

JOSÉ LUIZ DONATO
Biólogo



Este exemplar corresponde à redação
final da tese defendida pelo candidato
José Luiz Donato e aprovada pela
comissão julgadora *Franceschi*
3/9/91

**"CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E BIOLÓGICA DE UMA FRAÇÃO
ESTERÁSICA ISOLADA DA PEÇONHA DE *BOTHROPS
LANCEOLATUS* (Lacépède)"**

Orientadora: Profa. Dra. Júlia Prado Franceschi *

tese apresentada ao Instituto de Biologia
da Universidade Estadual de Campinas
para obtenção do título de Mestre em
Ciências Biológicas na área de Bioquímica.

Universidade Estadual de Campinas
Campinas, SP - Brasil
1991

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Profa. Dra. Júlia Prado Franceschi, pelas sugestões de inestimável valor, pela orientação e amizade nesses anos de convivência.

Aos professores Avelino Rodrigues de Oliveira, Hiroshi Aoyama e Maria Sumiko Arita Matsuura, pelas críticas e valiosas sugestões ao presente trabalho, formuladas por ocasião de sua análise prévia.

À Profa. Dra. Albetiza Lôbo de Araújo, pelas discussões e pela utilização do laboratório, equipamentos e reagentes, que contribuíram para a realização deste trabalho.

Ao Dr. Cassian Bon do Instituto Pasteur, pelo fornecimento da peçonha de *Boitrops lanceolatus*.

Ao Dr. Gilberto de Nucci, pela utilização de seus laboratórios e equipamentos.

A Antonio Vilson dos Santos e à Gildo Bernardo Leite, pelo auxílio técnico nos testes com animais e na organização do laboratório.

Aos amigos do Departamento de Farmacologia, em especial à José Carlos Cogo, Ronilson A. Moreno, Aldete Zapelline e Omar M.

Leite de Barros, pelo dia-a-dia, incentivo e discussão dos experimentos.

Aos meus companheiros do curso de Mestrado, pelos bons e alegres momentos divididos e pelo incentivo nas horas incertas.

A LUCIA SIMAS PARENTONI, pelo companheirismo e carinho vividos em todos os momentos desse último ano.

A Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES) e ao Fundo de Apoio ao Ensino e Pesquisa (FAEP), pelo auxílio financeiro para a realização deste trabalho.

ABREVIATURAS

DEAE	dietilaminoetil
BAA	amida de benzoil-L-arginina
BAEE	éster etil de benzoil-L-arginina
DFF	fluorofosfato de diisopropila
EDTA	ácido etilenodiaminotetraacético
kDa	quilodaltons
LEE	éster etil de L-lisina
NIH	National Institute of Health
PMSF	fluoreto de fenilmetilsulfonila
SDS	dodecilsulfato de sódio
TAME	éster metil de p-toluenosulfonil-L-arginina
TCA	ácido tricloroacético
Tris	tris (hidroximetil)-aminometano

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO	01
2. MATERIAIS E MÉTODOS	11
2.1. Fracionamento da peçonha de <i>Bothrops lanceolatus</i> ...	11
2.1.1. Cromatografia de exclusão em Sephadex G-100 .	11
2.1.2. Cromatografia de troca iônica	12
2.1.3. Refiltração em Sephadex G-75	13
2.2. Atividade caseinolítica	13
2.3. Atividade esterásica	14
2.4. Atividade fosfolipásica	15
2.5. Atividade coagulante	16
2.5.1. Atividade coagulante sobre plasma	16
2.5.2. Atividade coagulante sobre fibrinogênio	17
2.6. Atividade hemorrágica	17
2.7. Eletroforese de proteínas	18
2.8. Especificidade de hidrólise das cadeias do fibrinogênio	20
2.9. Obtenção do antissoro específico para a F-II-1a	21
2.10. Imunodifusão e imunoeletroforese	22
2.11. Valores de Km e velocidade máxima da fração F-II-1a	23
2.12. Inibição da atividade esterásica da fração F-II-1a	23
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	24
3.1. Estudo das atividades enzimáticas e biológicas das peçonhas de <i>Bothrops</i> spp	24

3.2. Isolamento e caracterização de uma fração esterasica da peçonha de <i>B. lanceolatus</i>	30
4. CONCLUSÕES	53
5. RESUMO	55
6. SUMMARY	57
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59

1. INTRODUÇÃO

Peçonhas de ofídios contêm uma mistura de proteínas que, em geral, corresponde a aproximadamente 90% do seu peso seco. Os componentes em menor concentração são peptídeos, organofosforados, sais minerais e diversos íons metálicos e não metálicos. Além das proteínas com atividades tóxicas, as peçonhas ofídicas podem conter proteínas com atividades enzimáticas não relacionadas à toxicidade. Os peptídeos e substâncias não proteicas possuem efeitos biológicos distintos, que podem ser notadamente tóxicos em doses elevadas (ROSENFELD et al., 1968).

Em geral, peçonhas ofídicas contêm grande número de enzimas. As mais comumente encontradas são: acetilcolinesterase, lecitinase ou fosfolipase A, proteinases, esterases, L-amino ácido oxidases, dipeptidases, desoxirribonucleases, ribonucleases, enzimas tipo trombina, entre outras. Determinadas enzimas são características de famílias, gêneros ou mesmo espécies de serpentes. A peçonha das serpentes da família Elapidae é rica em acetilcolinesterase e pobre em enzimas tipo trombina (ROSENFELD et al., 1968), enquanto que as serpentes da família Viperidae possuem peçonha rica em proteinases e praticamente desprovida de acetilcolinesterase (NAKAR et al., 1986).

Nas diversas espécies de Viperidae, as proteinases geralmente estão relacionadas a atividades biológicas

específicas, tais como: atividade hemorrágica (BJARNASON and TU, 1978; OVADIA, 1978; CIVELLO et al., 1983; MANDELBAUM et al., 1984), atividade liberadora de bradicinina (SUGIHARA et al., 1981) e atividade tipo trombina (MARKLAND and DAMUS, 1971; OUYANG and YANG, 1974; SUGIHARA et al., 1978). As proteinases encontradas em peçonhas ofídicas, bem como as de outras origens, são classificadas de acordo com a composição do seu sítio ativo, mecanismo de ação e estrutura tridimensional. Com base no mecanismo de ação, a União Internacional de Bioquímica reconhece quatro classes de proteinases: serino proteinases, cisteíno proteinases, aspártico proteinases e metaloproteinases. Embora várias outras enzimas proteolíticas tenham sido isoladas e identificadas, muitas ainda não foram enquadradas nesta classificação (NEURATH, 1989).

Estudos da atividade proteolítica de peçonhas ofídicas têm sido desenvolvidos desde o final do século passado. No início, os trabalhos com este material biológico foram dificultados devido à ausência de metodologias que possibilitassem uma análise mais rápida e detalhada das peçonhas. Somente a partir da década de 50, com o desenvolvimento de novas técnicas, foi possível iniciar a caracterização dos diferentes componentes existentes nas peçonhas ofídicas. HOLTZ e RAUDONAT (1956) reportaram a separação de duas frações da peçonha de *Bothrops jararaca*, utilizando precipitação com sulfato de amônio. Uma chamada de "proteinase", com forte atividade proteolítica, e outra, chamada de "coagulina", que apresentava elevada atividade coagulante e discreta atividade proteolítica.

BLOMBACK et al. (1957) isolaram uma enzima coagulante da peçonha de *B. jararaca*, chamada de "reptilase". Esta enzima foi caracterizada como uma glicoproteína, com peso molecular de aproximadamente 33.000 e pertencente à classe das serina proteinases. A reptilase libera somente o fibrinopeptídeo A do fibrinogênio, ativa o fator XII da coagulação sanguínea e é capaz de ativar a agregação plaquetária.

HENRIQUES et al. (1958) e HENRIQUES et al. (1960) estudaram as atividades caseinolítica, coagulante sobre plasma e atividade sobre ésteres de arginina da peçonha de *B. jararaca* e realizaram uma separação preliminar das enzimas responsáveis por estas atividades, utilizando precipitação com sulfato de amônio.

MANDELBAUM e HENRIQUES (1964), utilizando métodos mais avançados, como cromatografia de troca iônica em DEAE-celulose, conseguiram purificar, com alto rendimento, e caracterizar uma proteinase da peçonha de *B. jararaca* chamada de Bothrops proteinase "A". Sua atividade sobre o TAME foi 28 vezes maior do que a da peçonha e, quando comparada à tripsina, suas atividades específicas sobre TAME, BAA e LEE foram, respectivamente, 2, 8 e 100 vezes menores. A Bothrops proteinase A não hidrolisa caseína e foi considerada distinta da atividade coagulante da peçonha.

A crotalase, enzima tipo trombina, foi purificada da

peçonha de *Crotalus adamanteus* (MARKLAND and DAMUS, 1971) através de cromatografia em Sephadex G-100, precipitação com sulfato de amônio, cromatografia em DEAE-celulose e em hidroxapatita. Esta enzima possui, além da atividade coagulante sobre plasma, acentuada atividade esterásica sobre substratos sintéticos como ésteres de aminoácidos básicos: TAME, BAEE e LEE. A crotalase foi caracterizada como uma serina proteinase devido a sua inibição rápida e completa por DFP. As atividades esterásica e coagulante são inibidas simultaneamente, sugerindo que as duas atividades estão em associação. Igualmente à reptilase, a crotalase libera somente o fibrinopeptídeo A do fibrinogênio. Por outro lado, esta enzima não ativa o fator XIII da coagulação e não agrega plaquetas.

NOLAN et al. (1976), utilizando cromatografias de afinidade, purificaram a "ancrod" da peçonha de *Agkistrodon rhodostoma*, com rendimento e atividade específica superiores aos obtidos anteriormente (ESNOUF and TUNNAH, 1967). Esta é também uma enzima tipo trombina e foi caracterizada como uma glicoproteína com peso molecular de aproximadamente 35.400, que possui especificidade para ésteres de arginina (TAME, BAEE) e ligações peptídicas envolvendo grupos carboxílicos de resíduos de arginina. A ancrod libera somente o fibrinopeptídeo A do fibrinogênio e não ativa qualquer outro fator da coagulação. Esta enzima é inativa sobre a caseína e outros substratos de proteínas desnaturadas (HATTON, 1973; NOLAN et al., 1976). Sua atividade catalítica sobre TAME e BAEE é inibida fortemente por DFP e PMSF, indicando que possui uma serina no seu sítio ativo

essencial para esta atividade. Inibidores plasmáticos como a alfa 2-macroglobulina e a antitrombina III inibem sua atividade catalítica.

A "batroxobina" foi purificada e caracterizada a partir da peçonha de *Echrops atrox* (Linnaeus) (STOCKER and BARLOW, 1976; HOLLEMAN and WEISS, 1976). A espécie *E. atrox* descrita por Linnaeus inclui variedades amplamente distribuídas na América do Sul e Central. Esta espécie foi subdividida, como proposto por HOGE (1965), de acordo com a origem geográfica, critérios morfológicos e propriedades imunológicas da peçonha, em cinco espécies independentes: *E. asper*, *E. atrox*, *E. marajoensis*, *E. moeseni* e *E. erndli*. Os autores citados acima, na verdade, trabalharam com as espécies conhecidas hoje como *E. marajoensis* (Hoge) e *E. moeseni* (Hoge).

A batroxobina, uma glicoproteína com peso molecular variável de 32.000 a 42.000 dependendo da espécie da serpente de que a peçonha foi extraída, converte o fibrinogênio em fibrina, mas não ativa a agregação plaquetária. Sua especificidade é também pela cadeia A do fibrinogênio, liberando o fibrinopeptídeo A.

KIRBY et al. (1979) purificaram e caracterizaram a "trombocitina" a partir da peçonha de *E. marajoensis*. Esta enzima é complementar à ação da batroxobina pois ativa a agregação plaquetária, mas possui pouca ou nenhuma ação sobre o

fibrinogênio (NIEWIAROWSKI et al., 1979). A trombocitina é uma glicoproteína com peso molecular de 36.000 e foi caracterizada como uma serina proteinase inibida por DFP e inibidores de tripsina isolados de soja. Sua ação na agregação plaquetária é cerca de 10 a 50 vezes menor do que a trombina e, além de causar agregação plaquetária, causa liberação de serotonina das plaquetas e ativa o fator XIII da coagulação (NIEWIAROWSKI et al., 1979).

MAGALHÃES et al. (1981) purificaram e caracterizaram parcialmente uma enzima tipo trombina da peçonha de *Lachesis muta pacificus*, utilizando cromatografias em Sephadex G-100, hidroxiapatita, DEAE-celulose e Sephadex G-150. Esta enzima, com peso molecular estimado em 36.000, possui atividade sobre ésteres de aminoácidos e sua atividade sobre o TAME é muito elevada, sendo uma das mais ativas já purificadas de peçonhas ofídicas. Esta enzima não induz agregação plaquetária e sua atividade coagulante está de acordo com valores encontrados para outras enzimas tipo trombina já purificadas de peçonhas ofídicas.

Outras enzimas tipo trombina já foram purificadas e caracterizadas a partir da peçonha de diversas serpentes, como: *Agkistrodon acutus* (OUYANG et al., 1971), *Rhisis gabonica* (VILJOEN et al., 1979; BAJWA et al., 1982), *Agkistrodon caliginosus* (SUZUKI and TAKAHASHI, 1984), *Trimeresurus flavoviridis* (KOSUGI et al., 1986), *Rothrops insularis* (SELISTRE and GIGLIO, 1987), entre outras.

Enzimas proteolíticas desprovidas de atividade coagulante, mas ativas sobre substratos proteicos como a caseína, dimetil-caseína, colágeno, azocoll e gelatina, têm sido purificadas e caracterizadas a partir de diversas peçonhas ofídicas, como: *E. jararaca* (MANDELBAUM et al., 1982), *Agkistrodon acutus* (MORI et al., 1984), *E. moojeni* (ASSAKURA et al., 1985), *Crotalus adamanteus* (KURECKI and KRESS, 1985), *Trimeresurus mucrossuamatus* (SUGIHARA et al., 1985), *Vipera palestinae* (NAKAR et al., 1986), *Crotalus atrox* (WILLIS and TU, 1988), *Ophiophagus hannah* (YAMAKAWA and OMORI-SATO, 1988), *Crotalus molossus nigrescens* (RAMÍREZ et al., 1990), entre outras. Os pesos moleculares destas enzimas variam da ordem de 20.400 para moojeni proteinase "A" (ASSAKURA et al., 1985) até aproximadamente 95.000, como determinado para uma proteinase purificada da peçonha de *Agkistrodon halys blomhoffii* (SATAKE et al., 1963). Muitas destas enzimas são metaloproteinases, como as proteinases I e II de *C. adamanteus* (KURECKI et al., 1979) e a moojeni proteinase A. As metaloproteinases provenientes de peçonhas ofídicas são, normalmente, inativas sobre TAME, BAEE e outros ésteres de arginina. A atividade destas enzimas geralmente é menor do que a atividade da tripsina (KURECKI and KRESS, 1985).

Pouco ainda é conhecido sobre estrutura e função das proteinases ofídicas quando comparadas às informações já disponíveis sobre as neurotoxinas e fosfolipases de peçonhas ofídicas. Um fator limitante nos estudos das proteinases é a atividade autocatalítica destas enzimas, o que pode interferir

nos processos de purificação, dificultando a obtenção de proteínas estáveis (RAMIRES et al., 1990).

Bothrops lanceolatus ou "Fer de Lance", serpente da família Viperidae subfamília Crotalinae, foi primeiro descrita por Lacépède, em 1789. HOGE (1952) desfez a sinonímia que havia com *B. atrox*. Seu habitat natural é restrito às regiões úmidas da ilha Martinica na América Central, onde se divide em duas populações distintas (HOGE and HOGE, 1978/1979). Devido ao seu isolamento geográfico, muitas características peculiares podem ter se desenvolvido a nível fisiológico e morfológico.

Diferenças bioquímicas da peçonha em relação às espécies brasileiras de *Bothrops* podem ter se desenvolvido da mesma maneira. A análise bioquímica e farmacológica dessas diferenças pode levar a uma melhor compreensão dos mecanismos de ação dos diversos fatores tóxicos isolados das peçonhas botrópicas.

STOCKER et al. (1974), utilizando placas de agarose e fibrinogênio, demonstraram a presença de uma enzima tipo trombina na peçonha de *B. lanceolatus*. Mais tarde, STOCKER et al. (1982) determinaram que esta serpente não possui qualquer agente agregante na sua peçonha, como demonstrado pela técnica de retração do coágulo. Posteriormente, LÔBO DE ARAÚJO (1990) determinou que a peçonha de *B. lanceolatus* apresenta atividade tipo trombina, uma vez que é capaz de promover a formação de coágulo diretamente a partir do fibrinogênio. Estudos preliminares (LÔBO de ARAÚJO et al., 1990) mostraram que a

peçonha desta serpente possui também alta atividade esterásica sobre TAME, elevada atividade proteolítica sobre a caseína e ausência de atividade coagulante sobre plasma humano citratado. Além disso, foi determinado que esta peçonha causa aumento do tempo de tromboplastina parcialmente ativada do plasma humano citratado (LÔBO DE ARAÚJO, 1990), sugerindo a presença de um inibidor da cascata de coagulação, a exemplo do observado por KAMIGUTI et al. (1985) com a peçonha de *B. castelnau*. De fato, LÔBO DE ARAÚJO (1990) determinou que a fosfolipase A₂ purificada da peçonha de *B. lanceolatus* apresenta atividade anticoagulante sobre plasma humano. Fato semelhante já havia sido observado com a fosfolipase purificada da peçonha de *B. asper* (KAISER et al., 1990).

Optamos por trabalhar com a peçonha da serpente *B. lanceolatus* por se tratar de espécie ainda pouco estudada, cuja peçonha apresenta as características peculiares descritas acima, associadas com elevadas atividades esterásica e caseinolítica. Apesar de praticamente todas as peçonhas botrópicas possuírem enzimas com atividade esterásica, pouco ainda é conhecido do papel destas proteínas no envenenamento botrópico.

Sabe-se que, no Brasil, as serpentes pertencentes ao gênero *Bothrops* são responsáveis por mais de 90% dos acidentes ofídicos diagnosticados. O estudo de como os vários fatores tóxicos das peçonhas interagem entre si e com os tecidos da vítima poderá contribuir para melhor compreensão da fisiopatologia do

envenenamento botrópico e auxiliar no desenvolvimento de novos métodos de tratamento desses acidentes. Além disso, o isolamento, a caracterização bioquímica e estudos das atividades biológicas das diferentes proteínas presentes nestas peçonhas são essenciais para que possamos estudar a evolução molecular destas proteínas.

Tendo-se em vista estas informações, este trabalho foi desenvolvido com o objetivo de purificar uma enzima com atividade esterásica sobre TAME da peçonha de *B. lanceolatus*, efetuando-se, a seguir, sua caracterização bioquímica e avaliação de seus efeitos biológicos.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

A peçonha de *B. lanceolatus* e o antissoro específico contra esta peçonha foram gentilmente cedidos pelo Instituto Pasteur - Unité de Venins (Paris, França). A peçonha de *B. mooieni* foi cedida pelo Instituto Butantan (São Paulo, Brasil) e as demais foram cedidas pelo Departamento de Farmacologia da UNICAMP (Campinas, Brasil). Sephadex G-75 e G-100 foram obtidos da Pharmacia. DEAE-celulose foi obtida da Serva. TAME, acrilamida, N'N'-metilenobis (acrilamida) e nitrato de prata foram adquiridos da Sigma Chemical Co. Fibrinogênio humano foi obtido da Kabi Diagnóstica. Todos os outros reagentes e substratos foram provenientes da Merck.

2.1. Fracionamento da peçonha de *B. lanceolatus*

2.1.1. Cromatografia de exclusão em Sephadex G-100

A etapa inicial do fracionamento de 500mg da peçonha de *B. lanceolatus* foi dividida em três cromatografias, utilizando-se 200mg de peçonha na primeira e 150mg nas duas últimas. Em cada cromatografia foi feita uma suspensão da peçonha em tampão Tris-HCl 50mM pH 7,5 (Tampão "A"), para concentração de 40mg/ml. Após 15 minutos de repouso a 4°C, a solução foi centrifugada a

10.000 X g durante 5 min a 4°C e o sobrenadante foi aplicado em coluna (1,2 X 75 cm) de Sephadex G-100 equilibrada previamente com tampão "A". O material foi eluído a 4°C, utilizando-se fluxo de 5 ml/h, coletando-se amostras de 1,5 ml por tubo. A concentração proteica das amostras foi estimada pela leitura a 280nm em espectrofotômetro Zeiss PM Q-II (West Germany), usando-se cubetas de quartzo com 1,0 cm de caminho óptico. As amostras foram submetidas aos ensaios enzimáticos e biológicos e, a seguir, agrupadas em três frações (F-I, F-II e F-III), de acordo com as atividades nelas contidas. Cada fração, assim agrupada, foi dialisada contra água destilada durante 24h a 4°C e liofilizada.

2.1.2. Cromatografia de troca iônica

A fração F-II (132 mg), obtida na primeira etapa do fracionamento, foi solubilizada em 3,0 ml de tampão "A" e centrifugada a 10.000 X g durante 5 minutos a 4°C. O sobrenadante foi aplicado em coluna (1,1 X 15 cm) de DEAE-celulose previamente equilibrada com tampão "A". Após eluição inicial com o mesmo tampão em volume quatro vezes superior ao da coluna, seguiu-se um gradiente linear de 0 a 0,4 M de NaCl dissolvido no mesmo tampão. Amostras de 2,0 ml por tubo foram coletadas sob fluxo de 15ml/h a 4°C. A absorbância das amostras foi determinada a 280nm e a concentração de NaCl foi estimada medindo-se a condutividade das amostras em condutivímetro.

Após análise das atividades enzimáticas e biológicas, as amostras foram agrupadas em duas frações (F-II-1 e F-II-2). Cada fração foi dialisada contra água destilada durante 24 h a 4 °C e liofilizada.

2.1.3. Refiltração em Sephadex G-75

A fração F-II-1 (33 mg), obtida da cromatografia em DEAE-celulose, foi solubilizada em 1,5 ml de tampão Tris-HCl 50 mM pH 7,5 e centrifugada a 10.000 X g por 5 minutos. O sobrenadante foi aplicado em coluna (1,1 X 70 cm) de Sephadex G-75 equilibrada com o tampão "A". Utilizando-se fluxo de 8,5 ml/h a 4 °C, foram coletadas amostras de 1,2 ml. As amostras contendo a atividade esterásica sobre TAME foram agrupadas (F-II-1a), dialisadas, liofilizadas e armazenadas a 4 °C em dessecador.

2.2. Atividade caseinolítica.

A atividade caseinolítica foi determinada segundo o método descrito por KUNITZ (1947), com algumas modificações sugeridas por MANDELBAUM et al. (1982). A reação foi efetuada em meio de reação contendo Tris-HCl 0,1 M, caseína 1%, CaCl₂ 4,0 mM e NaCl 100 mM. Para a dosagem da atividade caseinolítica ao longo do fracionamento da peçonha de *B. lanceolatus*, 25 µl das amostras foram adicionados em 1,0 ml de meio de reação. Após 30 minutos a

37°C, foi adicionado 1,5ml de ácido tricloroacético (TCA) 5,0% e a mistura foi mantida a 4°C durante 1h. A seguir, o material foi centrifugado (12.000 X g) por 5 minutos e a concentração dos peptídeos, resultantes da digestão enzimática e solúveis em TCA, foi determinada pelo método de HARTREE (1972). Para se efetuar o ensaio da atividade caseinolítica das peçonhas de *Bothrops* spp, a reação foi iniciada com a adição de 0,1 ml (0,1 a 2,0 mg/ml) das soluções destas em 2,0 ml de meio de reação. A hidrólise enzimática foi interrompida com a adição de 3,0ml de TCA 5%.

Uma unidade de atividade enzimática é definida como a quantidade de enzima que produz um aumento da absorbância de 1,0 por minuto e por ml, a 650 nm. A atividade específica é expressa como unidades de atividade enzimática por miligrama de proteína.

2.3. Atividade esterásica

A atividade esterásica foi avaliada, como descrito por HUMMEL (1959), utilizando-se o TAME como substrato. Durante o fracionamento da peçonha de *B. lanceolatus*, a atividade esterásica das amostras foi determinada aplicando-se 10 µl em 3,0 ml de meio de reação contendo: TAME 1,0 M, tampão Tris-HCl 50 mM pH 8,1 e CaCl₂ 10 mM. A variação da absorbância a 247nm foi determinada após 10 min de reação a 37°C.

O ensaio da atividade esterásica das peçonhas de *Bothrops*

spp foi iniciado com a adição de 0,1 ml das soluções das peçonhas (1,0 e 2,0mg/ml) em 2,9ml de meio de reação. A variação da absorbância foi observada a 247nm durante 5 min de hidrólise enzimática.

Uma unidade de atividade enzimática é definida como 1 umol de TAME hidrolisado por minuto e por ml. A atividade específica é expressa em unidades de atividade enzimática por miligrama de proteína.

2.4. Atividade fosfolipásica

A atividade fosfolipásica foi determinada segundo o método descrito por LÔBO de ARAÚJO e RADVANYI (1987). O meio de reação continha, em sua composição, lecitina de ovo 3,5 mM como substrato, solubilizada em colato de sódio 4,0 mM, NaCl 100mM, CaCl₂ 10 mM e vermelho de fenol 0,055 mM. A absorbância desta solução foi ajustada para 1,8 a 558 nm pela adição de NaOH 0,1 M.

A reação foi iniciada adicionando-se 10 ul das amostras do fracionamento da peçonha de *B. lanceolatus* ou das soluções das peçonhas de *Eothropsa* spp a 1,0 ml do meio de reação. A variação da absorbância foi determinada após 15 min em mesmo comprimento de onda. A atividade enzimática foi expressa como sendo a diminuição da absorbância por minuto e por micrograma de proteína. Esta atividade foi convertida em micromoles de ácidos graxos liberados por minuto e por miligrama de proteína, medindo-

se a diminuição da absorbância de 1,0 ml do meio de reação produzida por quantidades conhecidas de ácido.

2.5. Atividade coagulante

A atividade coagulante foi determinada pelo método descrito por NAHAS et al. (1979), utilizando-se plasma humano citratado ou fibrinogênio humano.

2.5.1. Atividade coagulante sobre plasma

Durante o fracionamento da peçonha de *B. lauceolatus*, a atividade coagulante foi determinada aplicando-se 50ul das amostras em 0,2 ml de plasma humano citratado (3,8% de citrato de sódio). As peçonhas botrópicas, em concentrações que variavam de 1,0 ug a 1,0 mg por ml de solução, foram adicionadas (0,1ml) em 0,4ml de plasma humano citratado. O tempo necessário para o início da formação da rede de fibrina foi cronometrado a 37° C. Para tempos maiores de 10 min, a solução foi considerada incoagulável.

A dose mínima coagulante (DMC) das peçonhas botrópicas foi definida como a menor quantidade de proteína que promove a coagulação de 0,4ml de plasma humano citratado em 60 segundos.

A atividade coagulante da fração F-II-1a foi expressa em NIH unidades por miligrama de proteína. Estes valores foram obtidos comparando-se os tempos de coagulação determinados para esta fração, com aqueles obtidos utilizando-se uma preparação padrão de trombina humana, que apresentava 2.000 NIH unidades/mg.

2.5.2. Atividade coagulante sobre fibrinogênio

A ação coagulante sobre o fibrinogênio foi avaliada adicionando-se 50 μ l das frações da peçonha de *B. lanceolatus* a 0,2ml de uma solução de fibrinogênio humano (2,0 mg/ml) dissolvido em salina tamponada com tampão fosfato 50 mM pH 7,4. O tempo necessário para o início da formação de fibrina foi cronometrado como descrito acima.

2.6. Atividade hemorrágica

A atividade hemorrágica foi estimada de acordo com o método descrito por KONDO et al. (1960), com algumas modificações. No dorso de camundongos Swiss brancos machos de 18 a 22 g foram feitas injeções intradérmicas de 0,1ml das amostras do fracionamento da peçonha de *B. lanceolatus*, diluídas 20 vezes em salina 0,15 M. Soluções das peçonhas de *B. alternatus*, *B. jararaca* e *B. neuwiedi* nas concentrações de 6, 8, 10, 15 e 20 μ g/ml, ou das peçonhas de *B. erythromelas*, *B. insularis*, *B. jararacussu*, *B. lanceolatus* e *B. moojeni*, nas concentrações de

10, 20, 40, 80 e 160ug/ml, foram também injetadas nos animais.

Após 6 h, os animais foram sacrificados e a pele do dorso foi removida para análise da área hemorrágica na face interna. Os animais controles receberam injeção salina de igual volume. A dose mínima hemorrágica (DMH) foi estabelecida como sendo a menor quantidade de proteína capaz de causar um halo hemorrágico com diâmetro médio de 5,0 mm.

2.7. Eletroforese de proteínas

Eletroforeses de proteínas foram feitas em gel de poliacrilamida-SDS (dodecil sulfato de sódio), segundo o método de HAMES and RICKWOOD (1982), utilizando-se sistema descontínuo dissociante em placa vertical.

O gel de resolução, com concentração de poliacrilamida de 12%, foi preparado sob 1,5 cm de gel de empacotamento (3,75% de acrilamida), misturando-se as soluções estoque nas proporções apresentadas na Tabela 1.

Para o preparo das amostras, soluções da peçonha de *R. lanceolatus* e das frações obtidas ao longo do fracionamento foram diluídas (1,0 e 0,4 mg/ml, respectivamente) com tampão dissociante (Tris-HCl 63mM pH 6,8 contendo 2B -mercaptoetanol 5%, SDS 2%, sacarose 10% e azul de bromofenol 0,001%) e fervidas

TABELA 1
SOLUÇÕES ESTOQUE PARA PREPARO DOS GEIS DE ELETROFORESE EM SISTEMA
DESCONTÍNUO DISSOCIANTE

soluções estoque	gel de empacotamento ml	gel de resolução 12% ml	tampão cuba ml
acrilamida 30% + bisacr. 0,8%	2,5	12	---
Tris-HCl 0,5 M pH 6,8	5,0	---	---
Tris-HCl 3,0 M pH 8,8	---	3,75	---
Tris 0,25 M Glicina 1,92 M + SDS 1% pH 8,3	---	---	100
SDS 10%	0,2	0,3	---
Persulfato de amônio 3,0%	1,0	1,5	---
Água destilada	11,3	12,4	900
Temed (NNNN-tetra- metiletilenodiamino)	0,015	0,015	---
Volume final	20	30	1000

durante 4 min. Uma amostra contendo proteínas de pesos moleculares conhecidos (Kit-Pharmacia-LKB) foi utilizada para a estimativa do peso molecular das proteínas da peçonha e de cada fração, segundo o método de SVASTI and PANIJPAN (1977).

Aliquotas de 10 μ l das amostras (10 μ g de peçonha e 4 μ g das frações) foram aplicadas no gel e a corrida eletroforética foi conduzida em temperatura ambiente com voltagem fixada em 100 V (40 - 25 mA), até o azul de bromofenol atingir 0,5 cm do final do gel (aproximadamente quatro horas).

Após a corrida eletroforética, o gel foi corado com prata segundo o método utilizado para coloração de proteínas e ácidos nucleicos descrito por BLUM et al. (1987). Após a coloração, o gel foi seco segundo a técnica de JUANG et al. (1987).

2.8. Especificidade de hidrólise das cadeias do fibrinogênio

A ação catalítica da fração F-II-1a foi estudada em relação à especificidade de degradação das cadeias do fibrinogênio (A^{α} , B^{β} e μ). A 200 μ l de solução de fibrinogênio 2,0mg/ml, foram adicionados 50 μ l de uma solução, em salina, da fração F-II-1a (10 μ g). A reação foi interrompida com a adição de 250 μ l de tampão Tris-HCl 125 mM pH 6,8 contendo SDS 4%, B-mercaptoetanol 10%, sacarose 20% e azul de bromofenol 0,002%, em diferentes tempos de reação a 37°C. Estas amostras foram, a seguir, aquecidas a 100°C durante 5 min e utilizadas (10 μ l) para

análise eletroforética em gel de poliacrilamida-SDS.

2.9. Obtenção do antissoro específico para a F-II-1a

Para a obtenção de um antissoro específico para a fração F-II-1a (AS-FII-1a), foram feitas quatro imunizações em coelho, via linfonodo, obedecendo intervalos de 15 dias entre as duas primeiras imunizações e 7 dias entre as demais.

O antígeno imunizante utilizado na primeira inoculação foi preparado dissolvendo-se 150ug da fração F-II-1a em 100ul de solução salina. A seguir, adicionou-se 100ul de adjuvante completo de Freund e a mistura foi homogeneizada durante 1 min em seringa de 1,0ml. Nas imunizações subsequentes foram utilizados 100ug de proteína em cada inoculação.

As sangrias foram feitas 5 e 7 dias após a última inoculação, fazendo-se uma pequena incisão na veia marginal da orelha do coelho. Um total de 35ml de sangue foi coletado em beckers de vidro de 100ml, mantido em repouso durante 2h em temperatura ambiente e, a seguir, acondicionado a 4 C durante 24h para se efetuar a retração do coágulo. Posteriormente, o soro foi colhido e centrifugado a 10.000 X g durante 3min a temperatura ambiente. O sobrenadante foi distribuído em tubos plásticos de 1,0ml e acondicionado a -20°C.

2.10. Imunodifusão e imunoeletroforese

Os testes de imunodifusão (dupla difusão em ágar) foram feitos em gel de bacto ágar 1,5% segundo SUGIMORI et al. (1986). As lâminas foram preparadas distribuindo-se 4,0ml de gel sobre lâmina de microscopia (7,5 X 2,5cm), sendo os orifícios feitos com aparelho furágar (LEITE e OLIVEIRA, 1975). Os testes de imunoeletroforese foram feitos como descrito por GRABAR e BURTIN (1964), com algumas modificações. Lâminas de vidro (7,5 X 2,5cm) foram cobertas com 4,0ml de gel de bacto ágar 1,5% e tampão Veronal 50mM pH 8,4. Após corrida eletroforética de 60min dos antígenos reagentes, empregando-se diferença de potencial de 8volts/cm, o antissoro foi aplicado em uma canaleta longitudinal feita entre os dois orifícios onde os antígenos foram aplicados.

As lâminas com os testes de imunodifusão e imunoeletroforese permaneceram em repouso durante 24h em temperatura ambiente, sendo, a seguir, imersas em solução salina durante 48h para a retirada das proteínas que não reagiram. Após secagem do gel, utilizando papel de filtro umidecido, foi efetuada a coloração em solução de negro de amido (0,2%), metanol (50%) e ácido acético (12%) durante 10min. A descoloração foi feita, logo a seguir, utilizando solução de metanol (50%) e ácido acético (12%).

2.11. Valores de Km e velocidade máxima da fração F-II-1a

Os valores de Km e velocidade máxima (V_{max}) de reação para a hidrólise do TAME pela F-II-1a foram determinados utilizando-se o mesmo método já descrito para dosagem da atividade esterásica, variando-se a concentração de TAME de 0,02 a 1,25mM. Foram aplicados 3,0 μ g da F-II-1a em 3,0 ml do meio de reação e a alteração da absorbância foi acompanhada durante 5 minutos em temperatura ambiente, registrando-se as leituras a cada 15 segundos.

2.12. Inibição da atividade esterásica da fração F-II-1a

A inibição da atividade hidrolítica sobre o TAME foi determinada pré-incubando-se 5 μ g da fração F-II-1a, solubilizada em 0,25 ml de tampão Tris-HCl 100mM pH 8,1, por 30 min a temperatura ambiente com igual volume dos seguintes inibidores: EDTA 20mM e PMSF 10mM dissolvidos em água e isopropanol 50%, respectivamente. A atividade esterásica foi determinada, a seguir, adicionando-se 2,5ml de solução de TAME 1,2mM dissolvido em tampão Tris-HCl 50mM pH 8,1. A leitura da absorbância foi feita a 247nm em intervalos de 30 segundos durante 5min.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Estudo das atividades enzimáticas e biológicas das peçonhas de *Bothrops* spp

As peçonhas das serpentes pertencentes à família Viperidae caracterizam-se por possuírem várias proteínas que são bioquímica e farmacologicamente ativas. Tem sido mostrado que as peçonhas das serpentes agrupadas no gênero *Bothrops* (Viperidae) são ricas em proteínas com atividade enzimática. As fosfolipases, proteinases, hidrolases de ésteres de aminoácidos básicos, tipo trombina e aminoácido oxidases são as enzimas mais comumente encontradas (IWANAGA and SUZUKI, 1979).

As serpentes Viperidae, principalmente as *Bothrops* spp, possuem peçonhas capazes de causar intensos efeitos locais, como dor, edema, hemorragia e necrose associada a mionecrose dos tecidos adjacentes à picada (EFRATI and REIF, 1953; RUSSEL, 1960; REID et al., 1963; BOQUET, 1964, 1966; OHSAKA et al, 1966; JIMENEZ-FORRAS, 1968, 1970; TU, 1977). Além disso, induzem alterações da coagulabilidade sanguínea (ROSENFELD et al., 1968).

Alguns dos efeitos induzidos pelas peçonhas botrópicas são atribuídos às diversas enzimas presentes nestas peçonhas. FLOWERS (1963) e GOUCHER and FLOWERS (1964) sugeriram que as proteinases são responsáveis pelos sintomas de hemorragia e necrose, enquanto que GUTIERREZ et al. (1984), MEBS and SAMEJIMA (1986) e LAMONTE

and GUTIERREZ (1989) propuseram que as fosfolipases básicas e moléculas tipo fosfolipases, isoladas da peçonha de *B. asper*, participam ativamente na indução de mionecrose, afetando a integridade da membrana plasmática das células musculares.

Nossos resultados sugerem que, nas peçonhas botrópicas estudadas (*B. alternatus*, *B. erythromelas*, *B. insularis*, *B. jararaca*, *B. jararacussu*, *B. lanceolatus*, *B. moiei* e *B. neuwiedi*), a atividade proteolítica sobre a caseína não está diretamente relacionada com a atividade hemorrágica. A peçonha de *B. insularis* apresentou atividade caseinolítica de 2,10U/mg, mas um halo hemorrágico com 5,0mm de diâmetro (dose mínima hemorrágica) só foi obtido com 20ug de peçonha. Por outro lado, a peçonha de *B. jararacussu*, que foi a menos ativa sobre a caseína, apresentou atividade proteolítica de 0,73 U/mg, mas apenas 4,0ug de peçonha foram necessários para promover a formação de um halo hemorrágico semelhante (Tabela 2).

A peçonha de *B. lanceolatus* apresentou alta atividade proteolítica de 2,70 U/mg, ficando abaixo apenas da atividade apresentada pela peçonha de *B. erythromelas*, com o valor de 2,94 U/mg. Em relação à atividade hemorrágica, a peçonha de *B. lanceolatus* foi a quarta mais ativa, apresentando dose mínima hemorrágica (DMH) de 1,6ug, sendo esta aproximadamente 5 vezes menor do que a DMH de 0,3ug determinada para a peçonha de *B. jararaca* (Tabela 2).

TABELA 2
 ATIVIDADES CASEINOLÍTICA, FOSFOLIPÁSICA, TAME-ESTERÁSICA,
 HEMORRÁGICA E COAGULANTE DAS PEÇONHAS DE *Bothrops* spp

PEÇONHA DE <i>BOTHROPES</i> spp	ATIVIDADES				
	CASEINASE U/mg	PLase	TAMEase U/mg	DMH ug	DMC ug
<i>B. alternatus</i>	1,55	1,8	0,62	2,5	5,0
<i>B. erythromelas</i>	2,94	2,6	0,40	2,0	1,5
<i>B. insularis</i>	2,10	4,8	1,83	20,0	4,9
<i>B. jararaca</i>	2,32	3,2	1,05	0,3	10,0
<i>B. jararacussu</i>	0,73	5,2	1,03	4,0	55,0
<i>B. lanceolatus</i>	2,70	4,2	1,54	1,6	ND
<i>B. moojeni</i>	2,48	4,0	1,25	1,4	4,5
<i>B. neuwiedi</i>	1,02	2,8	0,98	1,0	25,0

ND = não observada

PLase = atividade fosfolipásica em umoles de ácidos graxos liberados por minuto e por miligrama de proteína.

TAMEase = atividade esterásica sobre o TAME. A unidade (U) enzimática foi definida como 1 umol de TAME hidrolisado por min e por ml.

DMH = dose mínima hemorrágica (menor quantidade de proteína capaz de causar halo hemorrágico com 5,0mm de diâmetro).

DMC = dose mínima coagulante (menor quantidade de proteína que coagula 200ul de plasma humano em 60 segundos).

Os valores apresentados representam a média de quatro determinações. A variação experimental sempre foi menor que 10%

Na verdade, HOMMA e TU (1971) já haviam mostrado que a atividade proteolítica não está diretamente relacionada com a hemorragia e necrose em diversas peçonhas ofídicas.

Apesar da ausência de relação direta entre a atividade caseinolítica e a hemorrágica, é incorreto afirmar que os fatores hemorrágicos são desprovidos de atividade proteínásica. O método utilizado para a determinação da atividade caseinolítica (KUNITZ, 1947) é baseado na dosagem dos fragmentos peptídicos solúveis em ácido após precipitação com ácido tricloroacético (TCA) 5%. A hidrólise enzimática, por outro lado, pode originar fragmentos insolúveis em ácido que, nesse caso, não são detectados. Além disso, a caseína é uma proteína pouco sensível à hidrólise por algumas proteinases (TU, 1977).

SUZUKI (1966) observou, por exemplo, que o fator hemorrágico HR-1 purificado da peçonha de *Aspistrodon halys blomhoffii* (FLOWERS, 1963) não apresentou atividade caseinolítica. Porém, quando NIKAI et al. (1986) substituíram a caseína por outros substratos proteicos, incluindo a dimetilcaseína, foi observada hidrólise. De fato, segundo TU (1988), mais de 33 hemorraginas, purificadas das peçonhas de diferentes serpentes Viperidae, apresentam atividade hidrolítica sobre diversos substratos proteicos.

Além das atividades caseinolítica e hemorrágica, a peçonha de *B. lanceolatus* apresentou alta atividade fosfolipásica e esterásica sobre TAME. A atividade fosfolipásica específica de

4,2umoles/min/mg, determinada sobre a lecitina solubilizada em colato de sódio (Figura 1), foi a terceira maior observada entre as peçonhas estudadas (Tabela 2). Já a atividade específica de hidrólise do TAME de 1,54 U/mg ficou abaixo apenas da atividade de 1,83 U/mg determinada para a peçonha de *B. insularis* (Tabela 2).

A capacidade das peçonhas botrópicas em promover a formação de coágulo, quando adicionadas a plasma humano, é geralmente associada à presença de enzimas tipo trombina. Estas enzimas possuem diversos fatores em comum como, por exemplo, a atividade hidrolítica sobre ésteres de aminoácidos básicos. Contudo, confrontando-se a atividade TAME-esterásica com a coagulante sobre plasma, observamos, mais uma vez, ausência de relação direta entre estas atividades das peçonhas botrópicas utilizadas neste trabalho. Isto é possível devido aos ativadores de fatores da cascata de coagulação, que são comumente encontrados nestas peçonhas. A peçonha de *B. erythromelas* apresentou a menor atividade esterásica, enquanto que a dose mínima coagulante de 1,5ug sugere que esta peçonha foi a mais ativa sobre o plasma (Tabela 2).

A peçonha de *B. lanceolatus* foi a única, entre as peçonhas botrópicas estudadas, a não promover a formação de coágulo visível (Tabela 2). Contudo, a presença de atividade tipo trombina foi encontrada por STOCKER et al. (1974) na peçonha desta serpente, utilizando-se placas de agarose e fibrinogênio.

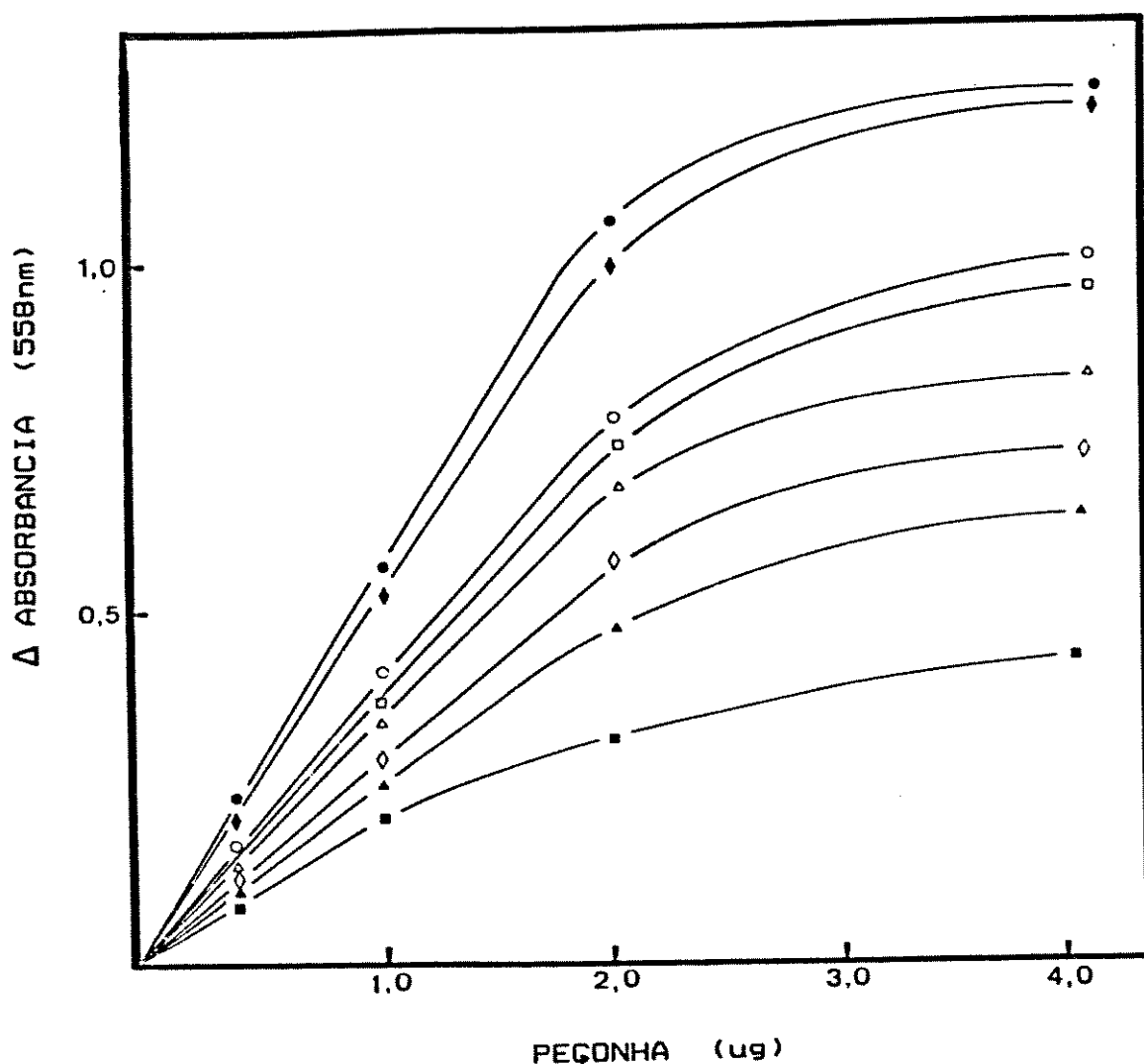


FIGURA 1. ATIVIDADE FOSFOLIPÁSICA DE OITO PEÇONHAS BOTRÓPICAS.

O meio de reação continha, como substrato, lecitina de ovo solubilizada em colato de sódio 4,0mM, NaCl 100mM, CaCl₂ 10mM e vermelho de fenol 0,055mM. Foram utilizadas peçonhas das serpentes: *Bothrops alternatus* (■), *B. erythromelas* (▲), *B. insularis* (◆), *B. jararaca* (△), *B. jararacussu* (●), *B. lanceolatus* (○), *B. moojeni* (◻) e *B. neuwiedi* (◊). Cada ponto corresponde à média de quatro determinações. A variação experimental foi abaixo de 10%.

Posteriormente, LÔBO DE ARAÚJO (1990) determinou que a peçonha de *B. lanceolatus* promove a coagulação direta do fibrinogênio, a exemplo das demais peçonhas botrópicas (EAGLE, 1937; ROSENFELD et al., 1959; NAHAS et al., 1979). Sendo assim, o fato da peçonha de *B. lanceolatus* não coagular o plasma humano pode estar relacionado a inibidores de proteinases inespecíficos presentes no meio plasmático, tais como alfa₂-macroglobulina, alfa₁-antitripsina e antitrombina III. Além disso, a peçonha desta serpente causa aumento do tempo de tromboplastina parcialmente ativada do plasma humano (LÔBO DE ARAÚJO, 1990), sugerindo a presença de um inibidor da cascata de coagulação, a exemplo do observado por KAMIGUTI et al. (1985) com a peçonha de *B. castelnaudi*.

3.2. Isolamento e caracterização de uma fração esterásica da peçonha de *B. lanceolatus*

Durante todo o processo de isolamento da fração esterásica da peçonha de *B. lanceolatus*, utilizamos pH levemente alcalino. Nestas condições todas as atividades enzimáticas e biológicas da peçonha mantiveram-se estáveis.

O perfil cromatográfico da eluição da peçonha de *B. lanceolatus*, em coluna de Sephadex G-100, apresentou três picos após leitura da absorbância das amostras a 280 nm (Figura 2). Todas as atividades enzimáticas e biológicas estudadas foram encontradas nos dois primeiros picos. A atividade esterásica foi

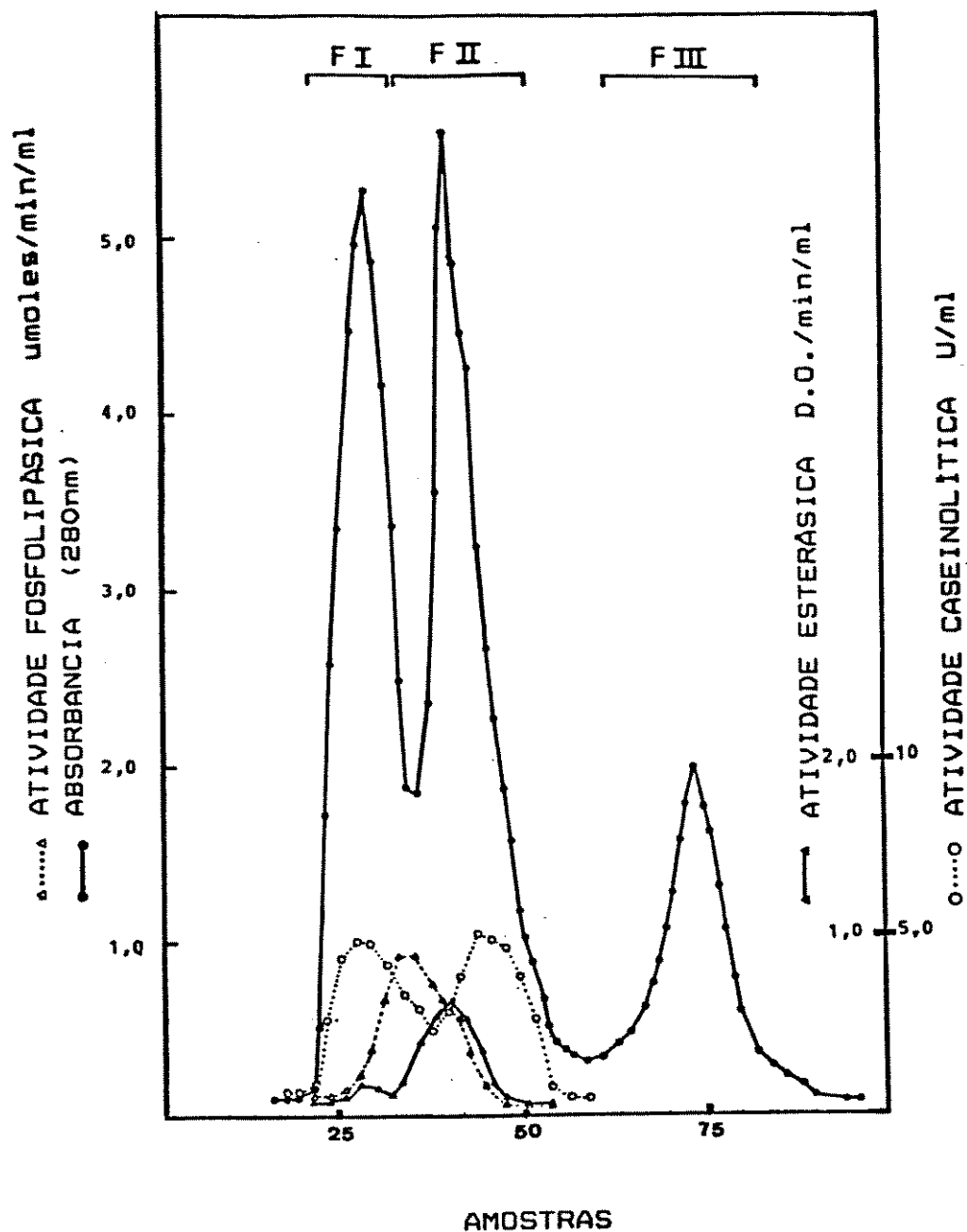


FIGURA 2. CROMATOGRAFIA EM SEPHADEX G-100

Peçonha de *B. lanceolatus* (200 mg) foi aplicada em coluna (1,2 X 75 cm) de Sephadex G-100 previamente equilibrada com tampão Tris-HCl 50mM pH 7,5. Amostras de 1,5ml foram coletadas a 4° C, utilizando-se fluxo de 5 ml/h.

encontrada sob a forma de um único pico localizado entre os dois da atividade caseinolítica. Este perfil foi semelhante nas três cromatografias utilizadas nesta etapa do isolamento. O material eluído foi dividido em três frações chamadas de F-I, F-II e F-III. A atividade esterásica, bem como parte das atividades fosfolipásica e caseinolítica, ficaram agrupadas na fração F-II.

A fração F-II, obtida após cromatografia em coluna de Sephadex G-100, foi submetida a uma cromatografia de troca iônica em coluna de DEAE-celulose, seguida de uma refiltração em Sephadex G-75.

Após a cromatografia em DEAE-celulose, obtivemos duas novas frações (Figura 3): F-II-1, eluída da coluna com tampão "A" e correspondendo às amostras de 6 a 11, e a F-II-2, eluída durante o gradiente de NaCl entre 0,15 e 0,3M de sal. A atividade esterásica ficou concentrada na F-II-1, juntamente com baixa atividade caseinolítica.

A fração F-II-1 foi submetida, a seguir, a refiltração em coluna de Sephadex G-75 (Figura 4), o que resultou em uma separação do material cromatografado em duas novas frações distintas: F-II-1a e F-II-1b. Toda a atividade esterásica ficou concentrada na fração F-II-1a, eluída entre as amostras 22 e 31.

Ao final deste processo, a fração F-II-1a apresentou atividade esterásica sobre TAME de 21,8 U/mg, aproximadamente 14,5 vezes maior do que a da peçonha (1,5U/mg). Foi obtido um

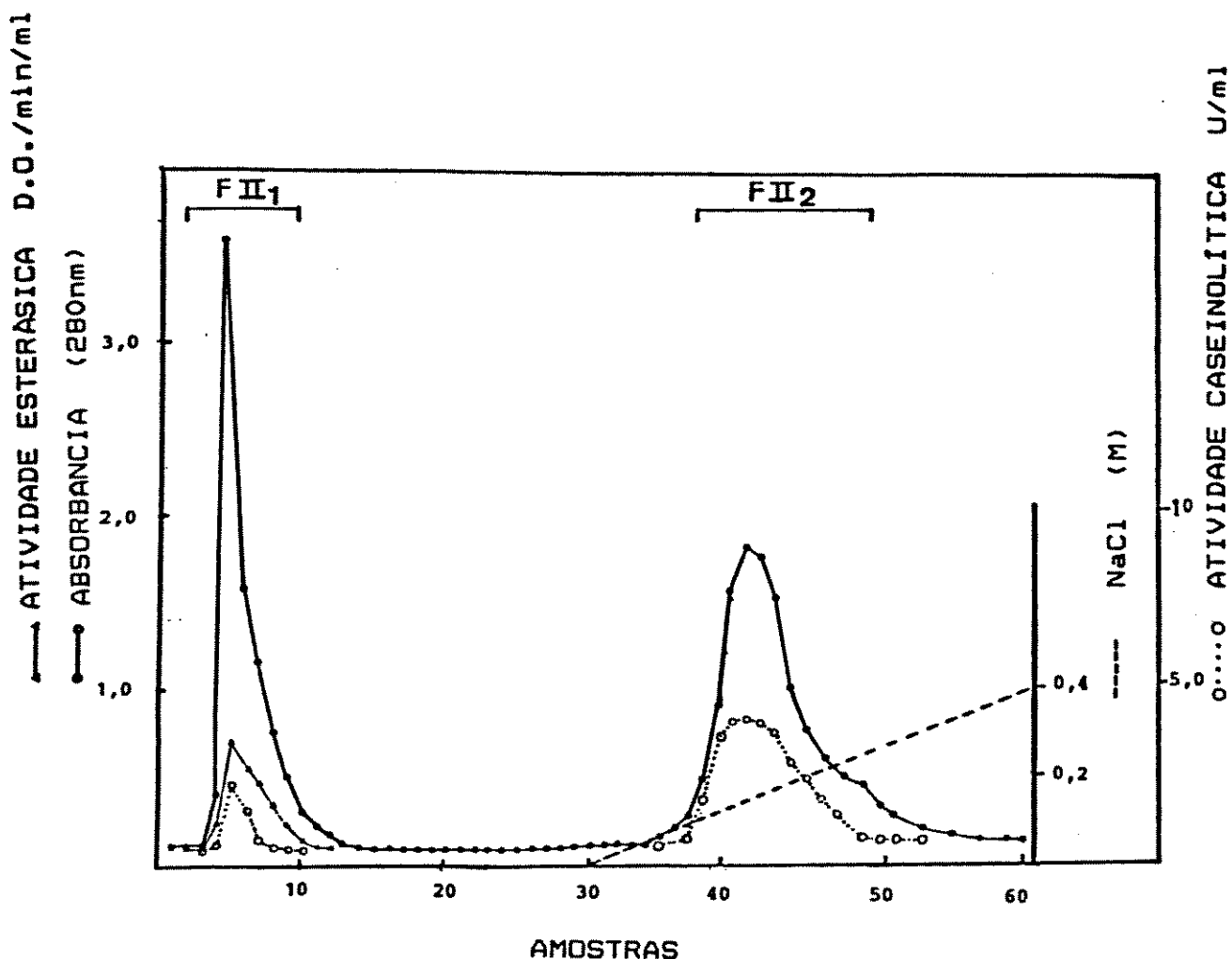


FIGURA 3. CROMATOGRAFIA EM DEAE-CELULOSE

A fração F-II, obtida após a cromatografia da peçonha de *B. lanceolatus* em coluna de Sephadex G-100, foi dialisada por 24h contra água destilada. Após a diálise e liofilização, a fração F-II (145mg) foi solubilizada em 3,0ml de tampão Tris-HCl 50mM pH 7,5 e aplicada em coluna (1,1 X 15cm) de DEAE-celulose previamente equilibrada com o mesmo tampão. Amostras de 2,0 ml foram coletadas a 4°C, utilizando-se fluxo de 15ml/h.

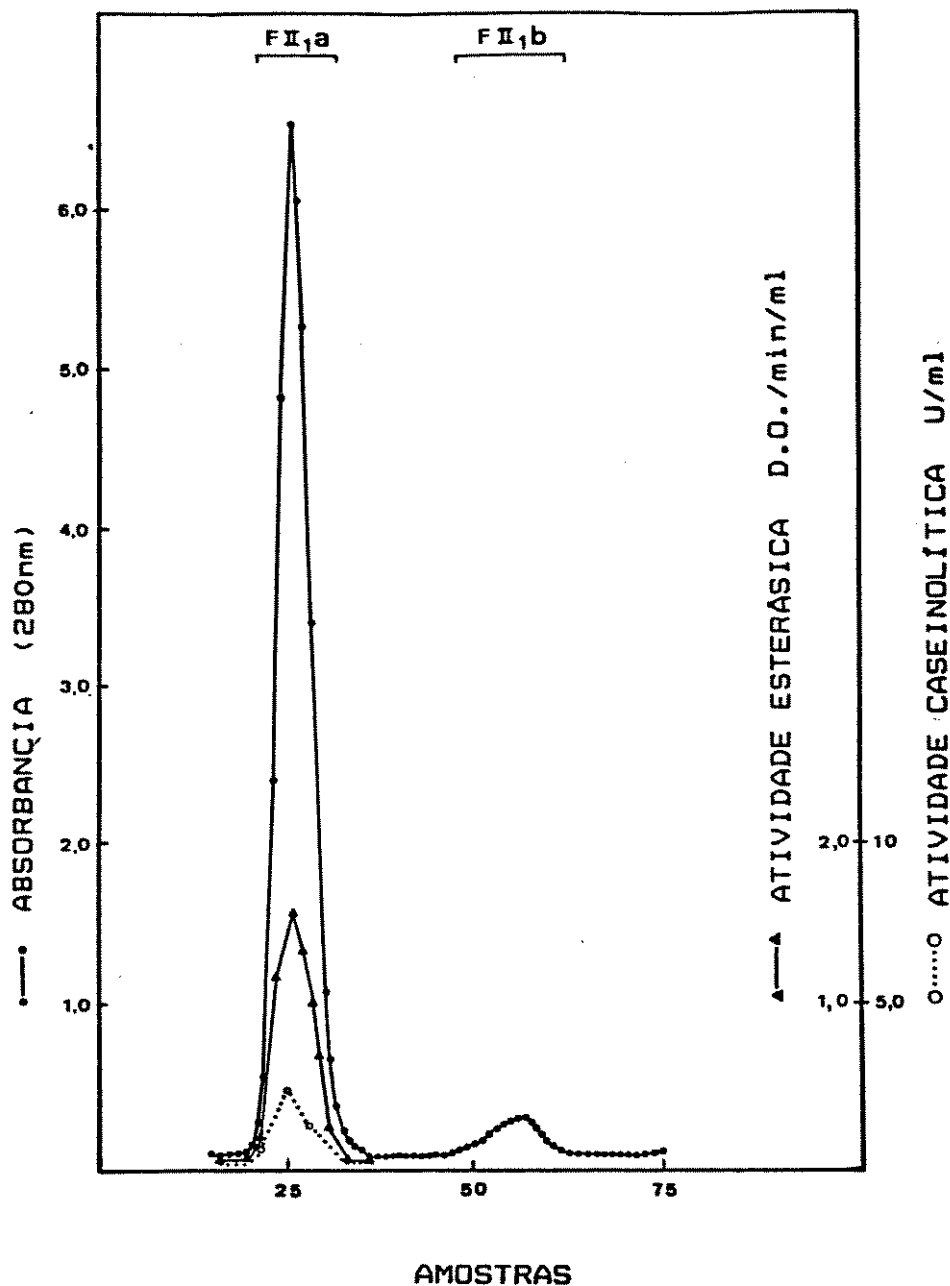


FIGURA 4. CROMATOGRAFIA EM SEPHADEX G-75

A fração F-II-1, obtida após a cromatografia da F-II em DEAE-celulose, foi dialisada contra água destilada por 24h. Após a diálise e liofilização, a fração F-II-1 (43mg) foi solubilizada em 1,5ml de tampão Tris-HCl 50mM pH 7,5 e aplicada em coluna (1,1 X 60cm) de Sephadex G-75 previamente equilibrada com o mesmo tampão. As amostras de 1,5ml foram coletadas a 4°C, utilizando-se fluxo de 8,5ml/h.

rendimento proteico de 4% e recuperação de 58% da atividade enzimática contida em 500mg de peçonha (437,5 mg de proteína) (Tabela 3).

Pela análise eletroforética em gel de poliacrilamida-SDS, constatamos que a fração F-II-1a apresentou uma única cadeia polipeptídica após tratamento com SDS e B-mercaptoetanol (Figura 5). O peso molecular da proteína presente na fração F-II-1a foi estimado em 38.100. Este valor foi determinado, utilizando-se uma curva padrão construída com a intersecção gráfica do logaritmo do peso molecular das proteínas do padrão versus a mobilidade relativa destas proteínas no gel de eletroforese (Figura 6), como proposto por SVASTI and PANIJPAN (1977).

Testes de imunodifusão em ágar com a fração F-II-1a tornaram possível evidenciar apenas uma única linha de precipitação, tanto com o soro específico (AS-F-II-1a) como com o polivalente (Figura 7). A análise imunoeletroforética revelou que a proteína presente na fração F-II-1a reagiu com o soro específico e o polivalente, promovendo a formação de apenas uma linha de precipitação deslocada para o catodo (Figura 8), o que sugere ser esta uma proteína básica com ponto isoelétrico acima de 8,4. Estes resultados sugerem termos obtido um elevado grau de pureza da enzima presente na fração F-II-1a ao longo do processo de purificação.

TABELA 3
 RENDIMENTO E ATIVIDADE ESTERÁSICA ESPECÍFICA DA FRAÇÃO F-II-1a
 PURIFICADA DA PEÇONHA DE *Bothriopsis lanceolatus*.

ETAPA	PROTEÍNA (mg)	RENDIMENTO %	ATIVIDADE			FATOR DE PURIF.
			TOTAL (U)	%	ESPECÍFICA U/mg	
PEÇONHA TOTAL	437,5	100,0	656	100	1,50	1,0
SEPHADEX G-100	120,1	27,5	636	97	5,30	3,5
DEAE-CELULOSE	28,7	6,6	452	67	15,75	10,5
SEPHADEX G-75	17,3	4,0	377	58	21,80	14,5

Uma unidade (U) de atividade esterásica foi definida como 1 umol de TAME hidrolisado por min e por ml.

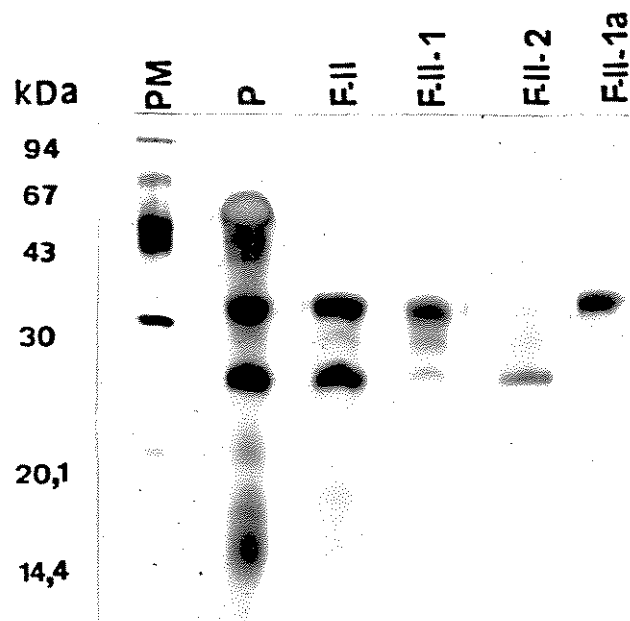


FIGURA 5. ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA-SDS

Corrida eletroforética utilizando-se sistema descontínuo dissociante (HAMES and RICKWOOD) em gel 12% de poliacrilamida. Tempo de corrida de 4h sob voltagem de 100V (40 - 25mA de corrente). Coloração feita por impregnação pela prata (BLUM et al., 1987). F-II, F-II-1, F-II-2 e F-II-1a = frações (5ug) obtidas durante o fracionamento da peçonha de *B. lanceolatus*; P = peçonha de *B. lanceolatus* (10ug); PM = indicadores de peso molecular LMW Calibration Kit (14,400 - 94,000) da Pharmacia-LKB.

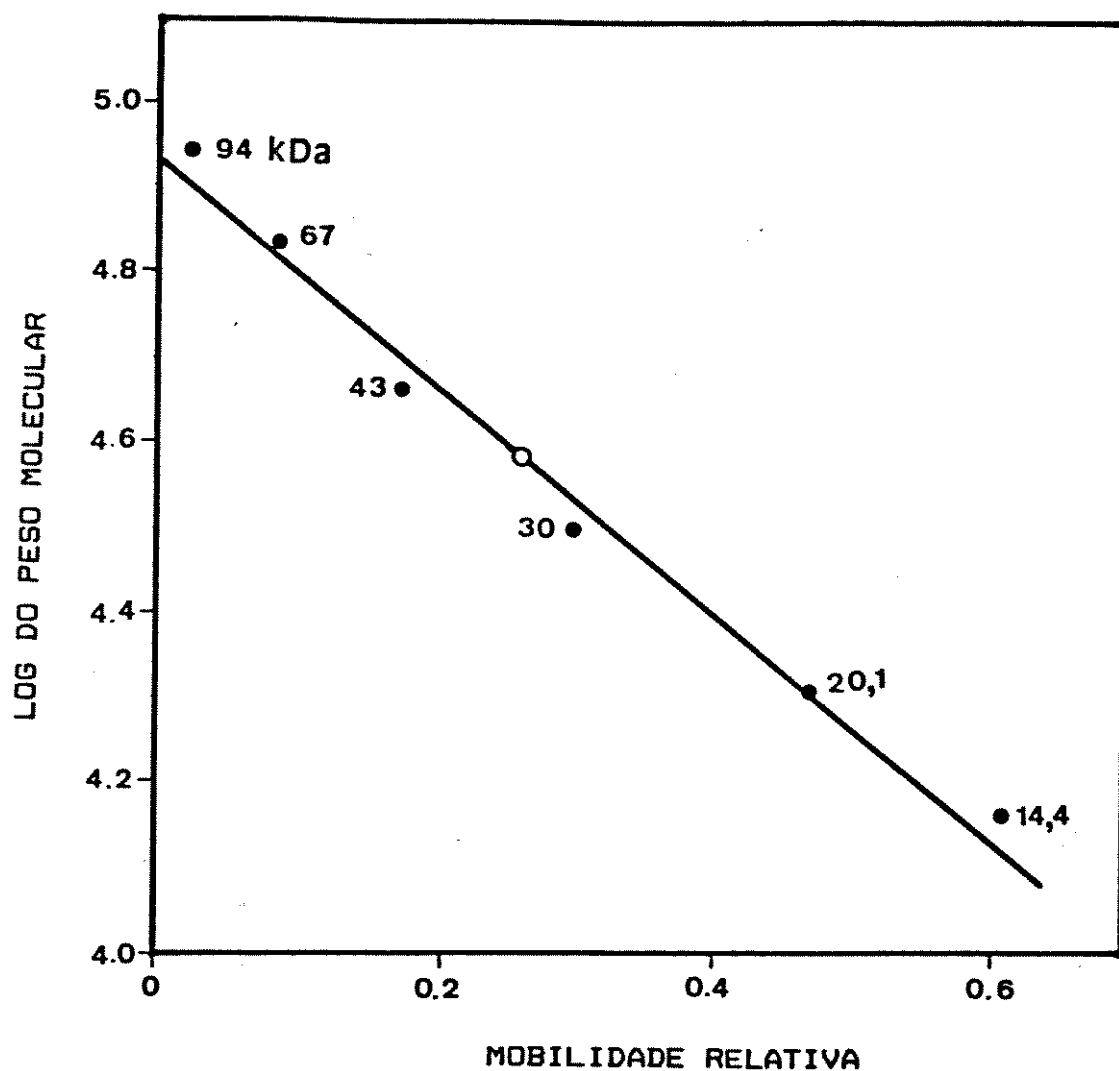


FIGURA 6. DETERMINAÇÃO DO PESO MOLECULAR DA ESTERASE PURIFICADA DA PEÇONHA DE *B. lanceolatus*

O peso molecular foi estimado através de eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS (12%). (●), padrão de peso molecular LMW Calibration Kit (14,400 - 94,000) da Pharmacia-LKB; (O), fração F-II-1a purificada da peçonha de *B. lanceolatus*.

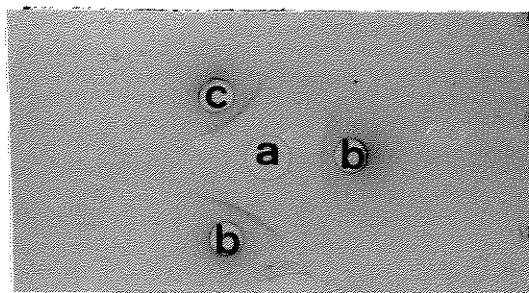


FIGURA 7. IMUNODIFUSÃO DA FRACÇÃO F-II-1a - REAÇÃO COM SORO ESPECÍFICO E POLIVALENTE

O teste de imunodifusão foi feito em gel de agar 1,5% sobre lâmina de microscopia (7,5 X 2,5cm). São mostradas as linhas de precipitação obtidas após reação da fração F-II-1a com o soro específico AS F-II-1a, produzido em coelho, ou com o polivalente, produzido em cavalo. Orifício "a" corresponde ao local onde foram aplicados 10 μ g da fração F-II-1a (20 μ l). Nos orifícios "b" e "c" foram adicionados 20 μ l dos soros específico e polivalente, respectivamente.

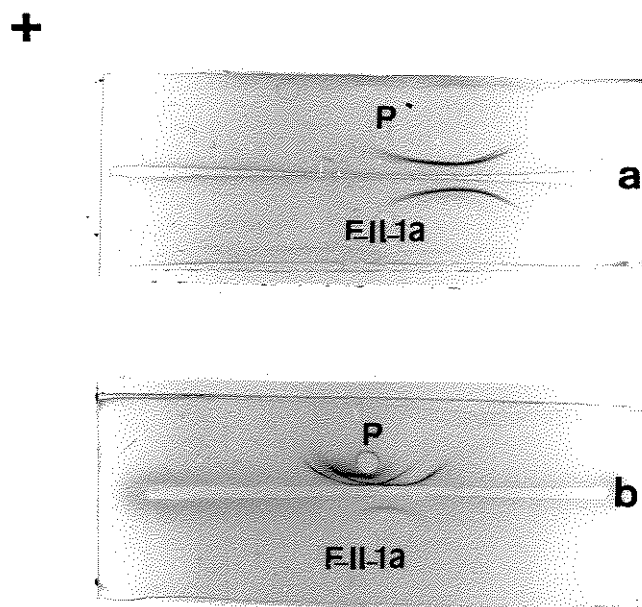


FIGURA 8. IMUNOELETROFORESE DA FRAÇÃO F-II-1a E REAÇÃO COM SOROS ESPECÍFICO E POLIVALENTE.

Imunoelectroforese foi feita em gel de ágar 1,5% e tampão Veronal 50mM pH 8,4 sobre lâmina de microscopia (7,5 X 2,5cm). 10ug da fração F-II-1a e 20ug da peçonha de *Bothrops lanceolatus*, solubilizados no mesmo tampão, foram aplicados no gel. Após corrida eletroforética de 60min sob voltagem de 8volts/cm, seguiu-se a imunodifusão contra o soro específico ("a") e o polivalente ("b"). P = peçonha de *B. lanceolatus*.

A atividade esterásica da fração F-II-1a apresentou-se variável em função da concentração do TAME, mostrando comportamento hiperbólico de uma cinética de Michaelis e Menten (Figura 9). Os valores de Km e velocidade máxima, calculados através da linearização desta curva pelo método de Lineweaver-Burk (Figura 9), foram de $8,5 \times 10^{-4}$ M e 38,55 umoles/min/mg, respectivamente. Estes valores diferem dos encontrados na literatura para uma enzima tipo trombina purificada da peçonha de *Lachesis muta* (MAGALHÃES et al., 1981): $1,5 \times 10^{-4}$ M e 353 umoles/min/mg para Km e Vmax. Utilizando o BAEE como substrato, MARKLAND e DAMUS (1971) determinaram o Km e a Vmax da crotalase como sendo $2,05 \times 10^{-4}$ M e 130 umoles/min/mg, respectivamente.

A atividade hidrolítica sobre o TAME, apresentada pela fração F-II-1a, mostrou-se variável entre os pHs 6,5 e 9,0 (Figura 10). O valor máximo da atividade enzimática foi obtido no pH 8,05. Acima deste valor a atividade esterásica diminuiu rapidamente. MARKLAND and DAMUS (1971) determinaram que a crotalase mostra um perfil sigmoidal da atividade esterásica sobre o BAE em função do pH. A atividade máxima foi exibida acima do pH 8,0. A enzima purificada da peçonha de *L. muta* ~~positivada~~ (MAGALHÃES et al., 1981) mostrou perfil enzimático parecido com o descrito para a fração F-II-1a. A atividade esterásica desta enzima foi máxima no pH próximo de 8,3. Isto mostra que as esterases ofídicas possuem características cinéticas comuns, o que sugere semelhanças na composição do sítio ativo desta enzimas. A crotalase, além da serina, possui um resíduo de histidina no seu sítio ativo, o que foi determinado utilizando-se drogas que

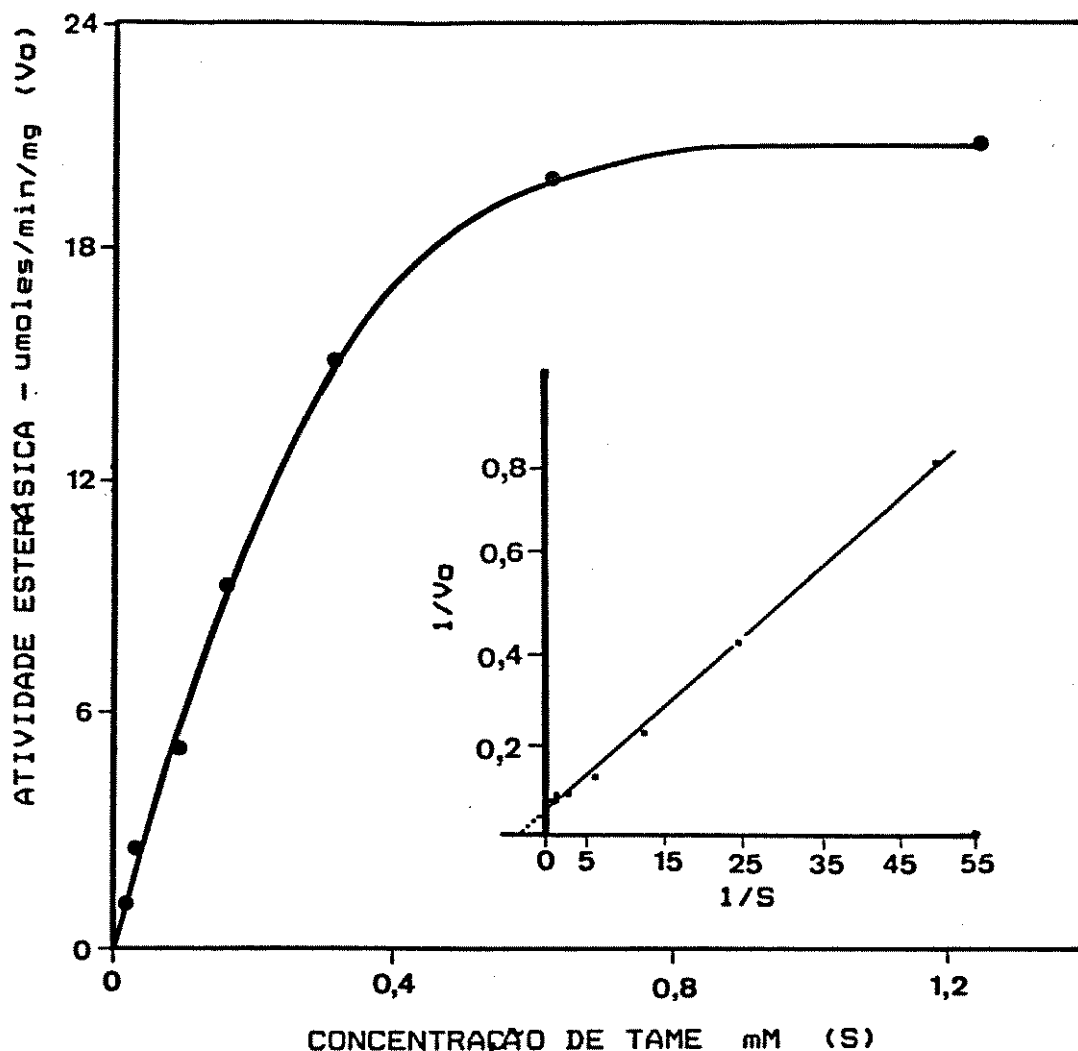


FIGURA 9. EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE SUBSTRATO NA ATIVIDADE ESTERÁSICA DA FRAÇÃO F-II-1a

Curva de MICHAELIS - MENTEN da hidrólise do TAME pela fração F-II-1a. 4,5ug da F-II-1a foram adicionados em 3,0ml de meio de reação contendo TAME (S) em concentração variando de 0,02 a 1,25 mM. Atividade da enzima foi expressa em umoles por min e por miligrama de proteína (Vo). O quadro interno está mostrando o duplo recíproco, que foi utilizado para calcular os valores de Km e velocidade máxima.

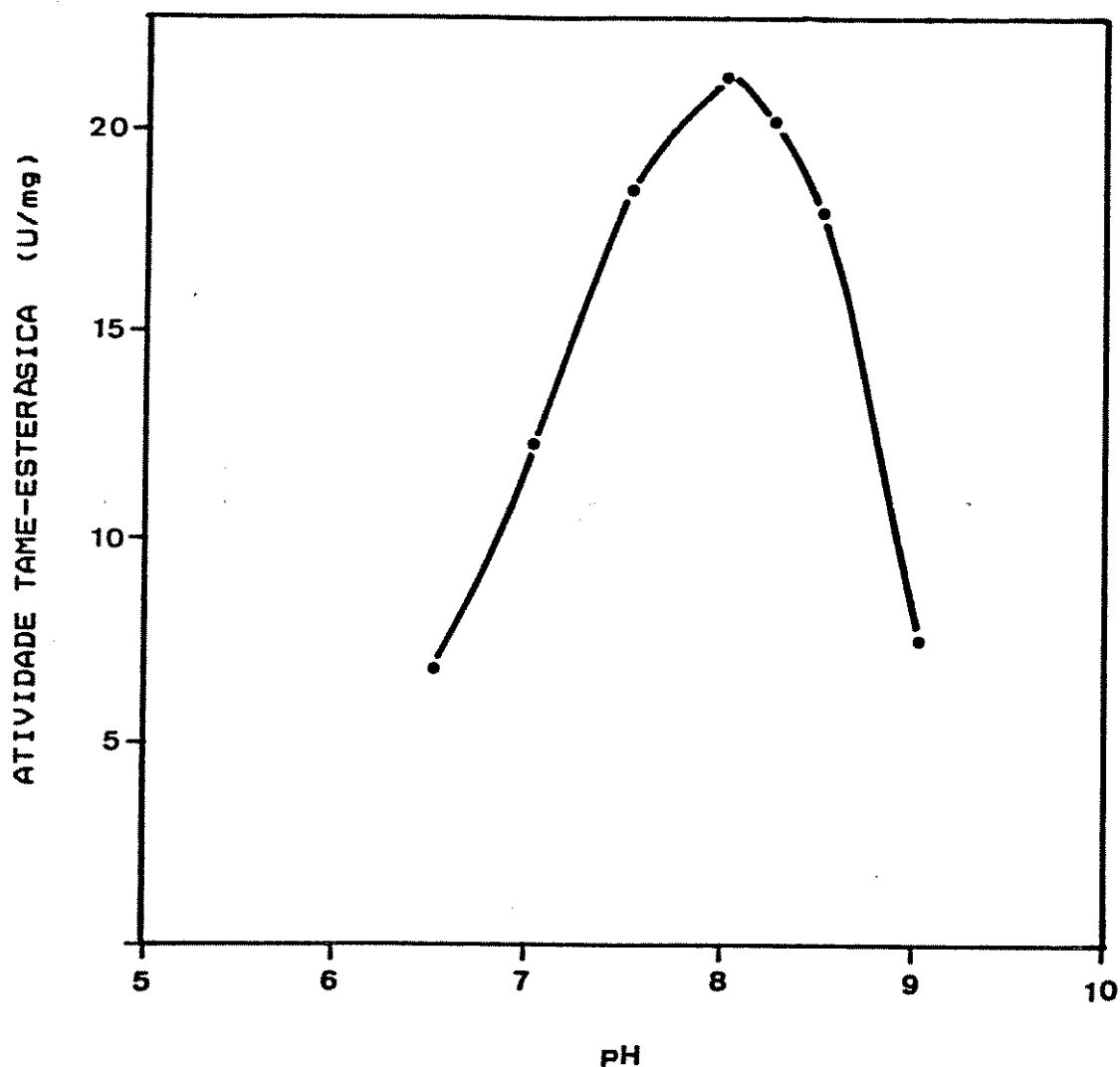


FIGURA 10. EFEITO DO pH SOBRE A ATIVIDADE ESTERÁSICA DA FRAÇÃO F-II-1a

Foram utilizados 4,5 μ g da F-II-1a em 3,0ml de meio de reação contendo TAME 1,0mM solubilizado em tampão Tris-HCl 50mM, com pH variando de 6,5 a 9,0, na presença de CaCl₂ 10mM. A atividade enzimática foi expressa em Unidades/mg de proteína. Os pontos representam a média de quatro determinações com variação experimental abaixo de 10%.

atuam diretamente sobre a histidina (MARKLAND and DAMUS, 1971).

A incubação de 5ug da fração F-II-1a com EDTA 10mM não teve efeito na atividade esterásica sobre o TAME, o que sugere que esta atividade enzimática é independente de Ca^{2+} . Por outro lado, utilizando-se o PMSF em concentrações acima de 5,0mM, a atividade esterásica de 5,0ug da fração F-II-1a foi totalmente inibida. Uma inibição de 80% da atividade enzimática foi observada com PMSF 2,5mM. Estes resultados sugerem que a esterase presente na fração F-II-1a contém serina no seu sítio ativo. Em geral, as enzimas tipo trombina, purificadas de peçonhas ofídicas, são serino esterases e não dependem de Ca^{2+} para expressar sua atividade esterásica, como o que foi determinado para a reptilase de *B. jararaca* (BLOMBACK et al, 1957), crotalase de *C. adamanteus* (MARKLAND and DAMUS, 1971), ancrod de *Agkistrodon rhodostoma* (ESNOUF and TUNAH, 1967; NOLAN et al., 1976), batroxobina de *B. moojeni* (STOCKER and BARLOW, 1976; HOLLEMAN and WEISS, 1976), entre outras.

A atividade hemorrágica foi detectada nas frações F-I e F-II, quando injetadas intradérmicamente no dorso de camundongos. Esta atividade não foi encontrada nas frações F-II-1 e F-II-1a, mostrando ter havido a separação das atividades hemorrágica e esterásica após a cromatografia de troca iônica em DEAE-celulose.

A F-II-1a apresentou atividade coagulante sobre plasma e fibrinogênio. Em ambos os casos, a atividade coagulante mostrou-se dose dependente e, quando comparada à trombina humana

(2.000 NIH unidades/mg), apresentou valor de 2,0 NIH unidades/mg de proteína quando adicionada ao plasma (Figura 11). Esta atividade mostrou-se independente da adição de ions Ca^{2+} .

A atividade coagulante sobre plasma e fibrinogênio humanos da esterase, presente na fração F-II-1a da peçonha de *E. lanceolatus*, está muito abaixo das atividades determinadas para outras esterases ofídicas que possuem atividade tipo trombina. De fato, quando comparamos os nossos resultados com os descritos na literatura para algumas destas esterases, como: ancrod, 1200 NIH/mg (ESNOUF and TUNNAH, 1967; NOLAN et al., 1976); reptilase, 70 (EGBERG et al. 1971); crotalase, 223 (MARKLAND and DAMUS, 1971); batroxobina da peçonha de *E. moccini*, 220 (HOLLEMAN and WEISS, 1976); batroxobina da peçonha de *E. atrox*, 1000 (HOLLEMAN and WEISS, 1976); esterase purificada da peçonha de *L. muta*, 1600 (MAGALHÃES et al., 1981) e também à atividade da trombina humana (2000 NIH unidades/mg), o valor encontrado da ordem de 2,0 NIH/mg é muito discreto.

A fração F-II-1a apresentou baixa atividade proteolítica sobre a caseína (0,75U/mg). Esta atividade mostrou-se dependente de cátions divalentes, principalmente o Ca^{2+} . A substituição do Ca^{2+} por Mg^{2+} resultou em uma diminuição de 55% da atividade específica. Quando EDTA foi adicionado ao meio de reação, a F-II-1a foi inativa sobre caseína (Figura 12). Devido as características do método utilizado para a dosagem da atividade proteolítica sobre a caseína, como discutido anteriormente, a

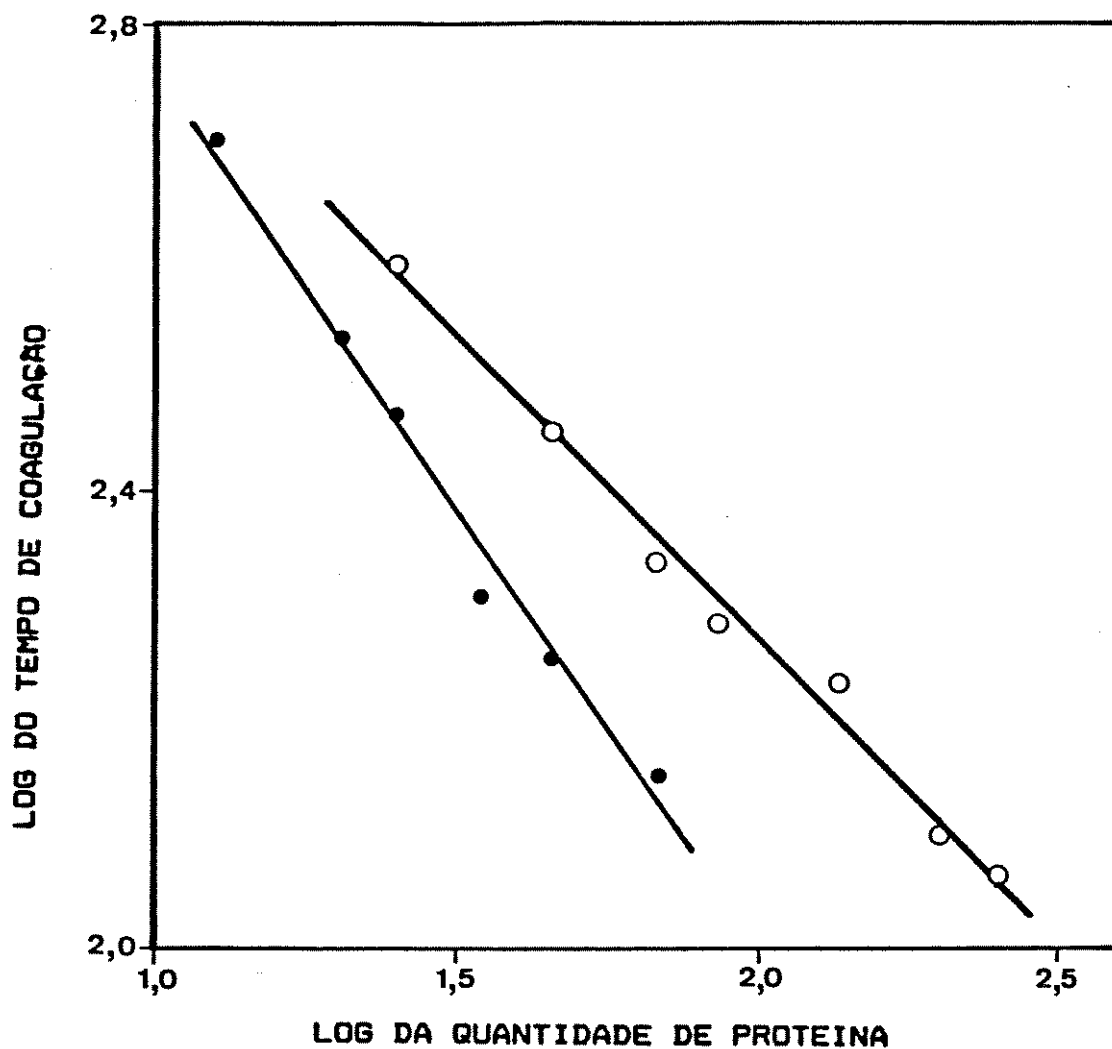
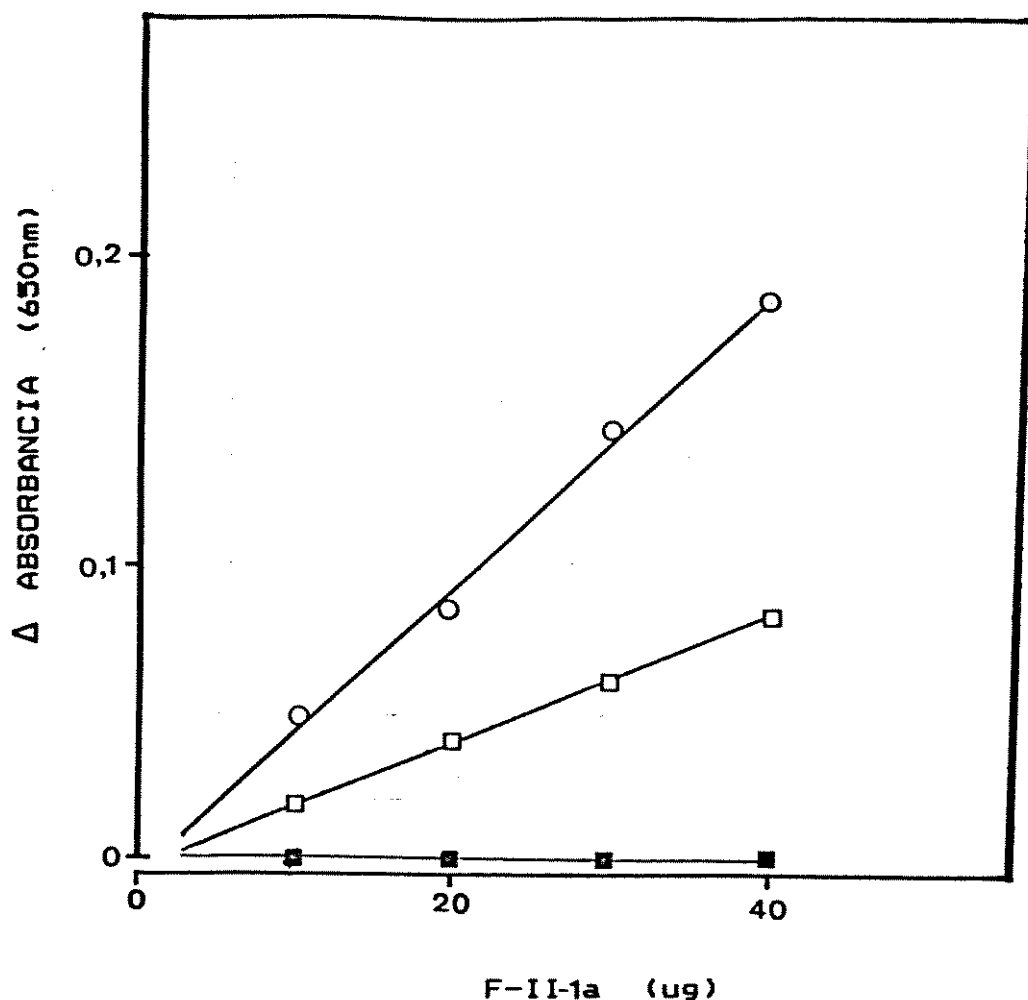


FIGURA 11. ATIVIDADE COAGULANTE DA FRAÇÃO F-II-1a

A atividade coagulante da F-II-1a foi determinada sobre 200ul de plasma humano citratado (3,8% de citrato de sódio) (●) e sobre 200ul de fibrinogênio humano 2,0mg/ml (○). O tempo necessário para a formação da rede de fibrina foi determinado a 37°C. Os pontos representam a média de quatro determinações com variação experimental abaixo de 15%.



**FIGURA 12. ATIVIDADE CASEINOLÍTICA DA FRAÇÃO F-II-1a
DEPENDENCIA DE CATIONS DIVALENTES**

Em 1,0ml de caseína 1%, solubilizada em tampão Tris-HCl 100mM, foram adicionadas diferentes quantidades da fração F-II-1a. A atividade enzimática (U/mg) foi avaliada na presença de: Ca²⁺ 4,0mM (O), Mg²⁺ 4,0mM (□) e EDTA 20mM (■). Os pontos representam a média de quatro determinações, com variação experimental abaixo de 10%.

enzima presente na fração F-II-1a pode ser uma proteinase com especificidade para determinados substratos proteicos.

De fato, quando estudamos a ação da fração F-II-1a sobre as cadeias do fibrinogênio, determinamos que esta fração, na concentração de 40ug/ml, apresentou atividade $A\alpha$ e $B\beta$ fibrinogenolítica. A cadeia $A\alpha$ foi degradada em menos de 10 min de reação, seguindo-se uma hidrólise lenta da cadeia $B\beta$ após tempo prolongado de reação (Figura 13). A enzima não teve efeito sobre a cadeia γ do fibrinogênio, mesmo após 12h de reação. Entre os produtos de degradação, primeiro apareceram polipeptídeos com pesos moleculares estimados em torno de 45.000. Após 10 minutos de reação, novos peptídeos de 15 a 40 kDa foram evidenciados, ao mesmo tempo em que a cadeia $B\beta$ e os produtos iniciais de degradação (45 kDa) foram hidrolisados. Resultados semelhantes foram obtidos por WILLIS and TU (1988) com a hidrólise do fibrinogênio pela "atroxase", uma protease fibrinolítica purificada da peçonha de *Crotalus atrox*. No entanto, a atroxase difere significativamente da esterase de *B. lanceolatus* por possuir peso molecular de 23.500, alta atividade hidrolítica sobre a caseína e ser desprovida de atividade hidrolítica sobre o TAME. As enzimas tipo trombina, purificadas de peçonhas botrópicas, em geral degradam somente a cadeia $A\alpha$ do fibrinogênio, com excessão da enzima purificada da peçonha de *B. insularis*, que apresentou atividade hidrolítica sobre as cadeias $A\alpha$ e $B\beta$ do fibrinogênio (SELISTRE and GIGLIO, 1987).

Estes resultados indicam que a fração F-II-1a cliva o

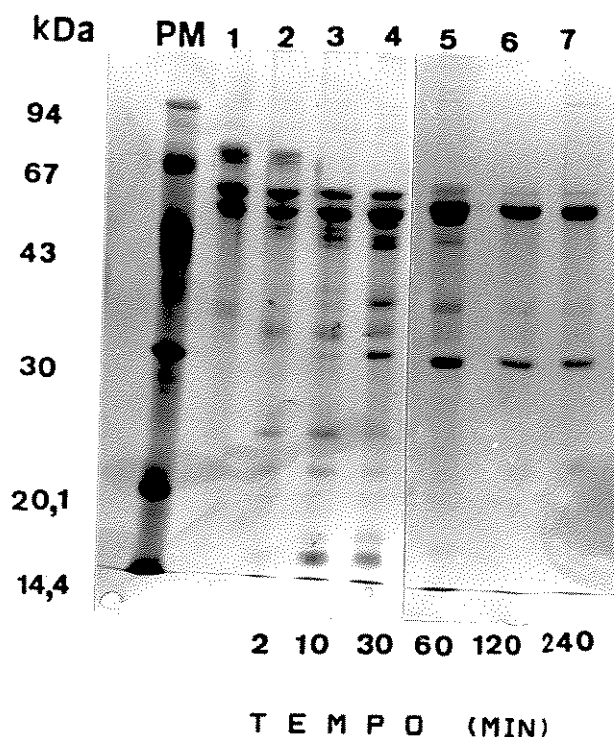


FIGURA 13. ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA-SDS DO FIBRINOGENIO HUMANO APÓS DIGESTÃO PELA FRAÇÃO F-II-1a

Em 200ul de fibrinogênio humano 2,0mg/ml foram adicionados 10ug da fração F-II-1a dissolvidos em 50ul de salina. Fibrinogênio (linha 1) é constituido de três cadeias polipeptídicas: $A\alpha$ (PM = 70.000), $B\beta$ (PM = 54.000) e γ (PM = 48.000). Linhas 2 a 8 representam a corrida eletroforética das amostras do fibrinogênio após incubação com a fração F-II-1a (40ug/ml) para os tempos especificados na parte inferior do gel. PM = indicadores de peso molecular LMW Calibration Kit (14.400 - 94.000) da Pharmacia-LKB.

fibrinogênio de forma diferente à da trombina, pois cadeias α e β , com pesos moleculares de 62.000 e 54.000, respectivamente, são obtidas pela hidrólise do fibrinogênio pela trombina (WILLIS and TU, 1988). No entanto, a cinética de hidrólise das subunidades do fibrinogênio, promovida pela fração F-II-1a assemelha-se à observada com a trombina. A cadeia α do fibrinogênio, que não contém carboidrato detectável, é a primeira subunidade a ser degradada pela trombina e plasmina. A subunidade β , que contém carboidrato, é degradada mais lentamente. Finalmente, a cadeia γ do fibrinogênio, que também contém carboidrato, é mais resistente do que as outras subunidades, sendo degradada pela plasmina somente em tempos de digestão prolongados (PIZZO et al., 1973).

Com base nas atividades fibrinogenolítica, coagulante e hemorrágica, TU (1988) agrupou as proteinases ofídicas em três classes distintas: 1-) Fibrinogenases que formam coágulo sem causar hemorragia; 2-) Fibrinogenases que não formam coágulo e causam hemorragia; 3-) Fibrinogenases que não formam coágulo e não causam hemorragia.

A primeira classe compreende as enzimas tipo trombina, como batroxobina, ancrod, crotalase, entre outras. A segunda classe é representada pelas hemorraginas com atividade fibrinogenolítica, como a HR-1. Finalmente, a terceira classe é constituída pelas proteinases anticoagulantes, como a atroxase de *C. atrox*. Em geral, as enzimas pertencentes a este grupo são metaloendopeptidases. A esterase presente na fração F-II-1a

enquadra-se no primeiro grupo de proteinases, tendo-se em vista sua atividade fibrinogenolítica, capacidade de formação de coágulo e por não induzir hemorragia em camundongos. Porém, a atividade tipo trombina da F-II-1a, como já mencionado, é bastante baixa.

A ausência de atividade coagulante sobre plasma na peçonha de *B. lanceolatus* pode ser explicada pela discreta atividade coagulante desta peçonha sobre fibrinogênio e rápida hidrólise da cadeia A α do fibrinogênio pela F-II-1a e outras proteinases, associadas à presença de uma fosfolipase anticoagulante. Estes resultados sugerem que a peçonha de *B. lanceolatus* atua sobre a hemostasia, podendo causar aumento do tempo de coagulação do plasma "in vivo". Este efeito ocorre de uma forma diferente à descrita para outras peçonhas botrópicas que, normalmente, causam incoagulabilidade sanguínea através da ação de enzimas tipo trombina, que transformam rapidamente o fibrinogênio em fibrina, sendo esta degradada pelo sistema fibrinolítico natural do organismo animal. No entanto, para se chegar a resultados mais conclusivos, são necessários trabalhos visando avaliar os efeitos da peçonha de *B. lanceolatus* e de suas frações sobre a coagulação sanguínea "in vivo".

A incoagulabilidade sanguínea, isoladamente, é um estado relativamente benigno (RECHNIC et al., 1962; MARSTEN et al., 1966; REID, 1967; OHSAKA, 1979). Enzimas tipo trombina purificadas de peçonhas ofídicas, como a batroxobina e ancrod,

têm sido testadas com a finalidade de serem utilizadas terapeuticamente em casos de trombose venosa (KORNALIK, 1985). Contudo, a incoagulabilidade sanguínea pode agravar a hemorragia causada primariamente pela ação destrutiva da peçonha sobre as paredes dos vasos e tecidos adjacentes (OHSAKA, 1979). Sendo assim, como a peçonha de *B. lanceolatus* apresenta alta atividade hemorrágica quando injetada intradermicamente no dorso de camundongos, podemos sugerir que tal serpente desenvolveu, ou está desenvolvendo em sua peçonha, um mecanismo diferenciado de causar incoagulabilidade sanguínea com a finalidade de aumentar os efeitos tóxicos de fatores hemorrágicos. Este mecanismo pode ter se desenvolvido devido ao isolamento geográfico da *B. lanceolatus* em uma ilha, onde as pressões evolutivas são normalmente maiores do que no continente. Acredita-se que a evolução química das proteínas em peçonhas ofídicas ocorre principalmente devido a fatores ambientais, disponibilidade e tipo de alimento (presas), entre outros. A comprovação e a vantagem evolutiva das alterações apresentadas pela peçonha de *B. lanceolatus* só serão possíveis em estudos que visem avaliar a interação da peçonha com a presa disponível para esta serpente.

A proteína presente na fração F-II-1a, purificada da peçonha de *B. lanceolatus*, apresenta características enzimáticas do tipo serino esterase e fibrinogenase de cadeia A e B. Os resultados obtidos até o momento permitem dizer que esta enzima presta-se como uma ferramenta para o estudo dos mecanismos da coagulação e das relações filogenéticas das serpentes, bem como para desvendar aspectos evolutivos de proteínas ofídicas.

4. CONCLUSÕES

4.1. A peçonha de *B. lanceolatus*, serpente que habita a ilha Martinica na América Central, apresenta altas atividades caseinolítica, fosfolipásica, esterásica sobre TAME e hemorrágica, quando comparada às peçonhas de sete *Bothrops* brasileiras (*B. alternatus*, *B. erythromelas*, *B. insularis*, *B. jararaca*, *B. jararacussu*, *B. mooieni* e *B. neuwiedi*).

4.2. Nas peçonhas estudadas, as atividades caseinolítica e TAME-esterásica não estão diretamente relacionadas às atividades hemorrágica e coagulante, respectivamente.

4.3. O método utilizado para o isolamento da fração esterásica da peçonha de *B. lanceolatus* mostrou-se eficiente. A fração F-II-1a foi purificada 14,5 vezes, com rendimento proteico de 4% e recuperação de 58% da atividade enzimática. Os resultados da análise eletroforética em gel de poliacrilamida-SDS e dos testes de imunodifusão e imunoeletroforese, sugerem que a proteína presente na fração F-II-1a foi purificada com alto grau de pureza. Esta proteína é constituída por apenas uma cadeia polipeptídica, com peso molecular estimado em 38.100.

4.4. A atividade esterásica da fração F-II-1a foi fortemente influenciada pelo pH do meio de reação. A atividade máxima foi obtida no pH 8,05. Além disso, esta fração comporta-se como uma serino esterase, devido a inibição total da sua atividade

enzimática na presença de PMSF 5 mM. A não inibição da atividade esterásica por EDTA 10 mM, sugere que a enzima não utiliza cátions divalentes como cofatores.

4.5. A atividade coagulante da fração F-II-1a foi cerca de 1.000 vezes menor do que a da trombina. Esta fração foi caracterizada como uma $A\alpha$ e $B\beta$ fibrinogenase. A especificidade de hidrólise foi acentuadamente maior para a cadeia $A\alpha$ do fibrinogênio. A cadeia $B\beta$ só foi hidrolisada em tempos prolongados de reação, enquanto que a cadeia β mostrou-se resistente à hidrólise enzimática. Os peptídeos, resultantes da digestão enzimática do fibrinogênio pela F-II-1a, diferem acentuadamente, na análise eletroforética, dos produzidos pela ação da trombina. Isto ocasiona a formação de uma rede de fibrina anômala, o que contribui para a baixa atividade coagulante da fração F-II-1a. Esta característica, associada à presença de proteases e de uma fosfolipase anticoagulante, pode ser um fator que contribui para a ausência da atividade coagulante sobre plasma na peçonha de *B. lanceolatus*.

5. RESUMO

Peçonhas ofídicas são constituídas principalmente de proteínas. Muitas destas proteínas têm características enzimáticas como as fosfolipases, proteases, esterases, L-aminoácido oxidase, entre outras.

Inicialmente, comparamos as atividades enzimáticas e biológicas da peçonha de *Bothrops lanceolatus* em relação às atividades de sete espécies de *Bothrops* brasileiras (*B. alternatus*, *B. erubronelae*, *B. insularis*, *B. jararaca*, *B. jararacussu*, *B. moojeni* e *B. neuwiedi*). Determinamos assim, que a peçonha de *Bothrops lanceolatus* apresenta altas atividades caseinolítica, fosfolipásica, esterásica sobre o TAME e hemorrágica. Além disso, apesar de não exibir atividade coagulante sobre plasma humano citratado, esta peçonha coagula o fibrinogênio, o que sugere a presença de enzima(s) tipo trombina. Verificamos que, entre as peçonhas estudadas, a atividade TAME-esterásica não está diretamente relacionada com a atividade coagulante sobre plasma.

O isolamento da fração esterásica da peçonha de *B. lanceolatus* foi feito utilizando-se cromatografias de exclusão e de troca iônica. Em cada etapa do isolamento, as amostras foram ensaiadas em relação às atividades TAME-esterásica, caseinolítica, fosfolipásica e coagulante sobre plasma e fibrinogênio humanos. Ao final deste processo, foi obtida uma fração (F-II-1a) com atividade esterásica 14,5 vezes maior do que

a peçonha total. O rendimento proteico foi de 4%, com uma recuperação de 58% da atividade enzimática.

Utilizando-se eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS, constatamos que a proteína presente na fração F-II-1a apresenta uma única cadeia polipeptídica, com peso molecular estimado em 38.100. Em testes de imuno-eletroforese e imunodifusão, esta fração reagiu tanto com o soro específico como com o polivalente, promovendo a formação de apenas uma linha de precipitação. Estes resultados sugerem elevado grau de pureza da proteína presente na fração F-II-1a.

Utilizando o TAME como substrato, a fração F-II-1a apresentou os valores de $8,5 \times 10^{-4}$ M e 38,55 umoles/min/mg para K_m e velocidade máxima, respectivamente. A atividade TAME esterásica foi fortemente influenciada pelo pH do meio de reação, sendo o valor de 8,05 encontrado como o pH ótimo de hidrólise. Esta atividade não foi afetada pelo EDTA 10 mM, ao passo que foi totalmente inibida por PMSF 5mM.

A fração F-II-1a apresentou baixa atividade coagulante sobre plasma e fibrinogênio humanos, bem como uma discreta atividade proteolítica sobre a caseína. Utilizando fibrinogênio humano, foi determinado que a fração F-II-1a apresenta atividade $A\alpha$ e $B\beta$ fibrinogenolítica. A cadeia $A\alpha$ foi rapidamente hidrolisada (10 min de reação), enquanto que a $B\beta$ só foi hidrolisada em tempos prolongados de reação. Esta fração não teve efeito sobre a cadeia μ , mesmo após 4h de hidrólise.

6. SUMMARY

Proteins are the major components of snake venoms. Many of these proteins are enzymes and the most common are phospholipases, proteases, ester hydrolases and L-amino acid oxidases.

In the present work we initially examined the crude venom of *Bothrops lanceolatus*, comparing its enzymatic and biological activities with those of Brazilian *Bothrops* species (*B. alternatus*, *B. erythromelas*, *B. insularis*, *B. jararaca*, *B. jararacussu*, *B. moojeni* and *B. neuwiedi*). We established that *B. lanceolatus* venom has high caseinolytic, phospholipasic, esterolytic and hemorrhagic activities. In spite of having no coagulant effect on plasma, this venom has a thrombin-like enzyme since it is able to clot fibrinogen. In the venoms studied, there was no correlation between the esterolytic and coagulant activities.

Isolation of the esterolytic fraction from *B. lanceolatus* venom was achieved by various chromatographic steps, including gel filtration and ion exchange chromatography. Biological and enzymatic activities were determined at each stage of the purification process in order to locate the esterolytic fractions. The protein yield was 4% with a 58% recovery in enzyme activity. The purification factor was 14.5.

In the presence of SDS and mercaptoethanol, the fraction F-II-1a yielded only one protein band with a molecular weight of 38,100. Immunodiffusion and immunoelectrophoresis of fraction F-II-1a against anti-Bothrops lanceolatus venom horse serum and the specific rabbit anti-fraction F-II-1a both resulted in only one precipitation line. Together, these results confirm the purity of the isolated fraction.

The K_m and V_{max} of the purified enzyme were determined using TAME as the substrate. These values, calculated from Lineweaver-Burk plots were 8.5×10^{-4} M for the K_m and 38.55 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ for the V_{max} . The esterolytic activity of fraction F-II-1a was examined over the pH range 6.5 to 9.0. Maximum activity was exhibited at pH 8.05.

SDS-polyacrylamide gel electrophoresis analysis showed that fraction F-II-1a is a $A\alpha$ and $B\beta$ fibrinogenase. The $A\alpha$ chain is degraded within 10 min followed by a slower degradation of the $B\beta$ chain. The fibrinogenase appeared to have no effect on the β chain after 4h of hydrolysis.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ASSAKURA, M.T.; REICHL, A.P.; ASPERTI, M.C.A. and MANDELBAUM, F.R. Isolation of the major proteolytic enzyme from the venom of the snake *Bothrops mooieni* (caissaca). *Toxicon*, 23: 691-706, 1985.
- BAJWA, S.S.; KIRAKOSSIAN, H.; REDDY, K.N.M. and MARKLAND, F.S. Thrombin-like and fibrinolytic enzymes in the venoms from the gaboon viper (*Bitis gabonica*), eastern cottonmouth (*Agkistrodon piscivorus*) and southern copperhead (*Agkistrodon c. contortrix*) snakes. *Toxicon*, 20: 427- 432, 1982.
- BJARNASON, J.B. and TU, A.T. Hemorrhagic toxins from wester diamondback rattlesnake (*Crotalus atrox*) venom: Isolation and characterization of five toxins and the role of zinc in hemorrhagic toxin e. *Biochemistry*, 17: 3395 - 3404, 1978.
- BLOMBACK, B.; BLOMBACK, M. and NILSSON, I.M. Coagulation studies on "reptilase", an extract of the venom of *Bothrops jararaca*. *Thromb. Diath. Haemorrh.*, 1: 76-81, 1957.
- BLUM, H.; BEIER, H. and GROSS, H.J. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis*, 8: 93-99, 1987.

- BOQUET, P. Venins de serpents. I. Physio-pathologie de l'envenimation et propriétés biologiques des venins. *Toxicon*, 2: 5-41, 1964.
- BOQUET, P. Venins de serpents. II. Constitution chimique des venins de serpents et immunité antivenimeuse. *Toxicon*, 3: 243-279, 1966.
- CIVELLO, D.J.; DUONG, H.L. and GEREN, C.R. Isolation and characterization of the hemorrhagic proteinase from timber rattlesnake venom. *Biochemistry*, 22: 749-755, 1983.
- EAGLE, H. The coagulation of blood by snake venoms and its physiological significance. *J. Exp. Med.*, 65: 613-639, 1937.
- EFRATI, P. and REIF, L. Clinical and pathological observations on sixty-five cases of viper bite in Israel. *Amer. J. Trop. Med. Hyg*, 2: 1085-1108, 1953.
- EGBERG, N.; BLOMBACK, M.; JOHNSON, H.; ABILDGAARD, U.; BLOMBACK, B.; DIENER, G.; EKESTRÖM, S.; GÖRANSSON, L.; JOHANSSON, S.A.; McDONAGH, J.; McDONAGH, R.; NILSSON, S.E.; NORDSTRÖM, S.; OLSSON, P. and WIMAN, B. Clinical and experimental studies on reptilase. *Thrombos. Diathes. Haemorrh. (Stuttg) (Suppl)*, 47: 379-387, 1971.

ESNOUF, M.F. and TUNNAH, G.W. The isolation and properties of the thrombin-like activity from *Agkistrodon rhodostoma* venom. *Brit. J. Haematol.*, 13: 581-590, 1967.

FLOWERS, H.H. The effects of X-irradiation on the biological activity of cottonmouth moccasin (*Agkistrodon piscivorus*) venom. *Toxicon*, 1: 131-136, 1963.

GRABAR, F. and BURTIN, F. Immuno-electrophoretic analysis. Amsterdam - London - New York, Elsevier Publishing Company, 1964.

GOUCHER, C.R. and FLOWERS, H.H. The chemical modification of necrogenic and proteolytic activities of venom and the use of EDTA to produce *Agkistrodon piscivorus* venom toxoid. *Toxicon*, 2: 139-147, 1964.

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

HAMES, B.D. and RICKWOOD, D. An Introduction to polyacrylamide gel electrophoresis. In: Gel electrophoresis of proteins: a practical approach. Eds. HAMES, B.D. and RICKWOOD, D. Oxford, IRL Press Limited, 1982. p. 2-91.

- HARTREE, E.F. Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. *Anal. Biochem.*, 48: 422-427, 1972.
- HATTON, M.W.C. Studies on the coagulant enzyme from *Agkistrodon rhodostoma* venom. Isolation and some properties of the enzyme. *Biochem. J.*, 131: 799-807, 1973.
- HENRIQUES, O.B.; FICHMAN, M. and HENRIQUES, S.B. Partial purification and some properties of the blood clotting factor from the venom of *Rothrops iacaraca*. *Biochem. J.*, 75: 551-557, 1960.
- HENRIQUES, O.B.; LAURAS, A.A.C., FICHMAN, M.; MANDELBAUM, F.R. and HENRIQUES, S.B. The proteolytic activity of the venom of *Rothrops iacaraca*. *Biochem. J.*, 68: 597-563, 1958.
- HOGUE, A.R. Notas herpetológicas - reavaliação de *B. lanceolata* (Lacépède). *Mem. Inst. Butantan*, 24: 231-236, 1952.
- HOGUE, A.R. Preliminary account on neotropical Crotalinae. *Mem. Inst. Butantan.*, 32: 109-184. 1965.
- HOGUE, A.R. and ROMANO HOGUE, S.A.R.W.L. Poisonous snakes of the world. Part I - Check list of the pit vipers Viperioidea, Viperidae, Crotalinae. *Mem. Inst. Butantan*, 42/43: 179-310, 1978/1979.

- HOLLEMAN, W.H. and WEISS, L.J. The thrombin-like enzyme from *Bothrops atrox* venom. *J. Biol. Chem.*, 251: 1663-1669, 1976.
- HOLTZ, P. and RAUDONAT, H.W. Über beziehungen zwischen proteolytischer aktivität und blutcoagulierender sowie bradykinin-freisetzender. *Naunyn-Schmiedebergs. Arch. exp. Path. Pharmacol.*, 229: 113 - 122, 1956.
- HOMMA, H. and TU, A.T. Morphology of local tissue damage in experimental snake envenomation. *Br. J. Exp. Path.*, 52: 538-542, 1971.
- HUMMEL, B.C.W. A modified spectrophotometric determination of chymotrypsin, trypsin and thrombin. *Canad. J. Biochem. Physiol.*, 37: 1393-1397, 1959.
- IWANAGA, S. and SUZUKI, T. Enzymes in snake venom. In: Handbook of Experimental Pharmacology. Vol 52. Snake Venom. Ed. Lee, C.Y. Berlin, Springer, 1979. p. 61-158.
- JIMENEZ-PORRAS, J.M. Pharmacology of peptides and proteins in snake venom. *Ann. Rev. Pharmacol.*, 8: 299-318, 1968.
- JIMENEZ-PORRAS, J.M. Biochemistry of snake venoms. *Clin. Toxicol.*, 3: 389-431, 1970.

- JUANG, R.H.; CHANG, Y.D.; SUNG, H.Y. and SU, J.C. Oven-drying method for polyacrylamide gel slab packed in cellophane sandwich. *Anal. Biochem.*, **141**: 348-350, 1984.
- KAISER, I.I.; GUTIERREZ, J.M.; PLUMMER, D.; AIRD, S.D. and ODELL, G.V. The amino acid sequence of a myotoxic phospholipase from the venom of *Bothrops asper*. *Arch. Biochem. Biophys.*, **249**: 329-325, 1990.
- KAMIGUTI, A.S.; SILVA, M.C.C.S.; MORENA, P. and NAHAS, L. The anticoagulant effect of *Bothrops castelnaudi* snake venom (Castelnaud' pit viper). *Toxicon*, **23**: 383-391, 1985.
- KIRBY, E.P.; NIEWIAROWSKI, S.; STOCKER, K.; KETTNER, CH.; SHAW, E. and BRUDZYNSKI, T.M. Thrombocytin a serine protease from *Bothrops atrox* venom. Purification and characterization of the enzyme. *Biochemistry*, **18**: 3564-3570, 1979.
- KONDO, H.; KONDO, S.; IKEZAWA, H.; MURATA, R. and OHSAKA, A. Studies on the quantitative method for determination of hemorrhagic activity of habu snake venom. *Jpn. J. Med. Sci. Biol.*, **13**: 43-48, 1960.
- KORNALIK, F. The influence of snake venom enzymes on blood coagulation. *Pharmacol. Ther.*, **29**: 353-405, 1985.

KOSUGI, T.; ARIGA, Y.; NAKAMURA, M. and KINJO, K. Purification and some chemical properties of thrombin-like enzyme from *Trimeresurus flavoxiridis* venom. *Throm. and Haemost.*, 55: 24-30, 1986.

KUNITZ, M. Crystalline soybean trypsin inhibitor IIa. General properties. *J. Gen. Physiol.*, 30: 291-310, 1947.

KURECKI, T. and KRESS, L.F. Purification and partial characterization of a high molecular weight metalloproteinase from the venom of *Crotalus adamanteus* (Eastern diamondback rattlesnake). *Toxicon*, 23: 855-863, 1985.

KURECKI, T.; LASKOVSKI, M. and KRESS, L.F. Purification and some properties of two proteinases from *Crotalus adamanteus* venom that inactivate human-proteinase inhibitor. *J. Biol. Chem.*, 253: 8340, 1978.

LEITE, A.F. e OLIVEIRA, A.R. Furágar. *Summa Phitopathologica*, 1: 143-146, 1975.

LOBO DE ARAÚJO, A. Isolamento e caracterização da fosfolipase presente no veneno de *Bothrops lanceolatus*. Tese de Doutorado em Ciências, Instituto de Biologia, UNICAMP, 139p, 1990.

- LÓBO DE ARAÚJO, A.; DONATO, J.L.; MORENO, R.A. and PRADO FRANCESCHI, J. Comparison of the phospholipase A₂, blood-clotting, caseinolytic, esterolytic and hemorrhagic activities of some *Bothrops* snake venoms. In: Third Pan-American Symposium on Animal, Plant and Microbial Toxins, Oaxtepec, 1990. *Toxicon*, 28: 601, 1990.
- LÓBO DE ARAÚJO, A. and RADVANYI, F. Determination of phospholipase A₂ activity by a colorimetric assay using a pH indicator. *Toxicon*, 25: 1181-1188, 1987.
- LOMONTE, B. and GUTIÉRREZ, J.M. A new muscle damaging toxin, myotoxin II, from the venom of the snake *Bothrops asper* (Terciopelo). *Toxicon*, 27: 725-733, 1989.
- MAGALHÃES, A.; DE OLIVEIRA, G.J. and DINIZ, C.R. Purification and partial characterization of a thrombin-like enzyme from the venom of the bushmaster snake, *Lachesis muta noctivaga*. *Toxicon*, 19: 279-294, 1981.
- MANDELBAUM, F.R.; ASSAKURA, M.T. and REICHL, A.P. Characterization of two hemorrhagic factors isolated from the venom of *Bothrops neuwiedi* (jararaca pintada). *Toxicon*, 22: 193 - 206, 1984.
- MANDELBAUM, F.R. and HENRIQUES, O.B. Purification and properties of *Bothrops* protease A. *Arch. Biochem. Biophys.*, 104: 369 - 374, 1964.

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

MARKLAND, F.S. and DAMUS, P.S. Purification and properties of a thrombin-like enzyme from the venom of *Crotalus adamanteus* (eastern diamondback rattlesnake). *J. Biol. Chem.*, 246: 6460-6473, 1971.

MARSTEN, J.L.; KOK-EWE, C.; AKENEY, J.L. and BOTTI, R.E. Antithrombic effect of malayan pit viper venom on experimental thrombosis of the inferior vena cava produced by a new method. *Circ. Res.*, 19: 514-519, 1966.

MEBS, D. and SAMEJIMA, Y. Isolation and characterization of myotoxic phospholipases A from crotalid venoms. *Toxicon*, 24: 161-168, 1986.

MORI, N.; NIKAI, T. and SUGIHARA, H. Purification of a proteinase (Ac - proteinase) and characterization of hemorrhagic toxins from the venom of the hundred-pace snake (*Agkistrodon acutus*). *Toxicon*, 22: 451-461, 1984.

NAHAS, L.; KAMIGUTI, A.S. and BARROS, M.A.R. Thrombin-like and factor X - activator components of *Boibrops* venom. *Tromb. Haemost.*, 41: 314-328, 1979.

- NAKAR, O.; OVADIA, M. and KOCHVA E. Isolation and characterization of a proteolytic factor from the venom of *Vipera palaestinae*. *Toxicon*, 24: 293 - 304. 1986.
- NEURATH, H. The diversity of proteolytic enzymes. In: *Proteolytic Enzymes: a practical approach*. Eds. Beyon, R.J. and Bond, J.S. Oxford - New York - Tokyo, IRL Press, 1989. p. 1-3.
- NIEWIAROWSKI, S.; KIRBY, E.P.; BRUDZYNSKI, T.M. and STOCKER, K. Thrombocitin, a serine protease from *Bothrops atrox* venom. Interaction with platelets and plasma-clotting factors. *Biochemistry*, 18: 3570-3577, 1979.
- NIKAI, T.; OGURI, E.; KISHIDA, M.; SIGIHARA, H.; MORI, N. and TU, A.T. Reevaluation of hemorrhagic toxin, HR-1, from *Agkistrodon halys blomhoffii* venom: proof of proteolytic enzyme. *Int. J. Biochem.*, 18: 103-108, 1986.
- NOLAN, C.; HALL, L. and BARLOW, G.H. Ancrod, the coagulation enzyme from Malayan pit viper (*Agkistrodon rhodostoma*) venom. *Meth. Enzymol.*, 45: 205-214, 1976.
- OHSAKA, A. Hemorrhagic, necrotizing and edema-forming effects of snake venoms. In: *Handbook of Experimental Pharmacology*. Vol 52. Snake Venom. Ed. Lee, C.Y. Berlin, Springer, 1979. p. 480-546.

OHSAKA, A.; OMDORI-SATOH, T. KONDO, S. and MURATA, R. Biochemical and pathological aspects of hemorrhagic principles in snake venoms with special reference to Habu (*Trimeresurus flayoxiridis*) venom. Mem. Inst. Butantan, Simp. Internac. 33, 193-205, 1966.

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

OUYANG, C.; SHYONG, J. and TENG, C.M. Purification and properties of thrombin-like principle of *Agkistrodon acutus* venom. Its comparison with bovine thrombin. Thromb. Diath. Haemorrh., 26: 224-234, 1971.

OUYANG, C. and YANG, F.Y. Purification and properties of the thrombin-like enzyme from *Trimeresurus gramineus* venom. Biochim. Biophys. Acta, 351: 354-363, 1974.

PIZZO, S.V.; SCHWARTZ, M.L.; HILL, R.L. and McKEE, P.A. The effect of plasmin on the subunit structure of human fibrin. J. Biol. Chem., 248: 4574-4583, 1973.

RAMIREZ, G.A.; FLETCHER Jr, P.L. and POSSANI, L.D. Characterization of the venom from *Crotalus molossus nigrescens* Gloyd (black tail rattlesnake): isolation of two proteases. Toxicon, 28: 285-297, 1990.

RECHNIC, J.; TRACHTENBERG, P.; CASPER, J.; MOROZ, C. and VRIES, A., DE. Afibrinogenemia and thrombocytopenia in guinea pigs following injection of *Echis colorata* venom. **Blood**, 20: 735-749, 1962.

REID, H.A. Defibrination by *Agkistrodon rhodostoma* venom. In Animal Toxins. Eds. RUSSEL, F.E. and SAUNDERS, P.R. Oxford, Pergamon, 1967. p. 323-335.

REID, H.A.; THEAN, P.C. and MARTIN, W.J. Specific antivenine and predonisone in viper-bite poisoning; controlled trial. **Brit. Med. J.**, II: 1378-1380, 1963.

ROSENFELD, G.; HAMPE, O.G. and KELEN, E.M.A. Coagulant and fibrinolytic activity of animal venoms: Determination of coagulant and fibrinolytic index of different species. **Mem. Inst. Butantan**, 29: 143-163, 1959.

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. B cherl, W., Buckley, E. and Deulofeu, V. New York - London, Academic Press, 1968. p. 229-273.

RUSSEL, F.E. Rattlesnake bites in southern California. **Am. J. Med. Sci.**, 239: 51-60, 1960.

SATAKE, M.; MURATA, Y. and SUZUKI, T. Studies on snake venom.
XIII. Chromatographic separation and properties of three
proteinases from *Akistrodon halys blomhoffii* venom. *J.*
Biochem., 53: 438-452, 1963.

SELISTRE, H.S. and GIGLIO, J.R. Isolation and characterization of
a thrombin-like enzyme from the venom of the snake *Bothrops*
insularis (jararaca ilhoa). *Toxicon*, 25: 1135-1144, 1987.

STOCKER, K.; CHRIST, W. and LELOUP, P. Characterization of the
venoms of various *Bothrops* species by immunoelectrophoresis
and reaction with fibrinogen agarose. *Toxicon*, 12: 415-417,
1974.

STOCKER, K. and BARLOW, G.H. The coagulant enzyme from *Bothrops*
atrox venom (Batroxobina). *Meth. Enzymol.*, 45: 214-223, 1976.

STOCKER, K.; FISCHER, H. and MEIER, J. Thrombin-like snake venom
proteinases. *Toxicon*, 20: 265-273, 1982.

SUGIHARA, H.; MORI, N.; NIKAI, T.; KISHIDA, M. and AKAGI, T.
Comparative study of three proteinases from the chinese habu
snake (*Trimedesurus mucrosquamatus*). *Comp. Biochem. Physiol.*,
82B: 29-35, 1985.

SUGIHARA, H.; NIKAI, T.; NIMURA, A. and TANAKA, T. Enzymochemical studies on snake venoms. IX. Purification and properties of arginine ester hydrolases (HE-2) in the venom of *Trimeresurus mucrosquamatus*. J. Pharm. Soc. Jpn., 101: 153-162, 1981.

SUGIHARA, H.; NIKAI, T.; ODA, H. and TANAKA, T. Enzymochemical studies on snake venoms. III. Purification and properties of arginine esterase which possesses clotting activity in the venom of *Agkistrodon acutus*. J. Pharm. Soc. Jpn., 98: 832-840, 1978.

SUGIMORI, M.H.; RODRIGUES NETO, J. e OLIVEIRA, A.R. Novo meio de reação para testes serológicos de dupla difusão em ágar com antígenos de fitobactérias. In: IX Congresso Paulista de Fitopatologia, Piracicaba, 1986. *Summa Phitopathologica*, 12: 33

SUZUKI, T. Pharmacologically and biochemically active components of Japanese ophidian venoms. *Mem. Inst. Butantan, Simp. Internac.*, 33: 519-521, 1966.

SUZUKI, T. and TAKAHASHI, H. Purification of two thrombin-like enzymes from the venom of *Agkistrodon caliginosus* (kankokumamushi). *Toxicon*, 22: 29-38, 1984.

SVASTI, J. and PANIJPAN, B. SDS-Polyacrylamide gel electrophoresis, a simple explanation of why it works. *J. Chem. Educ.*, 54: 560-562, 1977.

TU, A.T. Venoms. Chemistry and Molecular Biology, pp. 239-360.
John Wiley, New York, 1977.

TU, A.T. Hemorrhagic factors. Hemorrhagic proteases from snake
venoms. In: Hemostasis and Animal Venoms. Eds. Pirkle, H. and
Markland, F.S. New York - Basel, Marcel Dekker, 1988. p.
425-455.

VILJOEN, C.C. ; MECHAN, C.M. and BOTES, D.F. Separation of *Bitis*
gabonica venom arginin esterases into kinin-releasing clotting
and fibrinolytic factors. *Toxicon*, 17: 145-154, 1979.

WILLIS, T.W. and TU, A.T. Purification and biochemical
characterization of atroxase, a nonhemorrhagic fibrinolytic
proteases from western diamondback rattlesnake venom.
Biochemistry, 27: 4769-4777, 1988.

YAMAKAWA, Y. and OMORI-SATO, T. A protease in the venom of king
cobra (*Ophiophagus hannah*): purification, characterization and
substrate specificity on oxidized insulin B-chain. *Toxicon*,
26: 1145-1155, 1988.