enzymes in snake venom. In: LEE, C. Y., **Handbook of experimental pharmacology**. Vol. 52. Snake venom. Berlin, Springer, 1979, p. 61 – 158.
- JESPERSEN, J. & ASTRUP, T. A study of fibrin plate assay of fibrinolytic agents. Optimal conditions, reproducibility and precision. **Haemostasis**, 13: 301-315. 1983.
- JIM, J.; SAKATE, M. Biologia das Serpentes In: Barraviera, B. **Venenos Animais – Uma Visão Integrada**. Rio de Janeiro: EPUC (Editora de Publicações Científicas Ltda), 1994. p. 109 – 134.
- JORGE, M. T.; RIBEIRO, L. A. Acidentes por serpentes peçonhentas no Brasil. **Rer. Ass. Med Brasil**, 36: 66 – 77, 1990.
- KAMIGUTI, A. S.; MOURA-DA-SILVA, A. M.; LAING, G. D.; KNAPP, T.; ZUZEL, M.; CRAMPTON, J.M.; THEAKSTON, R. D. Collagen-induced secretion-dependent phase of platelet aggregation is inhibited by the snake venom metalloproteinase jararhagin. **Biochim Biophys Acta.**, Apr17: 209 –217, 1997.
- KAMIGUTI, A. S.; CARDOSO, J. L.; THEAKSTON, R. D.; SANO-MARTINS, I. S.; HUTTON, R. A.; RUGMAN, F. P.; WARRELL, D. A.; HAY, C. R. Coagulant and haemorrhage in human victims of *Bothrops jararaca* envenoming in Brasil. **Toxicon**, 29: 961 – 972, 1991.
- KAMIGUTI, A. S.; HAY, C. R.; ZUZEL, M. Inhibition of collagen-induced platelet aggregation as the result of cleavage of $\alpha 2 \beta 1$ -integrin by snake venom metalloproteinase jararhagin. **Biochem. J.**, 320: 635 – 641, 1996.
- KAMIGUTI, A. S.; RUGMAN, F. P.; THEAKSTON, R. D.; FRANCA, F. S.; ISHII, H.; HAY C. R. The role venom haemorrhagin in spontaneous bleedind in

- Bothrops jararaca* envenoming. **Thromb. And Haemost.**, 67: 484 – 488, 1992.
- KAMIGUTI, A. S.; MATSUNAGA, S.; SPIR, M.; SANO-MARTINS, I. S.; NAHAS, L. Alteration of the blood coagulation system after accidental human inoculation by *Bothrops jararaca* venom. **Braz. J. med. Biol. Res**, 19: 199 – 204, 1986.
- KAMIGUTI, A.S.; SLUPSKY, J. R.; ZUZEL, M.& HAY, C.R Properties of fibrinogen cleaved by jararhagin, a metalloproteinase from the venom of *Bothrops jararaca*. **Thromb. Haemost.**, 72: 244 – 249, 1994.
- KATZUNG, B. G.; CHATTERJEE, K. Vasodilatadores & o Tratamento da Angina de Peito. In: KATZUNG, B. G. **Farmacologia Básica e Clínica**. 8^a ed, Rio de Janeiro: Guanabara koogan, 2003. p. 161 –175.
- KATZUNG, B. G.; PARMLEY, W. W. Glicosídeos Cardíacos & Outras Drogas Utilizadas na Insuficiência Cardíaca Congestiva. In: KATZUNG, B. G. **Farmacologia Básica e Clínica**. 8^a ed, Rio de Janeiro: Guanabara koogan, 2003. p. 176 – 192.
- KIRBY, E .P.; NEWIEROWSKI, S.; STOCKER, K.; KETTNER, C.; SHAW, E.; BUDZINSKI, T. M. Thrombocytin, a serine protease from *Bothrops atrox* venom, 1. Purification and characterization of the enzyme. **Biochemistry**, 18: 3564 – 3570, 1979.
- KOMORI, Y.; HAGIHARA, S.; TU, A. T. Specificity of hemorrhagic proteinase from *Crotalus atrox* (western diamondback rattlesnake) venom. **Biochim Biophys Acta**, 829: 127 – 30, 1985.

- KRAUS, F.; MINK, D. G.; BROW, W. M. Crotaline intergeneric relationships base on mitocrondrial DNA sequence data. **Copeia**, 4: 463 – 773, 1996.
- LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, 227: 680 – 685, 1970.
- LÔBO DE ARAÚJO, A.; DONATO, J. L.; MORENO, R. A.; PRADO-FRANCESCHI, J. Comparison of the phospholipase A₂, blood-clotting, caseinolytic and hemorrhagic activities of some *Bothrops* snake venoms. **Toxicon**, 28: 601, 1990.
- LÔBO DE ARAÚJO, A.; KAMIGUTI, A.; BON, C. Coagulant and anticoagulant activities of *Bothrops lanceolatus* (Fer de lance) venom. **Toxicon**, 39: 371 – 375, 2000.
- LÔBO DE ARAÚJO, A.; RADVANYI, F. Determination of phospholipase A₂ activity by a colorimetric assay using a pH indicator. **Toxicon**, 25: 1181 – 1188, 1987.
- LÔBO DE ARAÚJO, A.; RADVANYI, F.; BON C Purification of an acidic phospholipase A₂ from *Bothrops lanceolatus* (Fer de lance) venom: molecular and enzymatic properties. **Toxicon**, 32: 1069 – 1081, 1994.
- LÔBO DE ARAÚJO, A.; SOUZA, A. O.; CRUZ-HÖFLING, M. A.; FLORES, C. A.; BON, C. *Bothrops lanceolatus* (Fer de lance) venom induces edema formation and increases vascular permeability in the mouse hind paw. **Toxicon**, 38: 209 – 221, 2000.
- LÔBO DE ARAÚJO, A.; KAMIGUTI, A.; BON, C. Coagulant and anticoagulant activities of *Bothrops lanceolatus* (fer de lance) venom. **Toxicon**, 39: 371 – 375, 2001.

- LÔBO DE ARAÚJO, A.; DONATO, J. L.; BON, C. Purification from *Bothrops lanceolatus* (Fer de lance) venom of a fibrino(geno)lytic enzyme with esterolytic activity. **Toxicon**, 36: 745 – 758, 1998.
- LÔBO DE ARAÚJO, A.; DONATO, J. L.; LEITE, G. B.; FRANCESCHI, J. P.; FONTANA, M. D.; BON, C.; SIMIONI, L. R. Neuromuscular action of *Bothrops lanceolatus* (Fer de lance) venom and a caseinolytic fraction. **Toxicon**, 40: 1283 – 1289, 2002.
- LOMONTE, B.; GUTIÉRREZ, J. M.; MORENO, E.; CERDAS, L. Antibody neutralization of a myotoxin from the venom oh *Bothrops asper* (terciopelo). **Toxicon**, 25: 443 - 450, 1987.
- LOWRY, O. H.; ROSENBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.**, 193: 265 – 275, 1951.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE – FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE. **Manual de Diagnóstico e Tratamento dos Acidentes por Animais Peçonhentos**. Brasília, DF, 1998. 131p.
- MARKLAND, F. S. Rattlesnake venom enzymes that interact with components of the hemostatic system. **J. Toxicol. Toxin ver.**, 2: 119-160, 1983.
- MARKLAND JUNIOR, F. S. Snake Venoms, **Drugs.**, 54 suppl 3: 1-10, 1997.
- MARKLAND, F. S., DAMUS, P. S. Purification and properties of a thrombin-like enzyme from the venom of *Crotalus adamantus* (eastern diamondback rattlesnake) **J. Biol. Chem.**, 246: 6460 – 6473, 1971.

- MARKWELL, M. A.; HASS, S. M.; BIEBER, L. L.; TOLBERT, N. E., A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples. **Anal Biochem.**, 87: 206 –210,1978.
- MARQUES, O. A. V.; SAZIMA, I. História Natural das Serpentes In: CARDOSO, J. L. C.; FRANÇA, F.O. S.; WEN, F. H.; MÁLAQUE, C. M. S.; HADDAD JUNIOR, V. **Animais Peçonhentos no Brasil: Biologia, Clínica e terapêutica dos acidentes.** São Paulo. Savier, 2003. p. 62 – 71.
- MARUYAMA, M.; SUGIKI, M.; YOSHIDA, E.; SHIMAYA, K.; MIHARA, H. (B). Broad substrate specificity of sanke venom fibrinolytic enzymes: Possible role in haemorrhage. **Toxicon**, 30: 1387-1397, 1992.
- MARUYAMA, M.; SUGIKI, M.; YOSHIDA, E.; MIHARA, H.; NAKAJIMA, N. (A). Purification Characterization of two fibrinolytic enzymes from *Bothrops jararaca* (jararaca) venom. **Toxicon**, 30: 853 – 864, 1992.
- MARUYAMA, M.; TANIGAWA, M.; SUGIKI, M.; YOSHIDA, E.; MIHARA, H. Purification and characterization of low molecular weigth fibrinolytic/hemorrhagic enzymes from snake (*Bothrops jararaca*) venom. **Enzyme Protein**, 47: 124-135, 1993.
- MARX, H.; ASHE, J. S.; WATROUS, L. E. Phylogeny of the viperine snakes (*Viperinae*): Part I . Charater analysis. **Fieldiana Zool**, 51:iv 1-16, 1988.
- MELGAREJO, A. R. Serpentes Peçonhentas do Brasil In: CARDOSO, J. L. C.; FRANÇA, F.O. S.; WEN, F. H.; MÁLAQUE, C. M. S.; HADDAD JUNIOR, **Animais Peçonhentos no Brasil: Biologia, Clínica e terapêutica dos acidentes.** São Paulo. Savier, 2003. p. 33 – 61.
- MINTON, S. A., WEINSTEIN, S. A. Protease activity and lethal toxicity of venoms from some little known rattlest. **Toxicon**, 22: 828 – 830, 1984.

- NAHAS, L.; DENSON, K. W. E.; MACFARLANE, R. G. A study of the coagulant action of eight snake venoms. **Thromb. Diath. Haemorrh.**,12: 355 – 367 1964.
- NAHAS, L.; KAMIGUTI, A. S.; BARROS, M. A. R. Thrombin-like and factor X-activator components of *Bothrops* snake venoms. **Thromb.and Haemost. (Stuttg)**, 41: 314 – 328, 1979.
- NIEWIAROWSKI, S.; KIRBY, E. P.; BUDZYNSKI, T. M.; STOCKER, K. Thrombocytin, a serine protease from *Bothrops atrox* venom. Interaction with platelets and plasma-clotting factors. **Biochemistry**, 18: 3570 – 3577, 1979.
- NISHIDA, S.; FUJIMURA, Y.; MIURA, S.; OSKI, Y.; USAMI, Y.; SUZUKI, M.; TITANI, K.; YOSHIDA, E.; SUGIMOTO, M.; YOSHIOKA, A.; FUKUI, H. Purification and characterization of bothrombin, a fibrinogen-clotting serine-protease from venom *Bothrops jararaca*. **Biochemistry**, 33: 1843 – 1849, 1994.
- NOLAN, C., HALL, L., BARLOW, G.H. Ancrod, the coagulation enzyme from Malayan pit viper (*Agkistrodon rhodostoma*) venom. **Meth. Enzymol.**, 45: 205 – 214, 1976.
- ONDETTI, M. A.; WILLIAMS, N. J.; SABO, E. F.; PLUSCEC, J.; WEAVER, E. R.; KOCY, O. Angiotension converting enzyme inhibitors from the venom of *Bothrops jararaca*. Isolation, elucidation of structure and synthesis. **Biochemistry**, 10; 4033,1971.
- RIBEIRO, L. A.; JORGE, M. T. Alteração do tempo de coagulação sangüínea em pacientes picados por serpente *Bothrops jararaca* adulta e filhote. **Rev. Hosp. Clin. Fac. Med.**,44: 143 – 145, 1989.

- ROSENFELD, G. Symptomatology, pathology and treatment of snake bites in South America. In: BÜCHREL, W.; BUCKLEY, E.; DEULOFEU, V. **Venomous animal and their venoms**. New York: Academic Press, 1971 Vol.1, p.345-403
- ROSENFELD, G.; NAHAS, L. AND KELEN, E. M. A. Coagulant, proteolytic and hemolytic properties of some snake venoms. In: **Venomous animals and their venoms**. Vol.I. eds BÜCHERL, W.; BUCKLEY, E.; DEULOFEU, V. New York – London, Academic Press, 1968. P. 229 - 273.
- SANCHEZ, E. F.; BUSH, L. R.; SWENSON, S.; MARKLAND, F. S. Chimeric fibrolase: covalent attachment of na rgd-like peptide to create a potentially more effective thrombolytic agent. **Thromb. Res.**, 87: 289- 302, 1997.
- SEGEL, I.H. **Enzyme kinetics: Behavior and Analysis of Rapid Equilibrium and Steady- State Enzyme System**. California: A Wiley-Intescience Publication, 1975.
- SERRANO, S. M. T.; SAMPAIO, C. A. M.; MANDELBAUM, F. R. Basic proteinases from *Bothrops moojeni* (caissara) venom-II. Isolation of the metalloproteinase MPB. Comparasion of the proteolytic activity on natural substrates by MPB, MSP 2. **Toxicon**, 31: 483 – 492, 1993.
- STOCKER, K. F. Comparison of snake venoms, In: STOCKER, K. F. **Medical Use Snake Venom Proteins**, Boca Raton: ed. CRC Press., 1990, p. 33-57.
- STOKER, K.; BARLOW, G. H. The coagulant enzyme from *Bothrops atrox* venom (batroxobin). **Meth. Enzymol.**, 45: 214 – 223, 1976.
- STROKA, A., DONATO. J. L., BON, C., HYSLOP, S., LÔBO DE ARAÚJO, A. Purification and characterization of a hemorrhagic metalloproteinase from

Bothrops lanceolatus (Fer-de-lance) snake venom. **Toxicon**:45, 411 – 420, 2005.

SUGIKI, M.; MARUYAMA, M.; YOSHIDA, E.; MIHARA, H.; KAMIGUTI, A. S.; TEAKSTON, D. G. Enhancement of plasma fibrinolysis in vitro by jararhagin, the haemorrhagic metalloproteinase in *Bothrops jararaca* venom. **Toxicon**: 33 , 1605 – 1617, 1995.

SUGIKI, M.; YOSHIDA, E.; ANAI, K.; MARUYAMA, M. Activation of single-chain urokinase-type plasminogen activator by a hemorrhagic metalloproteinase, jararafibrase I, in *Bothrops jararaca* venom. **Toxicon** ,36: 993 – 1000, 1998.

TANIGAWA, M.; MARUYAMA, M.; SUGIKI, M.; SHIMAYA K.; ANAI, K.; MIHARA, H. Clearance and distribution of a haemorrhagic factor purified from *Bothrops jararaca* venom in mice. **Toxicon**, 32: 583 – 593, 1994.

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

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

THOMAS, L.; TYBURN, B.; KETTERLÉ, J.; RIEUX, D.; GUARNIER, D.; SMADJA, D. Troubles de la coagulation et thromboses induites par la morsure di serpent (*B. lanceolatus*) chez l'homme em Martinique. **Réanim. Urgence**, 3: 253, 1994.

- VARANDA, E. A.; GIANNINI, M. J. S. M. Bioquímica de Venenos de Serpentes In: BARRAVIERA B. **Venenos Animais – Uma Visão Integrada**. Rio de Janeiro: EPUC (Editora de Publicações Científicas Ltda), 1994. p. 205 - 223.
- VON KLOBUSTITZKY, D.; KONIG, P. Estudos bioquímicos sobre os venenos da serpentes do gênero *Bothrops*. III. Separação do princípio anticoagulante dentre a bothopoxina e outras substâncias contidas na secreção natural. **Mem. Inst. Butantan**, 10: 223 – 236, 1935/36.
- WEN F. H. Soroterapia In : CARDOSO, J. L. C.; FRANÇA, F. O. de S.; WEN, F. H.; MÁLAQUE, C. M. S.; HADDAD JUNIOR V. **Animais Peçonhentos no Brasil: Biologia, Clínica e terapêutica dos acidentes**. São Paulo. Savier, 2003. p. 380 – 393.
- WÜSTER, W.; GOLAY, P.; WARRELL, D. A Synopsis of recent developments in *venomous* snake systematics. **Toxicon**, 35: 319 – 340, 1997.
- ZAMUNÉR, S. R., PRADO-FRANCESCHI, L., The screening of *Bothrops* venom for neurotoxic activity using the chick biventer cervicis preparation. **Toxicon**, 34: 314 –315, 1996.
- ZINGALI, R. B.; JANDROT-PERRUS, M.; GUILLIN, M. C.; BON, C. Bothrojaracin, a new thrombin inhibitor isolated from *Bothrops jararaca* venom; characterization and mechanism of thrombin inhibition, **Biochemistry**, 32: 10794 – 10802, 1993.

Banco de dados SwissProt. Disponível em:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi> Acesso em: 26 ago.2003).