



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA - DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA

DULCINEIA APARECIDA RIBEIRO

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

PURIFICAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E FUNCIONAL
DE UMA SERINOPROTEASE (URUPROT) DO VENENO DE

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo (a) candidato (a)
Dulcineia Aparecida Ribeiro

Bothrops alternatus (URUTU)

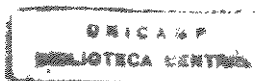
e aprovada pela Comissão Julgadora.

14/12/2000

*Tese apresentada ao Instituto de Biologia da
Universidade Estadual de Campinas para a
obtenção do título de mestre em Biologia
Funcional e Molecular - Área de Bioquímica.*

ORIENTADOR: Prof. Dr. José Camillo Novello

CAMPINAS-SP
Dezembro/2000



80071638

UNIDADE Bc
CHAMADA UNICAMP
R354p
Ex.
OMBO BC/ 44182
PROC. 161892101
C ☐ D ☒
PREÇO R\$ 11,00
DATA 26/04/01
N.º CPD

CM-00154679-1

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP.

1.1. Ribeiro, Dulcinéia Aparecida

R354p

Purificação, caracterização bioquímica e funcional de uma serinoprotease (Uruprot) do veneno de ***Bothrops alternatus*** (Urutu). / Dulcinéia Aparecida Ribeiro. – Campinas, SP. [s.n.], 2000.
88f. illus.

Orientador: José Camillo Novello
Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Purificação. 2 Veneno. 3 Serinoprotease.
4. *Bothrops alternatus*. I. Novello, José Camillo. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

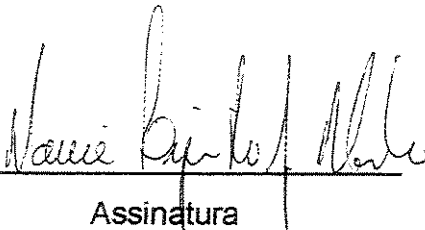
LOCAL E DATA: Campinas, 14 de dezembro de 2000.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. José Camillo Novello (Orientador)


Assinatura

Profa. Dra. Maria Lígia Rodrigues Macedo


Assinatura

Prof. Dr. Marcos Hikari Toyama


Assinatura

Profa. Dra. Eneida de Paula

Assinatura

*À minha família
onde sempre retornarei,
dedico*

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. José Camillo Novello, pela orientação durante o curso de mestrado.

À CAPES, pela bolsa de estudos concedida.

Aos Professores do departamento de Bioquímica que colaboraram para a realização deste trabalho, seja com seus conhecimentos, seja com seu incentivo.

À Marina e Andréia pela convivência agradável e auxílio nas questões burocráticas, bem como aos demais funcionários.

Aos companheiros do Laquip e de outros Departamentos: M. Paulinho, Silvana, Luzia, Bayke, Daniela (Dinha), Marcão, Marquinhos, Flavinha, Bruno, Marcelo, Gláucia, Graça, Luciana (Doro), Paulo Castilho, Paulo Granjeiro, André Hiroshinho e Márcio por ter convivido, e pelas contribuições.

Aos grandes amigos notívagos: Zeca e Luís pela partilha das coisas boas e ruins nas muitas noites em claro trabalhando ou nas discussões regada a cerveja.

Em especial à Cláudia e ao Fernando pelo apoio constante, compreensão e amizade.

Aos eternos amigos, Naylson, Livia, Ju, Náíade, Juzinha, Rê, Lê, Fábio, Maurício, Dani, Dênis, Bia, Marcão, Marcelo, Paulão, Chico e Evandro por "tudo".

A minha segunda família: Dona Maria, Ana, Rô, William e Aninha.

A minha mãe D. Vina meu pai Sebastião e meus irmãos Beto, Sílvia e Tiãozinho, pessoas muito importante na minha vida, pela força (moral, física e psicológica) sempre constante.

ABREVIACÕES	viii
ABREVIACÕES PARA AMINOÁCIDOS	ix
RESUMO	01
SUMMARY	02
INTRODUÇÃO	03
1 - Serpentes e Composição de seus Venenos	03
2 - Caracterização Funcional e Estrutural das Proteases	08
3 - Mecanismo de Ativação da Cascata de Coagulação	11
4 - Ação de Proteínas de Serpentes nos Processos da Cascata de Coagulação	20
OBJETIVOS	27
MATERIAIS E MÉTODOS	28
1 - Veneno	28
2 - Purificação da Serinoprotease-like (Uruprot) de <i>Bothrops alternatus</i>	28
3 - Caracterização Físico-Química da Uruprot	29
4 - Caracterização Funcional da Uruprot	37
RESULTADOS	40
5 – Purificação da serinoprotease-like Uruprot	40
6 – Caracterização Físico-Química da Uruprot	45
7 – Caracterização Funcional da Uruprot	53
DISCUSSÃO	56
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65

Figura 1: Foto de um exemplar da serpente <i>Bothrops alternatus</i> (Urutu)	04
Figura 2: Ilustração da ruptura de um vaso sangüíneo	12
Figura 3: Esquema representativo da cascata da coagulação sangüínea	15
Figura 4: Estrutura do fator de von Willebrand (vWF)	18
Figura 5: Esquema do domínio de ligação na GPIb do vWF	19
Figura 6: Esquema dos domínios de proteínas em um precursor comum	21
Figura 7: Cromatografia em coluna Sephadex G75	42
Figura 8: Cromatografia em coluna SP - 5PW	43
Figura 9: Cromatografia de fase reversa em HPLC	44
Figura 10: Eletroforese de Uruprot em SDS-PAGE	45
Figura 11: Eletroforese de Uruprot com colorações para carboidratos e proteínas	46
Figura 12: Eletroforese bidimensional da fração SIII do veneno total	48
Figura 13: Eletroforese bidimensional de Uruprot	49
Figura 14: Análise da homologia da região N-terminal de Uruprot	52
Figura 15: Efeito inibitório de Uruprot sobre Ristocetina	55
 Esquema 1: Representação esquemática da purificação de Uruprot	 40
 Tabela 1: Composição de aminoácidos de Uruprot	 51
Tabela 2: Concentração mínima hemolizante de Uruprot sobre diferentes eritrócitos	53

ADP – adenosina difosfato
BIPA – agregação plaquetária induzida por Botrocetina
CTBS – salina tamponada com Tris mais CaCl_2
CLPs – proteínas relacionadas com lectina tipo C
2D – cromatografia em duas dimensões
DEAE – dietilaminoetil
DTT – ditioneitol
EDTA – ácido etilenodiamino tetracético
GPIb – glicoproteína plaquetária Ib
GPIIIa – glicoproteína plaquetária IIIa
HPLC – cromatografia líquida de alta eficiência
IEF – focalização isoeletrica
kDa – kilodalton
LAO – L-aminoácido oxidase
MAb – anticorpo monoclonal
MM – massa molecular
MW – massa molecular
PAGE – eletroforese em gel de poliacrilamida
PAS – persulfato de amônio
PBS – salina tamponada com fosfato
PFA – fator de agregação plaquetária
PITC – fenilisotiocianato
PL – plaquetas lavadas
PPP – plasma pobre em plaquetas
PRP – plasma rico em plaquetas
PVDF – polivinildileno difluoreto
RGD – domínio de reconhecimento de glicoproteínas
RIPA – agregação plaquetária induzida por Ristocetina
SDS – dodecil sulfato de sódio
SIPA – agregação plaquetária induzida por stress
TEMED – N-N'-N'-N'- tetrametilenodiamina
TBS – salina tamponada com Tris
TCA – tricloroacético
TFA – ácido trifluoroacético
TRIS – hidroximetil aminometano
Uruprot – serinoprotease do veneno de *Bothrops alternatus*
vWF – fator de von Willebrand

ABREVIações PARA AMINOácIDOS

Aminoácidos	Abreviação (3 letras)	Símbolo
Alanina	Ala	A
Arginina	Arg	R
Asparagina	Asn	N
Ácido aspártico	Asp	D
Cisteína	Cys	C
Glutamina	Gln	Q
Ácido glutâmico	Glu	E
Glicina	Gly	G
Histidina	Hys	H
Isoleucina	Iso	I
Leucina	Leu	L
Lisina	Lys	K
Metionina	Met	M
Fenilalanina	Phe	F
Prolina	Pro	P
Serina	Ser	S
Treonina	Thr	T
Triptofano	Trp	W
Tirosina	Tyr	Y
Valina	Val	V

Nomenclatura IUPAC

RESUMO

Venenos de serpentes contêm uma ampla variedade de enzimas. As proteases purificadas de veneno são geralmente classificadas por sua estrutura em: serinoproteases e metaloproteases, e apresentam potente efeito na ativação ou inibição da coagulação sangüínea, agindo na hemostasia, trombose, fibrinólise e agregação plaquetária. A presente dissertação teve por objetivo purificar e caracterizar a serinoprotease Uruprot do veneno de *Bothrops alternatus*, uma serpente da família Viperidae.

Uruprot foi purificada em dois passos cromatográficos: Sephadex G75 e DEAE 5PW, em sistema HPLC. A homogeneidade de Uruprot foi monitorada em gel SDS-PAGE e em coluna de fase reversa C18. O gel de eletroforese em condições desnaturantes evidenciou uma banda com massa molecular aparente de 32 kDa na presença de 0,1 M de DTT, sugerindo que esta é formada por uma única cadeia polipeptídica.

A eletroforese de duas dimensões de Uruprot demonstrou ser seu ponto isoelétrico em torno de 4,6, confirmando massa molecular observada em SDS-PAGE. A análise da composição de aminoácidos de Uruprot apresentou alta concentração dos aminoácidos glicina, treonina, fenilalanina, isoleucina, serina e glutamina e baixos níveis de aminoácidos básicos como histidina e arginina, ratificando o resultado da 2D caracterizando um pl ácido.

Uruprot teve reação positiva quando submetida à coloração para carboidrato, sugerindo a existência de carboidratos ligados covalentemente à sua estrutura. O estudo da homologia seqüencial da região N-terminal da seqüência consenso (VVGGEDECNINEHR-LVAI) indicou alto grau de homologia com as serinoproteases: TVS-PA (94%), KLE II (94%) e Ancrod (92%) entre outras. Uruprot não induziu a agregação em plaquetas lavadas, mas inibiu a indução da aglutinação de eritrócitos na presença de Ristocetina na concentração mínima de 10 µg/mL. O conjunto de resultados obtidos com Uruprot mostram fortes indícios de que essa pode desempenhar a função de ativadora do plasminogênio, entretanto o papel da atividade “*in vivo*” das serinoproteases de venenos em envenenamentos patológicos é pouco conhecido. Estudos adicionais são necessários para a obtenção de maiores informações sobre esse grupo de enzimas.

SUMMARY

Snake venoms contain a high variety of toxic compounds and enzymes. Venom purified proteases are structurally classified as serine proteases and metalloproteases, and show a potent effect on blood coagulation, acting on hemostasis, thrombosis, fibrinolysis and platelet aggregation. The aim of this work was the purification and characterization of a serine protease from the venom of *Bothrops alternatus* snake, called Uruprot.

Uruprot was purified in a two step chromatography: Sephadex G-75 and DEAE 5PW both in HPLC system. Its homogeneity was monitored in SDS-PAGE and reversed-phase C18 chromatography. In denaturing conditions, 0,1M DTT, a band of 32 kDa apparent molecular mass was evidenced, suggesting that the protein consists in one polypeptidic chain. The two dimensional electrophoresis of Uruprot showed its isoelectric point at about 4,6, confirming the apparent molecular mass observed in SDS-PAGE. Uruprot's amino acid analysis composition showed a high concentration of glycine, threonine, phenylalanine, isoleucine, serine and glutamine and low levels of basic amino acids, as histidine and arginine, ratifying the result obtained from bidimensional electrophoresis wich showed an acid pl.

Uruprot showed a positive reaction when submitted to carbohydrate coloration, indicating the presence of carbohydrate covalently bound to its structure. The N-terminal sequence homology study showed a consensus sequence (VVGDECNINEHR-LVAI) and indicated a high homology with serine proteinase TSV-PA (94%), KLE II (94%), Ancrod (92%), and others. Uruprot did not induce platelet aggregation but inhibits erythrocytes agglutination in the presence of ristocetin, in a minimum concentration of 10µg/mL. All the results obtained indicates that Uruprot is a serine protease plasminogen activator, however, the role of "in vivo" activity of venom serine proteases in envenomation remains unclear. Additional studies are necessary to provide more information about this enzyme group.

INTRODUÇÃO

1 – Serpentes e Composição de seus Venenos.

Até o presente existem registradas cerca de 200 espécies de serpentes venenosas na terra. Estas são classificadas em quatro grandes famílias: Hydrophidae, Elapidae, Viperidae e Crotalidae (Matsui *et al.*, 2000). Segundo Barraviera (1994) no Brasil encontram-se 256 espécies de serpentes catalogadas, sendo 69 venenosas, das quais, 32 pertencem ao gênero **Bothrops** família Viperidae, 6 ao gênero **Crotalus** família Crotalidae, 2 ao gênero **Lachesis** família Crotalidae, 29 ao gênero **Micrurus** família Elapidae. Os acidentes ofídicos no Brasil, em sua grande maioria, são causados por serpentes do gênero **Bothrops** (média de 86%), seguida do gênero **Crotalus** (média de 9%), **Lachesis** (média de 3%), **Micrurus** (média de 0.5%) e não peçonhentos (média de 1.5%).

No gênero **Bothrops** no Brasil, incluem-se as espécies **B. alternatus**, **B. atrox**, **B. bilineatus**, **B. brasili**, **B. castelnaudii**, **B. cotiara**, **B. eriythromelas**, **B. iglesiasi**, **B. insularis**, **B. itapetiningae**, **B. jararaca**, **B. jararacussu**, **B. marajoensis**, **B. moojeni**, **B. neuwidi**, **B. pirajái**, e **B. pradoi**. Sendo que a espécie **B. alternatus** (figura 1) é encontrada nos Estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná, São Paulo, Minas Gerais e Rio de Janeiro, Argentina e Paraguai (Hoge & Romano 1978/1979).

Os acidentes causados por serpentes do gênero **Bothrops** mostram um quadro clínico bastante característico decorrente da ação combinada dos componentes presentes no seu veneno: ações proteolíticas, coagulantes e hemorrágicas. As manifestações locais caracterizam-se pelo aparecimento de equimoses, bolhas e sangramentos no ponto da picada, acompanhados ou não de mionecrose e de enfartamento ganglionar regional. Entre as manifestações sistêmicas, podem ocorrer hemorragias à distância como gengivorragias, epistaxes, hematêmese e hematúria; em alguns casos pode ocorrer ainda hipotensão arterial, choque, hemorragias intensas e insuficiência renal aguda (Cardoso, 1997).

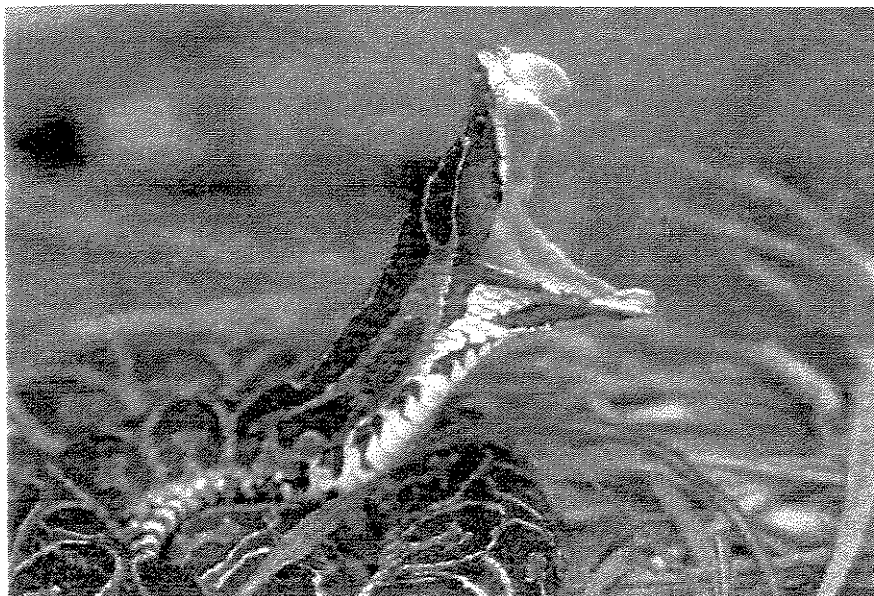


Figura 1: Foto de um exemplar de serpente *Bothrops alternatus* em posição de bote exibindo as presas de veneno envoltas numa membrana chamada “vagina dentalis” (foto de Marcus Buononato).

Os componentes do veneno parecem ter proporções comuns e similares dentro da mesma família de serpentes, isto é, neurotoxinas (que agem sobre o sistema nervoso) são geralmente encontradas no veneno das famílias Hydrophidae e Elapidae, enquanto que toxinas hemorrágicas e mionecróticas no veneno das Crotalidae e Viperidae (Matsui *et al.*, 2000).

Segundo Varanda & Giannini (1994), os venenos de serpentes são ricos em substâncias farmacologicamente e bioquimicamente ativas. Sua composição química varia de espécie para espécie e sua ação depende da natureza dos elementos presentes e da interação biológica entre estes elementos. Segundo Daltry *et al.* (1996), a função primordial do veneno de serpentes é a imobilização e digestão de animais capturados, e serpentes da mesma espécie podem diferir na composição do veneno devido a posição

geográfica em que se encontram e a diversidade de animais disponíveis para sua alimentação.

Aproximadamente 90% a 95% do peso seco dos venenos de serpentes são compostos de proteínas com funções diversas, incluindo neurotoxinas, cardiotoxinas, citotoxinas, fatores de crescimento de nervos, lectinas, proteínas ligantes ao fator de von Willebrand, proteínas ligante aos fatores IX e X, proteínas ligantes a glicoproteína Ib plaquetária, desintegrinas, peptídeos, inibidores enzimáticos e várias enzimas (Tu, 1996).

Destas enzimas, de acordo com Iwanaga & Suzuki (1979), já foram descritas pelo menos 26 tipos, muitas das quais de natureza hidrolítica. Deste total, 12 são comumente encontradas em proporções variadas nos diferentes grupos de serpentes e, as restantes estão distribuídas de forma pontual (Matsui *et al.*, 2000).

Classicamente estas enzimas são agrupadas em cinco classes principais: Oxidorredutases, Fosfatases, Glicosidases, Lipases e Proteases (Tu, 1977).

1.1 - Oxidorredutases

Nos venenos totais de serpentes são encontradas pelo menos duas enzimas responsáveis por reações redox: as L-aminoácido oxidases (LAO) e lactato desidrogenases. As LAO convertem o aminoácido livre em um α -cetoácido. Muitos venenos de serpentes possuem LAO muito ativas que são responsáveis pela cor amarela dos venenos secos. Descobriu-se que as LAO são capazes, em determinadas condições laboratoriais, de induzir a agregação plaquetária (Li *et al.*, 1994), e a apoptose em determinadas células (Suhr & Kini, 1996).

1.2 – Fosfatases

A importância das proteínas fosfatases se deve a sua participação nos processos de crescimento, diferenciação e proliferação celular, uma vez que as mesmas regulam a atividade de outras enzimas por desfosforilação, levando à alteração de suas atividades

intrínsecas, permitindo assim um funcionamento perfeito do mecanismo de transdução de sinais, desencadeando uma série de reações bioquímicas que induzem uma resposta biológica, como por exemplo: alterações no metabolismo de carboidratos, bem como em eventos carcinogênicos (Serres *et al.*, 2000).

Proteínas fosfatase 1 e 2A pertencem ao grupo das fosfatases que desfosforilam resíduos de treonina e serina. Em células de mamíferos aproximadamente 90% da atividade de proteína fosfatase está relacionada com a presença das fosfatases 1 e 2A. As fosfatases serina/treonina são holoenzimas que apresentam uma subunidade catalítica juntamente com uma subunidade regulatória que modulam a atividade enzimática ou determinam a localização das enzimas (Serres *et al.*, 2000).

As fosfatases são divididas em duas categorias de acordo com o pH ótimo para a atividade enzimática: as fosfatases ácidas, que possuem um pH ótimo em torno de 5,0 e 6,0 e as fosfatases alcalinas com um pH ótimo em torno de 8,8 a 9,0. Atualmente esta classificação não é determinada apenas pela faixa de pH, mas também por outras características relacionadas com o mecanismo de reação, como por exemplo especificidade quanto ao substrato e sensibilidade a inibidores, ajudando a diferenciar estas duas classes de enzimas (Serres *et al.*, 2000).

1.3 - Glicosidases

Estas enzimas têm a função de facilitar a difusão das toxinas do veneno para dentro do tecido das vítimas (Meyer *et al.*, 1960). Dentre estas enzimas cita-se as α -amilases, as NAD nucleotidases e a hialuronidase. A hialuronidase é uma enzima que cataliza a reação de hidrólise do ácido hialurônico, um mucopolissacarídeo presente na pele, nos tecidos conectivos e nos tendões.

1.4 – Lipases

Dentre as lipases destaca-se o grupo das fosfolipases que são as enzimas mais comumente encontradas nos venenos de serpentes, sendo as fosfolipases A₂ as mais estudadas do ponto de vista bioquímico e biológico, e têm importante papel na digestão de lipídeos (Wittcoff, 1951; Toyama *et al.*, 2000).

1.5 – Proteases

As proteases presentes no veneno total não são responsáveis pela sua ação letal, mas podem causar outros tipos de efeitos danosos, como hemorragia. Venenos de serpentes das famílias Crotalidae e Viperidae contêm um ou mais fatores hemorrágicos chamados hemorraginas. Estas moléculas são caracterizadas como metaloproteases que contêm zinco e apresentam um domínio de protease e, em algumas delas, domínios adicionais. Essas proteases agem degradando proteínas que compõem a membrana basal subjacente das células endoteliais dos capilares (Hati *et al.*, 1999).

Os venenos de serpentes das famílias Crotalidae e Viperidae contêm, além das hemorraginas, muitas outras proteases como aquelas que atuam na cascata de coagulação sangüínea (Kornalik, 1990). No Brasil, os estudos a respeito destas proteases com ação na coagulação sangüínea têm sido realizados principalmente com as serpentes peçonhentas do gênero ***Bothrops*** e ***Crotalus***.

Várias enzimas isoladas de venenos de serpentes possuem atividade tipo trombina; elas clivam as moléculas de fibrinogênio encontradas no plasma, transformando-as diretamente em fibrina (Smolka *et al.*, 1998; Lu *et al.*, 2000).

Além destes vários componentes, os venenos de serpentes da família Viperidae são constituídos por proteínas que interferem no mecanismo homeostático e na adesão celular, afetando a coagulação sangüínea, o funcionamento das plaquetas e causando hemorragia local (Kamiguti & Sano-Martins, 1995).

1.6 – Outras moléculas de importância

Além das enzimas hidrolíticas, o veneno total também apresenta outras moléculas protéicas sem atividade enzimática, como as desintegrinas e as lectinas. As desintegrinas, são um grupo de proteínas com baixo peso molecular, ricas em resíduos de cisteínas. Elas contêm uma seqüência de aminoácidos Arg-Gly-Asp responsável por sua atividade de inibir a interação do fibrinogênio com seus receptores (os complexos glicoproteicos IIb-IIIa, na coagulação sangüínea) ocasionando hemorragia (Kamiguti *et al.*, 1998). As lectinas constituem um grande grupo de proteínas ou glicoproteínas, que possuem a capacidade de aglutinar células, precipitar polissacarídeos e glicoproteínas, pelo fato de se ligarem específica e reversivelmente a determinados carboidratos (Carvalho *et al.*, 1998).

2 - Caracterização Funcional e Estrutural das Proteases

As proteases estão presentes na maioria dos venenos, exceto nos venenos da família Hydrophidae. Elas têm sido estudadas desde o começo do século, quando descobriu-se que a coagulação sangüínea podia ser desencadeada por venenos de serpentes: entretanto, a primeira protease com atividade na coagulação sangüínea foi purificada na década de 50 (Ouyang *et al.*, 1990; Markland *et al.*, 1991; Tu, 1996; Matsui *et al.*, 2000).

Algumas dessas proteases parecem degradar proteínas teciduais de mamíferos de uma maneira não específica, para imobilizar a vítima. Contudo, algumas clivam proteínas plasmáticas de uma maneira relativamente específica, tendo potente efeito como inibidor ou ativador nos processos de hemostasia e trombose, na coagulação sangüínea, fibrinólise e agregação plaquetária (Tu, 1996; Matsui, *et al.*, 2000).

Proteases em geral apresentam atividades fibrinolíticas (anticoagulante), ou fibrinogenolíticas (coagulante) sendo poucas as proteases de veneno que tenham as duas atividades. Proteases isoladas de veneno são comumente classificadas, por sua estrutura,

em serinoproteases e metaloproteases. Há apenas uma pequena evidência da presença de tiol proteases e proteases aspárticas no veneno de serpentes (Matsui *et al.*, 2000).

2.1 – Metaloproteases

Venenos de serpente contêm uma variedade de metaloproteases que são altamente tóxicas, podendo ou não causar hemorragia por interferir na coagulação sangüínea e na formação do tampão plaquetário, e também por degradar a membrana basal ou degradar os componentes da matriz extracelular de suas vítimas (Iwanaga *et al.*, 1993; Marsh *et al.*, 1994).

Os fatores hemorrágicos que contêm zinco ou cálcio em sua estrutura são exemplos de metaloproteases (Kini & Evans, 1992). A grande maioria das metaloproteases de veneno, hemorrágicas ou não, são enzimas fibrinogenolíticas que clivam preferencialmente as cadeias α e posteriormente a β do fibrinogênio (Markland, 1998).

As proteases Fibrolases de *Angkistrodon contortrix contortrix*, Atroxase de *Crotalus atrox*, e a Lebetase de *Vipera lebetina* degradam a cadeia α da fibrina e do fibrinogênio tão rápido como a cadeia β . Não há registros de metaloproteases fibrinogenolíticas que clivam especificamente a cadeia γ do fibrinogênio, exceto a Atrolisina F (Ht-f) de *Crotalus atrox* (Matsui *et al.*, 2000). As metaloproteases com atividade Fibrino(geno)lítica são aplicáveis em tratamento médico para abaixar o nível de fibrinogênio no plasma ou solubilizar os coágulos plasmáticos em indivíduos trombóticos (Matsui *et al.*, 2000).

2.2 – Serinoproteases

As serinoproteases de veneno de serpentes são consideradas como uma família de proteínas com variadas propriedades fisiológicas, apresentando massa molecular variando entre 25 a 35 kDa.

Estudos com cDNA têm evidenciado extraordinário grau de homologia entre as serinoproteases, sustentando a hipótese de que esta classe de proteínas divergiu de um gene ancestral comum que, por duplicação e elongação deu origem às serinoproteases atuais. Assim, a organização de exon/intron do gene para Batroxobina, serinoprotease com atividade fibrinogenolítica (trombina-like), é similar à do gene para Calicreína, serinoprotease com função de liberação de Bradicinina (calicreína-like) (Deshimaru *et al.*, 1996).

As primeiras serinoproteases bem conhecidas são as enzimas “trombina-like” que apresentam somente ação fibrinogenolítica, se agrupando numa grande família com muitas funções de trombina, sendo capazes de interagirem diretamente com moléculas de fibrinogênio causando então polimerização nas fibras de fibrina (Pirkle & Theodor, 1991).

Outras serinoproteases, apresentam em lugar da ação fibrinogenolítica, atividade de calicreína- capaz de converter uma proteína do plasma em bradicinina, um potente vasodilatador- como o “cininogênio-like”, uma calicreína de mamífero que é denominada por protease “calicreína-like”. Há ainda um pequeno número de serinoproteases com atividades distintas, como as que ativam o fator de coagulação V, proteína C, plasminogênio ou plaquetas (Serrano *et al.*, 1995; Zhang *et al.*, 1997).

As serinoproteases com ação de ativadora do plasminogênio agem indiretamente quebrando plasminogênio em plasmina, formando um complexo molecular conhecido como ativador do plasminogênio. A plasmina circula no sangue na forma de zimogênio inativo (plasminogênio) que pode ser ativado por enzimas específicas que fragmentam coágulos de fibrina dissolvendo-os quando a integridade estrutural das áreas danificadas é restaurada (Sanchez *et al.*, 2000).

3 - Mecanismo de Ativação da Cascata de Coagulação

Plaquetas ou trombócitos constituintes do sangue, são células sem núcleo produzidas, como outras células sangüíneas, na medula óssea através de diversas divisões celulares. As mesmas acabam formando um megacariócito – célula cujo citoplasma fragmenta-se para dar origem às plaquetas (Sixma *et al.*, 1995). Essas plaquetas são fragmentos celulares encontrados no sangue circulante, apresentando forma discóide com 2 a 3 μ m de diâmetro e concentração da ordem de 2×10^{11} μ g por litro de sangue sendo sua vida média de aproximadamente 10 dias (Hawiger, 1992).

Quando um vaso sangüíneo sofre injúria, como demonstrado na figura 2, ocorre a exposição das fibras de colágeno, que combinadas com receptores específicos localizados na membrana plaquetária, provocam a liberação de íons Ca^{2+} . Isto faz com que haja uma mudança na conformação da plaqueta, que adota um formato esférico (Sherry, 1992). O resultado desse mecanismo é a exposição da GPIIb, que atua como uma proteína de adesão plaquetária ao endotélio lesado. O processo que consiste na cobertura da região injuriada por uma camada de plaquetas é chamado de adesão plaquetária (Caen & Rosa, 1995). Os sangramentos ativam dois processos: o de coagulação do sangue e o de agregação plaquetária.

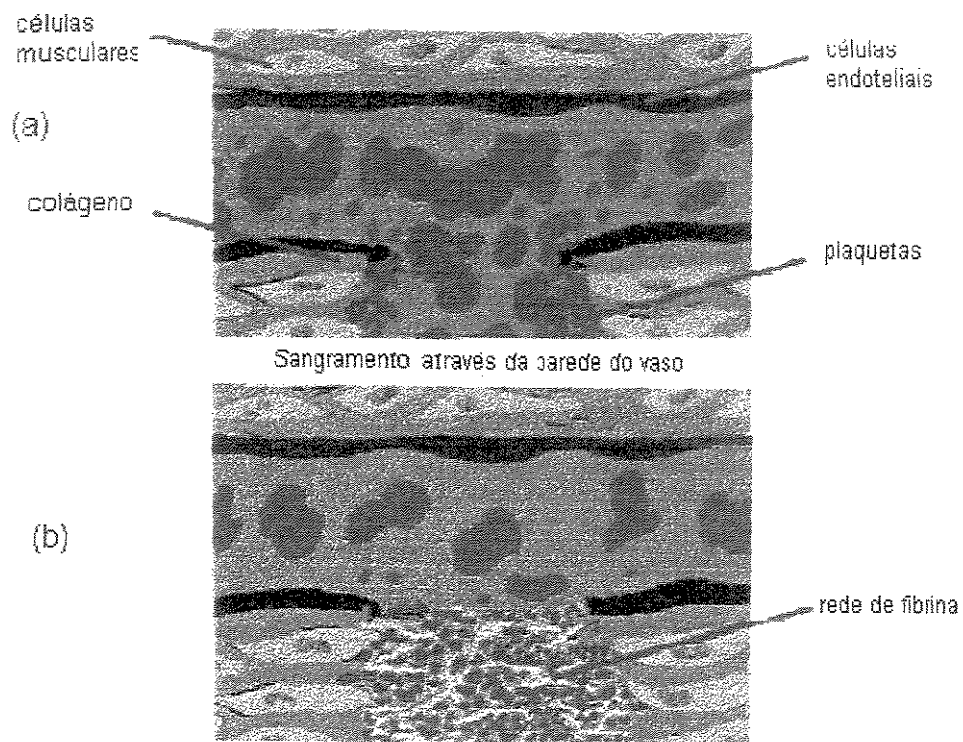


Figura 2: Ilustração da ruptura de um vaso. a) Desencadeamento do processo de adesão das plaquetas. b) Formação do tampão plaquetário no meio da rede de fibrina (Sixma et al., 1995).

3.1 - Coagulação Sangüínea

Davie (1995) diz que, em condições normais, o sangue flui constante e ininterruptamente no leito vascular (hemostasia), para que os tecidos e órgãos se comuniquem entre si, além de receber e descartar metabólitos e outros compostos. Contudo, em algumas circunstâncias, o fluxo sangüíneo sofre uma diminuição momentânea. Tal diminuição é necessária para bloquear a perda de sangue, que se dá através da descontinuidade na parede dos vasos sangüíneos lesados.

Inicia-se então o fenômeno da coagulação sangüínea. Esse envolve uma série de reações encadeadas entre si, sobretudo enzimáticas, e culmina na formação do coágulo sangüíneo. Este, por ser insolúvel, oblitera as lesões vasculares e estanca o sangramento. Uma vez desempenhada a sua função, o coágulo é dissolvido graças à seqüência de eventos que constituem a fibrinólise, ao fim do qual o fluxo sangüíneo volta a ser constante no leito vascular (Davie, 1995).

Um grande número de proteínas plasmáticas inativas são convertidas seqüencialmente em enzimas ativas, através do mecanismo de proteólise limitada. Essas múltiplas reações seqüenciais constituem a cascata da coagulação sangüínea que se destina à geração da fibrina que é uma proteína insolúvel (Davie, 1995).

Costumeiramente, entende-se a coagulação sangüínea como sendo composta por três vias, via intrínseca, via extrínseca e via comum. É da ação conjunta dessas três vias que resulta a formação do coágulo de fibrina, estas diferentes vias estão esquematizadas na figura 3.

Quando ocorre a lesão vascular, o fator tecidual (FT) desencadeia a via extrínseca da coagulação, que é uma das responsáveis pela formação do coágulo de fibrina, clivando o fator VII (FVII) (zimogênio) em fator VIIa (Morrissey *et al.*, 1997).

O FVII passa à sua forma ativa após hidrólise da ligação peptídica Arg152-Ile153, as condições fisiológicas desta ativação ainda não estão bem elucidadas, mas, sabe-se que o FVIIa se liga fortemente ao domínio extracelular do FT e o complexo resultante promove a ativação do fator X (FX) da via comum à fator Xa (FXa), que é a enzima responsável pela conversão da protombrina em trombina (Bauer, 1997).

A via intrínseca também é chamada de fase de contato da coagulação, pois, ela requer o contato de parte dos fatores de coagulação com uma superfície negativamente carregada para a ativação dos zimogênios. Compõem a via intrínseca da coagulação o cininogênio de alto peso molecular (HMW-KGN), a procalicreína plasmática (Pro-HuPK) e o fator XII (FXII) (Schmaier, 1997).

O FXII, também designado de fator de Hageman, é a primeira proteína desta série a sofrer ativação. A sua ativação é promovida pela calicreína plasmática (HuPK) ou por retro-ativação, através da hidrólise da ligação peptídica Arg353-Asn354, resultando em fator XIIIa (FXIIIa). A procalicreína plasmática (Pro-HuPK) circula no plasma complexada com HMW-Kgn, sendo a proteína precursora da serinoprotease calicreína plasmática (HuPK) (Lin *et al.*, 1996). A transformação da Pro-HuPK à forma de enzima ativa é desencadeada pelo FXIIIa que ao hidrolizar a ligação peptídica Arg371-Ile372 libera HuPK ativa (Herwald, 1996). A principal função de HuPK na via intrínseca da coagulação sanguínea é a ativação do FXII a FXIIIa.

O FX é uma proteína fundamental na cascata da coagulação, pois sua forma ativa (FXa) desencadeia a via comum da coagulação. A sua ativação pode ocorrer tanto por intermédio da via intrínseca (através do complexo FVIIa-FI), quanto pela via extrínseca (através da ação do fator IXa), sendo que esta última necessita de FVIIIa, fosfolipídeos e Ca^{2+} como co-fatores (Halkier, 1991). O fator Xa, na presença de fator Va, fosfolipídeos e Ca^{2+} promove a conversão da protrombina em trombina, a serinoprotease da cascata que converte o fibrinogênio circulante solúvel no coágulo de fibrina insolúvel (Bode *et al.*, 1997).

O fibrinogênio é uma proteína composta por quatro cadeias, duas cadeias- α e duas cadeias- β . Da hidrólise das ligações peptídicas Arg18-Gly19 das cadeias- α e Arg16-Gly17 das cadeias- β do fibrinogênio pela trombina resultam a produção de quatro fibrinopeptídeos e a polimerização dos monômeros de fibrina, proteína rica em resíduos de lisina e principal componente do coágulo sanguíneo (Davie *et al.*, 1991).

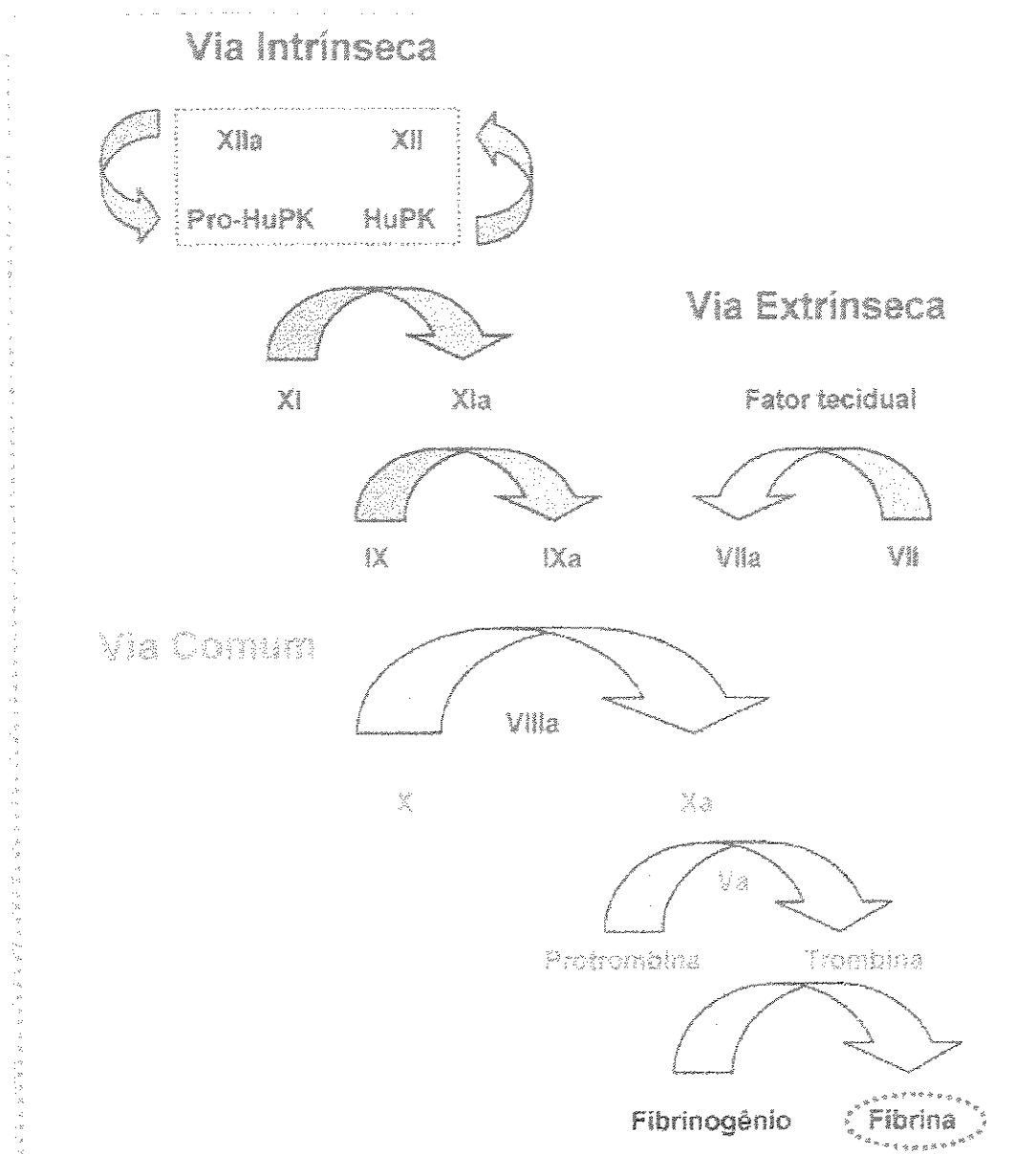


Figura 3: Cascata da coagulação sanguínea. Representação das vias intrínseca, extrínseca e comum (figura adaptada de Voet *et al.*, 2000)

3.2 - Agregação Plaquetária

A agregação plaquetária propriamente dita consiste na formação de pontes intracelulares entre proteínas solúveis, principalmente fibrinogênio e fator VIII e as glicoproteínas insolúveis GP-Ib e GP-IIIa presentes na membrana da plaqueta. Esse processo é desencadeado quando a concentração de fibras expostas de colágeno é muito alta ou quando há presença de agonistas no local lesado (Matos, 1993; Weiss & Lages, 1997).

Segundo Zucker (1989), estes agonistas podem ser compostos de baixo peso molecular tais como: ADP; ácido araquidônico; serotonina e epinefrina; podem ser enzimas como a trombina e tripsina; lipídeos como o fator de agregação plaquetária (PAF); ou ionóforos como A23187. Eles iniciam uma série de eventos celulares, comprometendo as propriedades e funções das plaquetas pela formação de pseudópodes, mudança da forma discóide para esferocítica, aderência de uma célula à outra (agregação) ou pela liberação de várias substâncias (secreção).

Por causa de sua grande importância, mudanças da função normal das plaquetas podem causar desordens trombóticas ou hemorrágicas. Na trombose, causas desconhecidas podem resultar na formação espontânea de agregados suficientemente grandes para bloquear a circulação (Derenleau, 1987). Esse distúrbio pode ser evitado pela inibição da agregação plaquetária, seja pela diminuição da síntese de agonistas ou pela ação de desintegrinas (Coller *et al.*, 1995; London *et al.*, 1996). As plaquetas se agregam sob condições adversas ou dano vascular "*in vivo*", ou por agregação controlada "*in vitro*". As plaquetas são excelentes modelos para análise de interações célula-célula e célula-substrato (Kawasaki *et al.*, 1996).

Os processos desencadeados pelos agonistas são acompanhados pela exposição de receptores à moléculas adesivas presentes na circulação sangüínea, tais como o fibrinogênio e o fator de von Willebrand (vWF). Estas podem levar à formação do tampão plaquetário, conhecido como trombo, reduzindo ou interrompendo a perda de sangue no

local de injúria. As plaquetas contribuem significativamente para manter a integridade da parede vascular e ajudam no processo de recuperação da lesão vascular (Jamieson, 1988; Hawiger, 1989). Trombo e plaquetas, uma vez ativados, facilitam a ação dos fatores de coagulação. As plaquetas também constituem uma superfície necessária aos vários passos de ativação das redes de agregação (Tracy & Mann 1966 a; b; Ganz *et al.*, 1986).

3.2.1 - O fator de von Willebrand

O fator de von Willebrand (vWF) é uma glicoproteína, formada por uma série de multímeros ligados por pontes dissulfeto, que circula no sangue, formando um complexo não covalente com o fator de coagulação VIII, favorecendo a adesão plaquetária ao subendotélio. Ele é sintetizado em células endoteliais e megacariócitos e estocado em grânulos α de plaquetas (Nachman *et al.*, 1977), tem uma subunidade com peso molecular de 275.000 kDa consistindo de 2050 resíduos de aminoácidos (Titani *et al.*, 1986)

A ligação do fator de von Willebrand (vWF) do plasma com a glicoproteína GPIb de plaquetas é visto como essencial para o início da hemostasia primária, que consiste no ancoramento de plaquetas na parede dos vasos lesados. A ligação do vWF com a GPIb não ocorre normalmente na circulação "*in vivo*", a não ser em casos de lesões. Porém pode ser reproduzida "*in vitro*" na presença de um agonista não fisiológico, como o antibiótico Ristocetina ou com a Botrocetina do veneno de ***Bothrops jararaca***, onde a ligação do vWF ao complexo de glicoproteína Ib (GPIb) de plaqueta é o responsável pela reprodução deste fenômeno (Fujimura *et al.*, 1996). A figura 4 mostra a estrutura do fator de von Willebrand bem como a localização dos sítios de ligação para diversas estruturas.

Os fragmentos de vWF de 52/48 e 46 kDa possuem o mesmo N-terminal (VTLNPSDPEHCQ), que se estende do resíduo Val 499 ao Lys 728, apresentando a mesma capacidade de se ligar à proteína GPIb-IX, e inibem a ligação de vWF com Heparina e Botrocetina. Estes resultados sugeriram que a conformação nativa do vWF não

é necessária para a formação do complexo vWF-GPIb-IX (Fujimura *et al.*, 1993). Porém Andrews *et al.* (1989) verificaram que o fragmento nativo do vWF é um homodímero com uma ponte dissulfeto entre Cys509 e Cys695 e esta conformação seria necessária para expressão da função de ligação a GPIb-IX.

Mohri *et al.* (1988) demonstraram que a ligação do vWF ao complexo GPIb envolve duas regiões não contíguas da molécula, cada uma constituída de 15 resíduos, separadas em uma sequência linear de 205 resíduos e mantidas em proximidade espacial por pontes dissulfeto.(figura 5).

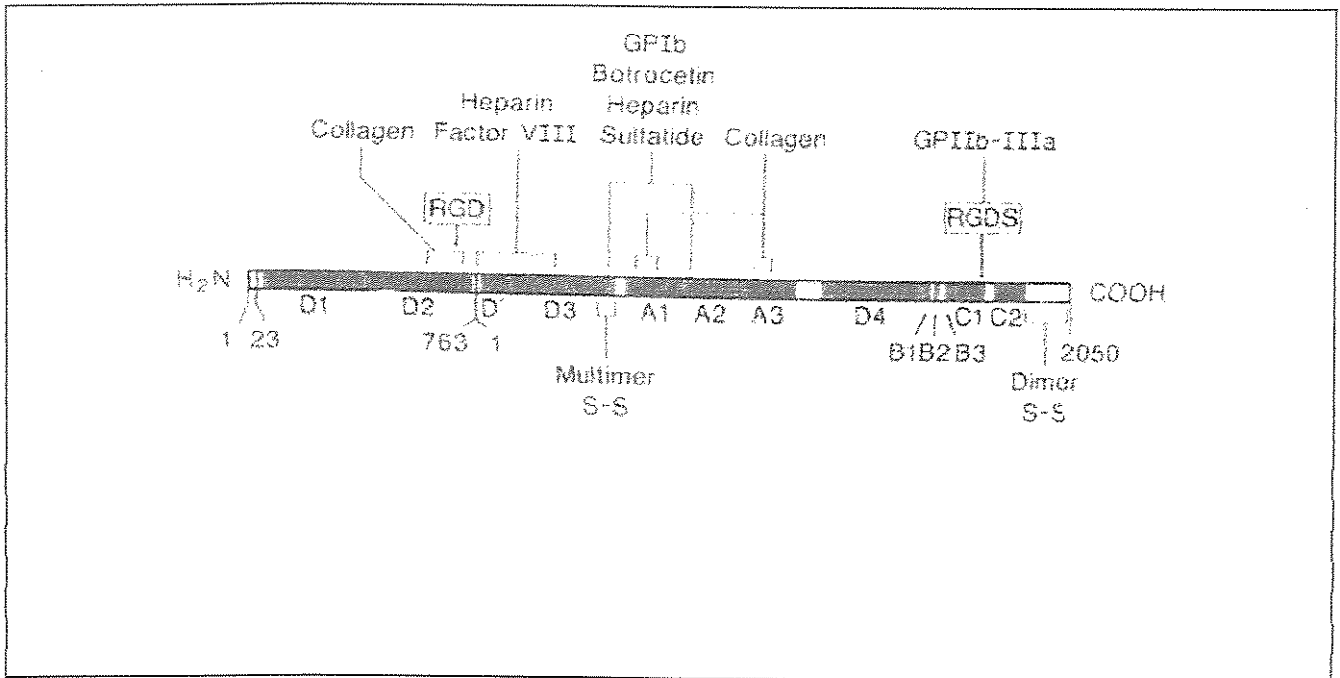


Figura 4: Estrutura do vWf (fator de von Willebrand) indicando os sítios de ligação para Colágeno, Heparina, Fator VIII, GPIb plaquetária, GPIIb-IIIa plaquetária, Botrocetina, e grupos sulfidrícos (Meyer *et al.*, 1984).

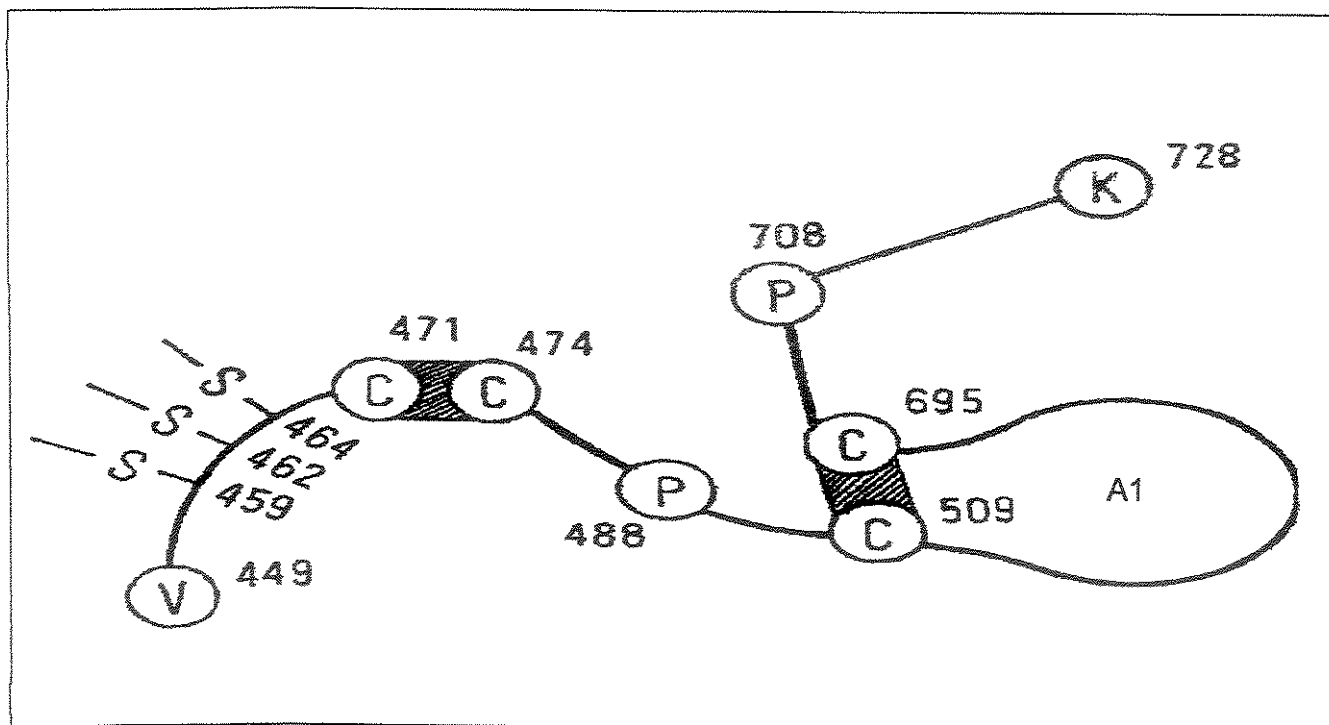


Figura 5: Representação esquemática do domínio de ligação na GPIb do vWf. O fragmento tríptico do vWf entre os resíduos 449 e 728 é representado esquematicamente com seus sete resíduos de cisteína (Mohri *et al.*, 1988).

Muitos pesquisadores (Moake *et al.*, 1988; Ikeda *et al.*, 1993; Alevriadou *et al.*, 1993; Savage *et al.*, 1996) têm mostrado que sob alto estresse de corte, a agregação plaquetária é iniciada pela ligação entre vWF multimérico e GPIb plaquetária, um fenômeno que ocorre em artérias coronárias "*in vivo*". Esta interação é associada com o fluxo extracelular de Ca^{2+} para as plaquetas e a ativação do receptor GPIIb/IIIa, para o qual a ligação do domínio terminal, contendo a seqüência RGD (Arg1744-Asp1746) da subunidade vWF é crucial. Já a agregação de plaquetas sob baixo estresse de corte, presumivelmente gerado "*in vivo*" no fluxo sangüíneo em veias parcialmente obstruídas, é mediada pela ligação de fibrinogênio do plasma a GPIIb/IIIa.

Nenhuma agregação de plaquetas induzida por estresse de corte (SIPA), alto ou baixo é vista nas plaquetas fixadas. A razão para esta ligação seletiva do vWF ou fibrinogênio ao receptor GPIIb/IIIa ativado sob diferentes condições de corte ainda necessita ser esclarecida (Kroll *et al.*, 1991; Ozaki *et al.*, 1995).

A relação estrutura-função de vWF e GPIb de plaquetas foi elucidada pelo mapeamento do anticorpo monoclonal (mAb), por proteólises limitadas, e por estudos envolvendo peptídeos sintéticos, e fragmentos recombinados (Sadler, 1991; Fujimura & Titani, 1993; Nurden, 1993; Cruz *et al.*, 2000). Estudos adicionais sobre o mecanismo molecular da interação dos eixos vWF-GPIb pode conduzir à descoberta de novos compostos para uso em drogas anti-trombóticas.

4 - Ação de Proteínas de Serpentes nos Processos da Cascata de Coagulação

Das proteínas encontradas nos venenos de serpentes destacam-se três grupos que atuam nos processos da cascata de coagulação: desintegrinas, proteínas relacionadas com as lectinas tipo C e as proteases (Kini & Evans, 1992).

As desintegrinas são proteínas de baixa massa molecular (60kDa), ricas em resíduos de cisteína e que têm na sua estrutura a sequência peptídica Arg-Gly-Asp (RGD) que impede a ligação do fibrinogênio às plaquetas, inibindo desta forma a agregação plaquetária (Niewiarowski *et al.*, 1994).

As proteínas relacionadas com as lectinas tipo C (CLP), constituem um grupo de proteínas estruturalmente homólogas, mas com funções distintas. Algumas delas exibem atividades de lectina (Kassab, 1999; Carvalho *et al.*, 1998), outras induzem efeitos coagulantes ou na aglutinação e agregação plaquetárias (Kini, 1996).

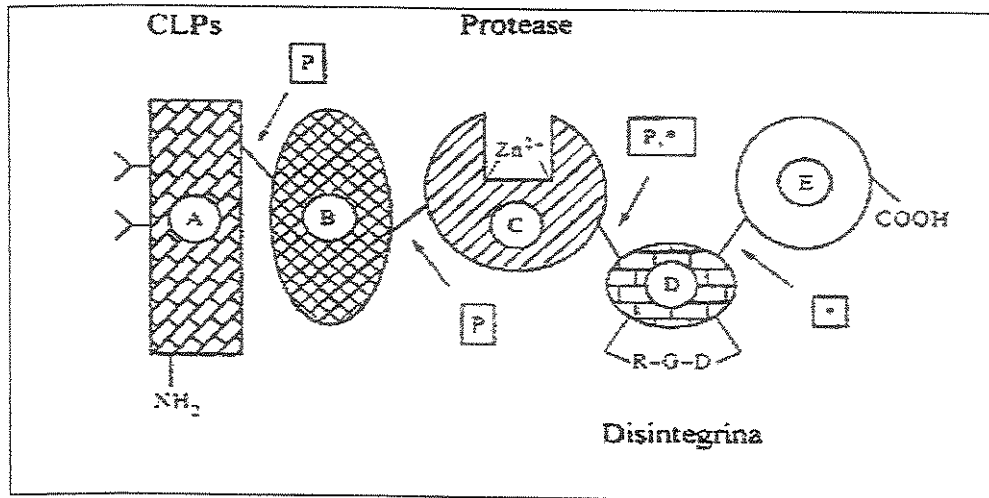


Figura 6: Esquema dos domínios estruturais de metaloprotease (C), desintegrina (D) e proteínas relacionadas a lectina do tipo-C, CLPs (A) em um precursor comum. **P** indica sítio de clivagem proteolítica; * o “códon de terminação”; **Y** o segmento de ligação a carboidratos (que nem todas CLPs contêm); **RGD** sequência característica em desintegrinas. A função dos domínios B e E ainda não foi determinada (Kini, 1996).

Vários pesquisadores têm proposto que as metaloproteases e as desintegrinas são derivadas da proteólise de um precursor comum (Kini & Evans, 1992; Hite *et al.*, 1992; Paine *et al.*, 1992). Segundo Kini (1996), a hipótese de que as proteínas relacionadas com a lectinas dependentes de Ca^{2+} (CLPs) também são derivadas da região N-terminal desse precursor comum permitiu o desenvolvimento de um modelo precursor com cinco domínios (Figura 6), onde as proteases constituem o domínio C, as desintegrinas o domínio D (com a sequência de resíduos Arg-Gly-Asp) e as CLPs o domínio A (com o segmento Y, de ligação a carboidratos). O domínios B e E ainda não foram caracterizados (Kini, 1996).

As proteases formam um grupo heterólogo com massas moleculares variando entre 15 a 380 kDa, têm seu principal papel na digestão de presas, e induzem vários efeitos farmacológicos, como os hemorrágicos, anticoagulantes e de ativação/inibição da agregação plaquetária (Pirkle & Stocker, 1991).

Dentre as proteases temos as metaloproteases, que são sintetizadas e estocadas nas glândulas de veneno, na forma de zimogênio inativo, e conservam um grupo tiol na

pro-sequência PKMCGV bloqueando o sítio de atividade, por estar ligado ao íon zinco. Após a secreção das glândulas, os processos proteolíticos limitados convertem o zimogênio em enzima ativa por remoção do grupo tiol. Este mecanismo de ativação tipo “chave-de-cisteína” têm sido proposto para as metaloproteases de veneno de serpentes (Matsui *et al.*, 2000).

Dentre as metaloproteases existem as hemorrágicas e não hemorrágicas. Mocarargina é uma metaloprotease purificada do veneno de *Naja mocambique mocambique* que cliva preferencialmente as pontes Glu282-Asp283 da GPIIb α plaquetária tendo importante papel na agregação plaquetária por interagir com vWF do plasma. A mocarargina pode também clivar a cadeia α do fibrinogênio humano nos resíduos Phe501-Asp502 quando incubada por um longo tempo. Observa-se ainda metaloproteases com atividade de lectina em ensaios de hemaglutinação que pode ser inibida com polissacarídeos sulfatados, mas não com EDTA (Ward *et al.*, 1996).

Matsui *et al.* (2000) recentemente purificaram uma metaloprotease de nome Caoutiagina do veneno de *Naja kaouthia* que quebra especificamente o vWF humano entre os resíduos Pro708 e Asp709, diminuindo a estrutura multimérica do vWF. Isto resulta na perda de atividades como a agregação plaquetária induzida por Ristocetina e a ligação ao Colágeno. Este sítio de atividade do vWF está localizado no interior de um agrupamento de cargas negativas de O-glicosídeos. Caoutiagina não quebra nenhum fibrinogênio nem substratos sintéticos de tripeptídeo de lisina, mas parece clivar a região amino terminal do fibrinogênio no resíduo Asp em região que contém muitos resíduos carregados negativamente.

Dentre a classe de serinoproteases pode-se citar as proteases trombina-like (têm atividade fibrinogenolítica), e as calicreína-like (liberam bradicinina do cininogênio plasmático). Dentre as serinoproteases “trombina-like” tem-se a α -trombina, uma serino protease multifuncional com importante papel na hemostase e trombose. Ela converte fibrinogênio em fibrina, que é em seguida clivada ativando o fator de coagulação XIII, liberando fibrinopeptídeos A e B das cadeias α e β do fibrinogênio respectivamente, por proteólises limitadas (Stubbs & Bode, 1995; Fenton *et al.*, 1998).

A literatura registra a sequência primária de resíduos de aminoácidos de várias serinoproteases de veneno de serpentes de diferentes gêneros com atividade de “trombina-like”. Ancrode, ***Agkistrodon rhodostoma*** (Burkhart *et al.*, 1992), Batroxobina, ***Bothrops atrox moojenii*** (Itoh *et al.*, 1987), Bilineobina, ***Agkistrodon bilineatus*** (Komori, *et al.*, 1993), Bothrombina, ***B. jararaca*** (Nishida *et al.*, 1994), Calobina, ***Crotalus atrox*** (Hatton, 1973), Crotalase, ***C. adamanteus*** (Henschen-Edman, *et al.*, 1999), Flavoxobina, ***Trimeresurus flavoviridis*** (Shieh, *et al.*, 1988) Gyroxina, ***Lachesis muta muta*** (Magalhães *et al.*, 1993), TM-VIG, ***Trimeresurus mucrosquamatus***, (Hung *et al.*, 1994).

Outros grupos de serinoproteases são as enzimas calicreína-like, das quais conhece-se a sequência completa de resíduos de aminoácidos de Gilatoxina (***Heloderma horridum horridum***) e Halistase (***Agkistrodon halys blomhoffii***), ambas isoladas recentemente. Halistase apresentou em sua sequência similaridade com calicreína (42%) e com trombina (26%). Apresentou atividade fibrinogenolítica comum às serinoproteases “trombina-like” de veneno de serpente, porém ela cliva primeiro a cadeia β , no resíduo 42, e degrada vagarosamente a cadeia α do fibrinogênio, geralmente observa-se o contrário em serinoproteases “trombina-like”, gerando um produto que não é amplamente convertido por trombina em coágulo de fibrina normal, resultando na inibição do coágulo de fibrinogênio. Assim, esta serinoprotease induz a redução da pressão sangüínea e inibe a coagulação sangüínea na vítima (Matsui *et al.*, 1998).

Outras serinoproteases “calicreína-like” com potente atividade, mas com propriedades físico-químicas diferentes da Halistase têm sido identificadas no mesmo veneno (***Agkistrodon halys blomhoffii***) e várias outras têm sido isoladas do veneno de ***A. caliginosus***, ***Crotalus atrox*** e ***C. viridis***, mas não se tem ainda a sua caracterização estrutural (Matsui *et al.*, 2000).

Em 1978, Read *et al.* descreveram cinco venenos do gênero ***Bothrops*** entre um total de 73 venenos de serpentes com potente atividade de agregabilidade de plaquetas dependentes de vWF. O autor isolou uma coaglutinina do veneno de ***Bothrops jararaca*** (pequena víbora da América do Sul), a qual eles chamaram Botrocetina (Brinkhous *et al.*, 1983).

A agregação de plaquetas induzida pela Botrocetina (BIPA) é totalmente dependente do vWF do plasma, enquanto a agregação de plaquetas induzida por Ristocetina (RIPA) requer a presença de seu receptor plaquetário GPIb. Tanto Botrocetina quanto Ristocetina aglutinam plaquetas normais fixadas e funcionam na ausência de Ca^{2+} . Diferentemente da Ristocetina a BIPA funciona com um largo espectro de formas multiméricas de vWF do plasma (Brinkhous *et al.*, 1983). Em 1989, Read *et al.* demonstraram que a Botrocetina liga-se ao vWF, e forma um complexo ativado, o qual induz a agregação direta das plaquetas.

Fujimura *et al.* (1991), purificaram duas formas distintas de Botrocetina, uma de cadeia simples e outra de cadeia dupla (heterodimérica); a atividade biológica da Botrocetina de cadeia simples em promover a ligação do vWF ao GPIb foi trinta vezes menor que da Botrocetina de cadeia dupla. A Botrocetina de cadeia simples foi mais tarde identificada como a porção N-terminal jaragina (Paine *et al.*, 1992), uma metaloprotease hemorrágica com alto peso molecular, sendo seu nome mudado de Botrocetina para *jaracina-C* (Usami *et al.*, 1994). Por isso, o nome histórico Botrocetina parece aplicável apenas para a forma de cadeia dupla, embora a possibilidade da Botrocetina de cadeia dupla apresentar microheterogeneidade não tenha sido totalmente excluída (Read *et al.*, 1989).

Andrews *et al.* (1989) submeteram à purificação a Botrocetina dimérica com idênticas seqüências NH_2 terminal, e relataram que estes monômeros não se ligam ao fragmento de aproximadamente 120 kDa Glicocalicina, fragmento proteolítico NH_2 terminal de GPIb α que contém o sítio de ligação do vWF (Okumura *et al.*, 1978; Handa *et al.*, 1986; Titani *et al.*, 1987).

A determinação da seqüência primária de resíduos de aminoácidos de botrocetina de cadeia dupla e a localização de suas pontes dissulfeto, inter e intra cadeia, revelaram grande homologia (44,8%) com seqüências de resíduos das duas subunidades, e estas duas subunidades estavam unidas por uma ponte dissulfeto inter-cadeia simples, entre Cys80 da α -subunidade e Cys75 da β -subunidade. Cada subunidade molecular possui três sítios de pontes dissulfeto intra-cadeia (Usami *et al.*, 1993).

A alta homologia e similaridades nas localizações das pontes dissulfeto inter e intra cadeia para as subunidades de Botrocetinas tem sido observada entre outras Botrocetina e muitas lectinas cálcio-dependentes (tipo C) (Drickamer, 1988) incluindo Echinoidina de ouriço do mar (Giga *et al.*, 1987) e lectina de *Crotalus atrox* (cascavel) (Hirabayashi *et al.*, 1991). Porém, a Botrocetina não requer Ca^{2+} para sua ligação ao vWF e indução da agregação plaquetária. Além disso há uma diferença estrutural entre as botrocetinas e as lectinas tipo-C isoladas, sendo todas as lectinas tipo-C homodiméricas, enquanto as Botrocetinas são heterodiméricas (Moake *et al.*, 1988; Ikeda *et al.*, 1993).

De particular interesse foi a descoberta que existem três sítios de ligação de Botrocetina, descontínuos dentro do ponto A1 (figura 5) de GPIb, que coincidem muito com a localização de um número de resíduos de aminoácidos deduzidos da análise da sequência de cDNA de pacientes com tipo 2B da doença von Willebrand, uma diátese de sangramento caracterizada por uma interação aumentada de vWF-GPIb (Ginsburg & Sadler, 1993; Hilbert *et al.*, 1994; Federici *et al.*, 1995). É interessante também que estes sítios de ligação sobrepõem-se muito com os sítios de ligação GPIb do vWF induzido pela Ristocetina e Botrocetina (Mohri *et al.*, 1988; Berndt *et al.*, 1992), e com os sítios de ligação vWF para heparina negativamente carregada (Sobel *et al.*, 1992) e glicolípídeos sulfatados (Christophe *et al.*, 1991).

Considerados juntos, estes resultados sugerem fortemente que a Ristocetina produz sua modulação funcional de vWF para ligação ao GPIb através da interação de Ristocetina positivamente carregada em parte com as porções de carboidrato nas duas regiões delimitadas do ponto A1 e através da possível neutralização das cargas da superfície negativamente carregadas de ácidos siálicos (Christophe *et al.*, 1991).

Ainda é desconhecido se o sítio de ligação vWF de Botrocetina reside na subunidade α ou β . Contudo, técnicas de "western blotting" usando anti-Botrocetina BCI-7 mAB (anticorpo monoclonal), que inibe a ligação de Botrocetina biotinilada no vWF, indica que o mAB reage imunologicamente somente com a subunidade α recém reduzida, e não com a similar subunidade β (Makita *et al.*, 1995).

Em 1991, Scarborough *et al.* apresentaram a purificação e caracterização de duas proteínas de ligação à glicoproteína GPIb de plaquetas, no veneno da serpente ***Crotalus horridus horridus***, chamadas CHH-A e CHH-B, as quais funcionam como potentes inibidoras da ligação do vWF ao GPIb. Peng *et al.* (1991 e 1992) relataram a purificação de três proteínas de venenos de serpentes, designadas Alboagreginas (AL)-A, B e C, do veneno da ***Trimeresurus alborablis***, que promovem a agregação plaquetária por ligarem-se diretamente ao complexo GPIb. Estas proteínas apresentam características químicas e de sequência de aminoácidos com alta homologia à Botrocetina (Peng *et al.*, 1991; Yoshida *et al.*, 1993).

Read *et al.* (1989) demonstraram que a atividade de coagulinina está presente em vários venenos do gênero ***Bothrops***. Outras proteínas relacionadas estruturalmente a Botrocetina, Botropsjaracina (Zingali *et al.*, 1993) e uma lectina tipo C (Ozeki *et al.*, 1994) também foram isoladas do veneno de ***B. jararaca***.

A investigação de proteínas componentes de outros venenos do gênero ***Bothrops*** torna-se interessante para comparação da evolução filogenética desta classe de proteínas, como também para aumentar o conhecimento do mecanismo de ação, relativamente ao reconhecimento de sítios moleculares no vWF (fator de von Willebrand) e na membrana de plaquetas que possam desencadear a reação de agregação ainda não totalmente explicada e de importância fundamental no processo de hemostasia.

Apesar do número expressivo de acidentes ofídicos causados por ***B. alternatus***, no Brasil, e da relativa abundância desta espécie, o veneno de ***B. alternatus*** é um dos menos estudados (Barraviera, 1994). Desta maneira este modelo torna-se muito interessante para estudos de interação estrutura-função de proteínas biologicamente ativas no processo de hemostasia.

II – OBJETIVOS

Esta dissertação de mestrado teve por objetivo realizar um estudo das proteínas do veneno da serpente ***Bothrops alternatus*** (Urutu), no que diz respeito a:

- 1 - Purificação e isolamento de uma serinoprotease de ***Bothrops alternatus*** através de métodos cromatográficos.
- 2 – Caracterização, através de técnicas eletroforéticas, análise de aminoácidos e determinação da seqüência de resíduos de aminoácidos da porção N-terminal.
- 3- Caracterização da atividade biológica da serinoprotease (Uruprot) de ***B. alternatus*** no processo de agregação plaquetária.

III - MATERIAIS E MÉTODOS

1 - Veneno

O veneno total de *Bothrops alternatus* utilizado, foi adquirido da Enzifarma, serpentário localizado em São José de Ribamar, MA.

2 - Purificação da Serinoprotease-like (Uruprot) de *Bothrops alternatus*.

2.1 - Cromatografia de Exclusão Molecular

O veneno de *B. alternatus* foi dissolvido em tampão bicarbonato de amônio (0,1M, pH 8,0) sendo depois clarificado por centrifugação a 1200xg por 10 min. O veneno solubilizado foi aplicado em uma coluna (115 x 2,0 cm), empacotada com Sephadex G-75 (Amershan Pharmacia Biotech) previamente equilibrada com tampão bicarbonato de amônio (0,1M, pH 8,0).

As frações resultantes foram eluídas com o mesmo tampão de equilíbrio e coletadas com fluxo constante (12mL/h), recolhendo-se em coletor Gilson modelo VL. Os picos foram identificados por leitura da absorbância e em seguida liofilizados.

2.2 - Cromatografia de Troca Iônica em SP 5PW (HPLC)

A fração ativa (SIII), proveniente da cromatografia de exclusão molecular em Sephadex G-75, foi escolhida por apresentar proteínas na faixa de 25-40 kDa peso molecular das proteases de veneno, e foi o pico de maior rendimento, esta fração foi cromatografada em coluna SP 5PW (0,75 x 7,5cm, Walters) equilibrada com tampão fosfato 5 mM pH 7,4 e eluída com um gradiente de 0-0,5 M de NaCl.

Obteve-se quatro picos desta cromatografia, dentre os quais foi escolhido o primeiro pico (PI), pois testes de agregação plaquetária feito com todos os picos mostrou que PI é capaz de agir inibindo a Ristocetina, PII (Urucetina) já foi caracterizado em testes anteriores no laboratório apresentou homologia de 82% com Botrocetina (Camillo, 1995), PIII não era interessante por ter pouco rendimento ao longo dos passos de purificação e PIV não apresentou atividade proteásica. Portanto o primeiro pico (PI), eluído do gradiente, foi dialisado, liofilizado e utilizado para os estudos de caracterização.

2.3 - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência/Fase Reversa

Para verificar a homogeneidade do PI oriundo da cromatografia de troca iônica, bem como o grau de hidrofobicidade do mesmo, utilizou-se o equipamento Waters HPLC modelo PDA, equipado com duas bombas Waters mod. 510 com injetor automático de amostra Waters modelo U6K e coluna C18 μ Bondapak. Para a cromatografia de fase reversa utilizou-se um gradiente linear de 0 a 100%, por 60 min., de solução de acetonitrila 66% em 0,1% de ácido trifluoroacético sob fluxo constante de 1mL/min. As amostras foram monitoradas a 280nm e em seguida liofilizadas.

3 – Caracterização Físico-Química da Uruprot

3.1 - Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (SDS-PAGE)

A eletroforese em gel de poliacrilamida foi realizada segundo Laemmli (1970). Géis de poliacrilamida descontínuos, apresentando um gel de concentração de 5% e gel de corrida de 12,5% preparados a partir de uma solução de acrilamida estoque a 30% e N,N, metileno-bisacrilamida a 0,8% (Bio Rad Labs. Richmond, CA, USA) dissolvidos em água desionizada pelo sistema Milli-Q (Millipore-Waters Co.).

O gel de corrida foi preparado utilizando-se o tampão Tris-HCl 1,0 M, pH 8,8 contendo 0,2% de SDS para solubilização das amostras, 0,1% de N-N-N-N-Tetrametiletilenediamina (TEMED) e 0,01% de persulfato de amônio para polimerização. Após a polimerização deste, foi preparado o gel superior (gel de concentração) com 5% de acrilamida em tampão Tris-HCl 1,0 M, pH 6,8; SDS 0,2%, TEMED 0,1% e persulfato de amônio 0,01%.

As amostras (10 a 50µg de proteína) foram diluídas no tampão de amostra (Tris-HCl 0,08 M pH 6,8, SDS 0,02 M, glicerol 0,1 M e azul de bromofenol 0,01 M). A redução das amostras foi feita com DTT (Sigma), numa concentração final de 0,1 M.

A eletroforese SDS-PAGE foi realizada em sistema duplo de placas "SE 250 Might Small II" (Hoefer Scientific Instruments), em tampão de corrida (Tris-HCl 0,025M; glicina 0,192 M com SDS 1 mM pH 8,3) à voltagem inicial de 60 Volts até a entrada da proteína no gel de corrida e posteriormente de 100 volts. Foram usados como padrão os seguintes marcadores de massa molecular, obtidos da Pharmacia: fosforilase b (94 kDa), albumina sérica bovina (67 kDa), ovalbumina (43 kDa), anidrase carbônica (30 kDa), inibidor de tripsina de soja (20 kDa), lisozima (14 kDa).

Após a corrida eletroforética o gel foi corado por prata, a concentração segundo o método de Oackley *et al.* (1980). O gel foi embebido em solução fixadora (MeOH: HAc:H₂O, na proporção de 4:1:3) por 12 horas. Em seguida, a placa foi lavada com etanol 0,5 M (três trocas por 20 min. cada, sob agitação). O gel foi incubado com solução de tiosulfato de sódio 2 mM por 1 minuto, seguido de três trocas de água por vinte min. Posteriormente, o gel foi imerso em solução de nitrato de prata 2 mM por 20 min. e em seguida a placa foi lavada com água por três vezes a cada 20 min. A revelação foi feita com solução de carbonato de sódio 30 mM contendo formaldeído 0,2 mM até que as bandas protéicas estivessem com a coloração adequada, interrompendo-se a reação pela a adição de ácido acético 75 mM.

3.2 - Determinação da Concentração de Uruprot no Veneno Total

3.2.1 - Pelo Método de Lowry

A dosagem de proteínas foi feita utilizando-se o método descrito por Lowry *et al.* (1951). A amostra com solução de proteína foi diluída 8 vezes em um volume final de 200 μ L e incubada a temperatura ambiente por 10 min. com 1mL de reagente cuproalcalino, constituído de Solução A (carbonato de sódio 2% em NaOH 0,1 M), Solução B1 (sulfato de cobre 1% em H₂O, p/v) e da Solução B2 (tartarato de sódio e potássio 2% em H₂O, p/v) na proporção de 100:1:1 v/v, respectivamente.

Em seguida foram adicionados 50 μ L de Reagente de Folin (Merck), deixou-se por 30 min. à temperatura ambiente e na ausência de luz; posteriormente foi lida a absorbância à 660 nm. A concentração de proteína foi determinada usando curva padrão de soro albumina bovina, em concentrações de 0 a 129 μ g/mL.

3.2.2 - Por Densitometria

A análise densitométrica foi feita utilizando "Sharp-Scanner" para obtenção da imagem e programa Image Master 1D-Elite (Amershan Pharmacia, Upsala, Suécia). O gel corado com Comassie Blue teve a área e intensidade de cada banda quantificada usando-se os mesmos parâmetros de intensidade, resolução, luz, além de possuir uma amostra como padrão interno, para que pudéssemos obter valores expressos em unidades arbitrárias.

3.3 - Ensaio para Glicoproteínas

A eletroforese em condições nativas foi realizada para determinar a presença de carboidratos em Uruprot. O gel nativo contendo Uruprot foi feito em duas placas, uma placa foi corada com Comassie Blue, e a outra foi corada com reagente de Schiff. A

coloração de Uruprot com ácido periódico- reagente de Schiff, após tratamento com periodato evidenciou a presença de carboidratos ligados covalentemente à serinoprotease indicando que esta é uma glicoproteína (figura 11).

A coloração para carboidratos foi desenvolvida de acordo com o método do ácido periódico - Reagente de Schiff (Korn & Wright, 1973). A corrida eletroforética foi feita como descrito em métodos (item 3.1) na ausência de SDS. O gel nativo, após ser retirado do sistema, foi fixado com TCA (ácido tricloroacético) a 0,125 M durante 1 hora e em seguida foi lavado 3 vezes com água Milli Q e incubado com ácido periódico a 0,01 M, em ácido acético 0,03 M, por 1 hora. Após este intervalo, o gel foi lavado por 3 vezes com água Milli Q e deixado por 12 horas, também em água. A revelação foi feita após este período com a retirada da água e a adição de reagente de Schiff por 1 hora ou até o aparecimento das bandas. Em seguida foi lavado repetidamente com metabissulfito de sódio 5 mM, e deixado por 10 min. em ácido acético, para retirar o excesso de corante; posteriormente o gel foi mantido em água. Todas as etapas foram desenvolvidas na ausência de luz.

3.4 - Eletroforese de Duas Dimensões em Gel de Poliacrilamida (2D)

A eletroforese em gel 2D é um método revolucionário para avaliação de *pI* e massa molecular (MM) aparente de proteínas, suas duas dimensões usam parâmetros independentes para cálculo de *pI* e MM. Os programas de análise de imagem criam linhas ("grids") de *pI* e MM, possibilitando que os mesmos possam ser determinados.

A primeira dimensão da 2D é a focalização isoeletrica ("IEF"), aonde as proteínas são separadas em um gradiente de pH até alcançarem a posição estacionária onde a carga total é zero. O pH no qual a proteína tem carga total zero é chamado de ponto isoeletrico (*pI*). Na segunda dimensão, as proteínas separadas pela IEF são novamente separadas por eletroforese do tipo SDS-PAGE. Esta separação é baseada na massa molecular (MM) das proteínas.

O resultado da separação é um perfil de pontos ou "spots". Segundo um sistema Cartesiano, da esquerda para a direita, há um aumento do *pI* e de baixo para cima um

aumento da massa molecular. Estes mapas 2D oferecem a maior resolução de todos os métodos conhecidos atualmente (Westermeier, 1997).

A alta resolução da 2D deve-se ao fato da primeira e da segunda dimensão serem embasadas em parâmetros independentes (pI e massa molecular das proteínas).

Um gel 2D pode ter sua imagem digitalizada em computador. Esta pode ser comparada, via Internet, a géis presentes em bancos de dados de 2D, o que pode levar a identificação de proteínas (por localização no gel), técnica de fácil manuseio e pouco gasto.

3.5 - Análise Automática de Aminoácidos.

O sistema utilizado foi do analisador "Pico-Tag" da Waters, onde a identificação dos aminoácidos foi feita através da cromatografia em HPLC do produto feniltiocarbamil do aminoácido, proveniente da derivatização com feniltiocianato dos aminoácidos obtidos de hidrólise ácida. Estas formas de cromóforos podem ser detectadas em concentrações de 1,0 pmol.

3.5.1 - Preparação da amostra

Redução e Alquilação

Uma quantidade aproximada de 30 nmol da Uruprot proveniente da cromatografia em C18 μ Bondapack foi dissolvida em água e acetonitrila (1:1, v/v) e transferida para pequenos tubos de reação de 20 μ l de volume. Estes tubos foram colocados dentro do frasco de reação, que possui uma tampa especial, para conexão com o sistema de vácuo e atmosfera de nitrogênio.

À proteína dissolvida em tampão completo de redução; Tris, HCL 0,6 M, pH 8,2 contendo 0,001 M EDTA e 6 M guanidina, foi adicionada uma solução de 5 mM DTT e a solução foi incubada por uma hora sob atmosfera de nitrogênio. A proteína reduzida foi

alquilada com ácido iodo acético 0,1 M durante uma hora à temperatura ambiente. Retirou-se o sal da amostra em Sephadex G-25 em ácido acético 1,0 M e monitoradas à 280nm. Os tubos contendo proteína foram liofilizados.

Hidrólise Ácida

Esta etapa foi efetuada colocando no fundo do frasco de reação 100µl de uma solução de HCl 6,0 M, proteína, além de 1,0 mg/mL de fenol para evitar a formação de clorotirosina. Em seguida foi feito vácuo próximo de 1-2 torr até início do borbulhamento do HCl. Fechado o vácuo, deixou-se entrar nitrogênio (SS-ultra puro) por 5 seg. Esta etapa foi repetida por 3 vezes. A seguir removeu-se a tampa do frasco de reação, e a amostra foi levada ao forno de hidrólise, a 105°C, durante 24 horas. Após este período o tubo de reação foi colocado a vácuo até 65 militorr para secagem da proteína hidrolisada.

Derivatização

Na proteína foi adicionado 20 µl de uma solução de metanol:água:triethylamina, 2:2:1 v/v. Cada tubo foi agitado, centrifugado e colocado a evaporar em vácuo até 65 militorr. Este procedimento remove sais e solventes, adsorvidos nos aminoácidos. Uma solução fresca de derivatização foi preparada com metanol:triethylamina:água:feniltiocianato, na proporção 7:1:1:1 v/v, sendo adicionados 20 µl a cada tubo de reação e deixados a temperatura ambiente por 30min. Após a derivatização a amostra foi seca a vácuo até 50 militorr, para completa remoção de todo o PITC. A amostra foi dissolvida em 50 µl de uma solução 0,4 mM de tampão fosfato de sódio contendo 0,05 M de acetonitrila.

A análise dos aminoácidos PITC foi realizada em HPLC, usando coluna C18 µBondapack (3,9 mm X 15 cm) em cromatografia de fase reversa com um gradiente linear de 0 a 100% de acetonitrila 60% por 21 min. A identificação de cada aminoácido foi feita em relação a uma corrida padrão de aminoácidos PITC (Bidlemeier *et al.*, 1984).

3.6 - Determinação da Estrutura N-Terminal

3.6.1 - Transferência para PVDF

A técnica de transferência para PVDF permite que proteínas, separadas em gel de poliacrilamida descrito em método (item 3.1), possam ser transferidas e imobilizadas em membrana de PVDF (polivinildileno difluoreto), isto garante a pureza do material. As bandas de Uruprot transferidas foram utilizadas na determinação da sequência N-terminal da cadeia polipeptídica (LeGendre & Matsudaira, 1988).

O Tampão de transferência foi preparado com 2,2 g de 3-ciclohexil-amino-1-ácido propanosulfônico (CAPS) em 900mL de água, sendo titulado a pH 11 com NaOH 2 M e o volume final completado a 1L com 100 mL de metanol. A membrana de PVDF e o gel de poliacrilamida foram colocados para equilibrar com tampão CAPS por 5 min. O gel foi colocado sobre a membrana em suporte plástico e a transferência se fez a 400 volts por 45 min. a 15°C em sistema refrigerado da série TE (Hoefer, CA, EUA).

As bandas foram reveladas com corante Coomassie blue em metanol e água (0,1%: 50%: 49%), por 2 min., e descorada em solução descorante, metanol, água e ácido acético (5:4:1). As bandas de interesse foram recortadas com auxílio de uma lâmina de aço e utilizadas para a determinação da sequência N-terminal de Uruprot.

3.6.2 - Preparação e aplicação das amostras para determinação do N-terminal

150 µg da serinoprotease (Uruprot) reduzida com 1M de DTT foram transferidos para a membrana de PVDF e aplicados no sequenciador (Procise 491) para a determinação da sequência de aminoácidos da porção amino terminal da Uruprot obtida na cromatografia de fase reversa em HPLC.

*Degradação Automática de Edman*UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

Este método foi utilizado para a determinação da porção N-terminal da Uruprot. O sequenciador automático de proteínas e peptídeos usa a técnica de degradação de Edman (Edman & Begg, 1967) para remover e identificar aminoácidos a partir da porção N-terminal de um polipeptídeo. Após a ativação de um filtro composto de papel e fibra de vidro, a proteína era covalentemente unida a este suporte e em seguida colocada na câmara de reação. Depois de cada ciclo degradativo, o aminoácido N-terminal era removido da cadeia polipeptídica na forma p7 3 derivada de anilintiazolinona (ATZ). O ATZ-aminoácido era automaticamente transferido para uma segunda câmara de reação, onde ocorreu a conversão para um derivado mais estável, na forma de feniltioidantoina do correspondente aminoácido (PTH). O PTH-aminoácido foi transferido para um sistema de cromatografia líquida de alta pressão onde a identificação foi realizada em comparação a uma cromatografia de um padrão de PTH aminoácidos.

O sequenciador utilizado foi o Procise 491 da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (USP) que utiliza para a identificação dos PTH aminoácidos, um sistema de HPLC, ambos da Applied Biosystem.

Reagentes e tampão foram transferidos para a câmara de reação e conversão por controle automático através de um micro processador, permitindo seqüências automáticas em alta sensibilidade entre 10 - 500 picomoles de proteína ou peptídeos. Os reagentes utilizados foram: R1: 5% fenilisotiocianato (PITC) em n-heptano; R2: 12.5% trimetilamina (TMA) em água; R3: ácido trifluoroacético (TFA), com 0,002% de ditiotretitol (DTT); R4: 25% TFA em água com 0,01% DTT; R5: acetonitrila, com 0,001% DTT; S1: n-heptano; S2: etilacetato; S3: 1-clorobutano; S4: 20% acetonitrilo em água.

3.6.3 - Pesquisa da Homologia Sequencial

As sequências N-terminal da Uruprot foi pesquisada, quanto sua homologia com outras proteases de sequências conhecidas usando os serviços eletrônicos BLAST - NCBI (Altschul *et al.*, 1990) e o BLITZ EMBL (Collins & Coulson, 1990).

4 - Caracterização Funcional da Uruprot

4.1 – Padronização de Eritrócitos

A atividade hemolítica de Uruprot foi testada sobre eritrócitos intactos e tripsinizados de humanos tipos A, B, AB e O. O sangue foi colhido e mantido em solução Alsever (2,05g de glicose, 0,80g de citrato de sódio e 0,42g de cloreto de sódio, para 100 mL de água destilada, pH 6,1 ajustado com ácido cítrico).

A tripsinização dos eritrócitos seguiu o método descrito por Lis & Sharon (1972). O sangue foi centrifugado à temperatura ambiente em centrífuga de mesa (Excelsa 3, Fanem S.A.) a 450 X g por 10 min. Em seguida, descartou-se o sobrenadante e o sedimento de células (eritrócitos) foi lavado de 4 a 5 vezes com NaCl 0,15 M, numa proporção de 5 mL de NaCl para cada mL de eritrócito sedimentado.

Para cada 1 mL de eritrócitos lavados foram adicionados 25mL de PBS (0,8g de NaCl, 0,02 g de KCl, 0,17 g de Na₂HPO₄ e 0,02 g de KH₂PO₄, para 100 mL H₂O). A dez partes desta suspensão foi adicionada uma parte de solução de tripsina a 1%, p/v, deixou-se incubar a 37°C por 1 hora. Os eritrócitos tripsinizados foram lavados de 4 a 5 vezes, com solução de NaCl 0,15 M para remoção da tripsina. Finalmente foram ressuspensos em tampão (CTBS) até a concentração de 2% dos eritrócitos (v/v).

4.2 - Atividade Hemolítica

Para a determinação da atividade hemolítica da Uruprot foram utilizadas placas de microtitulação de 96 poços (Corning, USA), com 12 colunas verticais e 8 fileiras horizontais. Inicialmente foram colocados 100 μ l da amostra (Uruprot) nos poços da coluna 1 e nos demais poços foram adicionados 50 μ l de solução salina tamponada com PBS. A amostra foi então diluída serialmente, com transferência de 50 μ l dos poços da coluna 1 até a penúltima (coluna 11). Após as diluições, foram adicionados aos poços 50 μ L de suspensão de eritrócitos tripsinizados a 2% (v/v). Os últimos poços (coluna 12) continham somente suspensão de eritrócitos e foram considerados controles, a coluna 1 foi adicionada apenas água e amostra era um controle sem solução salina tamponada com PBS. As placas foram incubadas por 2 horas a temperatura ambiente e observou-se ao final desse período a concentração mínima de Uruprot que apresentava atividade hemolítica. Foi considerado como hemólise a ausência do botão compacto de células no fundo dos poços, resultado observado no controle, e coloração avermelhada presente no sistema de teste, indicando liberação de hemoglobina, uma vez que na hemólise as membranas das hemáceas são rompidas.

4.3 - Agregação Plaquetária

Para este ensaio foi coletado 20 mL de sangue tipo A de voluntários sadios, que não tomaram medicamentos por 15 dias. O sangue foi colocado em tubos plásticos contendo citrato de sódio 3,8% (1:10 v/v), e centrifugado a 200 X g por 15min. a 25°C o sobrenadante foi coletado para obtenção do plasma rico em plaquetas (PRP), enquanto que o plasma pobre em plaquetas (PPP) foi obtido centrifugando-se o sangue remanescente a 900 X g por 15min., a 25°C.

Para preparar as plaquetas lavadas (PL), o PRP foi centrifugado à 900 X g por 12 min. na presença de 9 μ l de iloprost (8 nM), um análogo da prostaciclina. O sobrenadante foi desprezado, o precipitado de plaquetas foi ressuspenso em solução de Krebs (200 mL:

1,38g de Na Cl; 0,42g de NaHCO₃; 0,2g de C₆H₁₂O₆; 0,074g de KCl; 0,032g de KH₂PO₄; 0,0007g de MgSO₄) e centrifugado a 200 X g; o processo repetiu-se por mais duas vezes (Radomski & Moncada, 1983). Após a lavagem, as plaquetas (50 µl) foram incubadas em tubos tipo eppendorf, com 950 µl de oxalato de amônio 1% por 10 min. e a contagem de plaquetas foi feita em Câmara de Neubauer, ajustada para 3 x 10⁸ plaquetas/mL. Cloreto de Cálcio (1 mM) foi adicionado à suspensão final das plaquetas. O sangue para obtenção das PL continha ACD-C 3,68% (1:10).

4.3.1- Medida da Agregação Plaquetária

A medida de agregação foi realizada, usando-se um agregômetro de dois canais (Payton Scientific Instruments, Inc., Buffalo, NY). Para o PRP que representa 100% de agregação o aparelho foi calibrado contra PPP, determinando-se um pico máximo de agregação. O PRP representa 0% de agregação, determinando-se uma linha de base, com isso é possível determinar uma amplitude para o registro de agregações deste plasma. Para as PL (0%) a calibração foi realizada contra solução de Krebs (100%).

Uma suspensão de PRP (500µL) foi mantida sob agitação constante (900 X g) no agregômetro em cuvetas a 37°C, e então estimuladas com 25 µl de Ristocetina (1 mg/mL). Para este agonista a agregação (medida por mudanças na transmitância) iniciava-se em 3 min. após a estimulação. No entanto, os registros eram feitos por um período de 10 min. para uma maior segurança dos resultados.

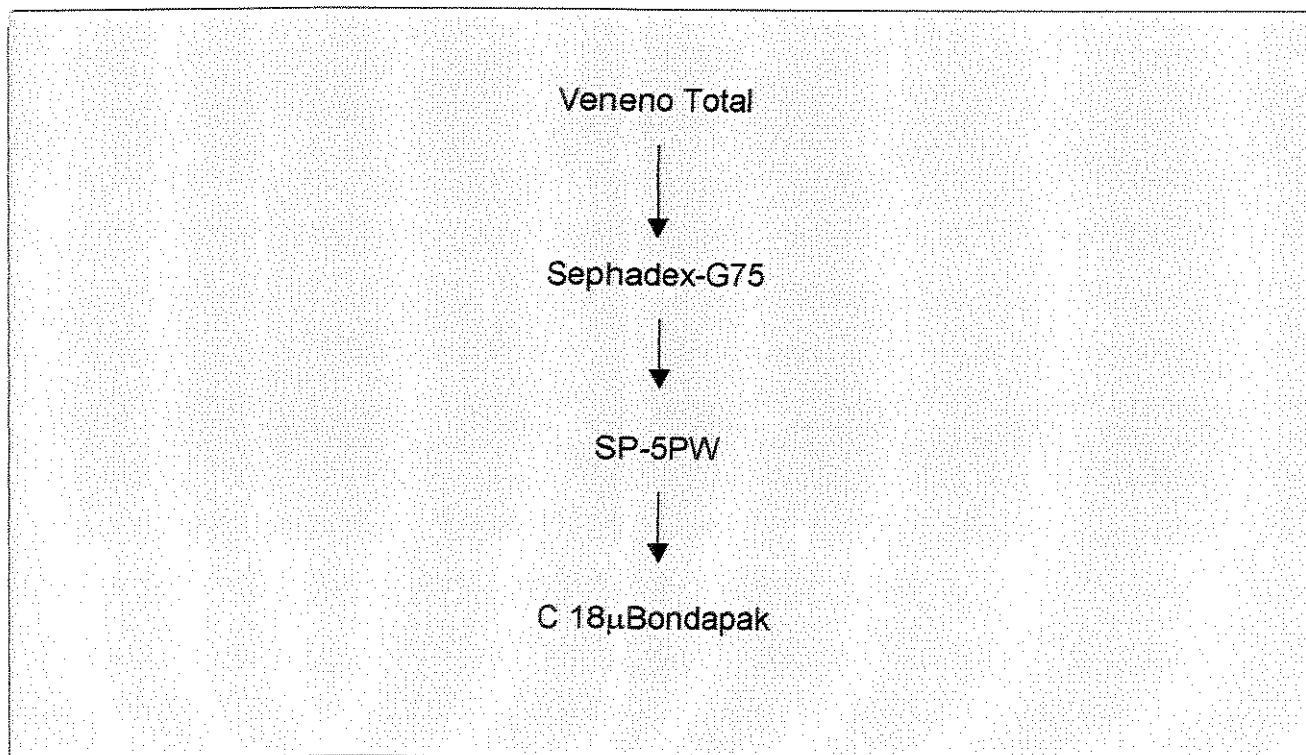
A medida de agregação plaquetária foi feita através da transmitância (capacidade de transmissão de luz de uma solução) sabe-se que a transmitância é inversamente proporcional à absorbância (quantidade de luz absorvida por uma solução). Pode-se calcular o resultado em absorbância através da fórmula ($A = 2 - \log T \%$).

Após o registro da agregação estimulada por Ristocetina adicionou-se, a uma outra suspensão de plaquetas, 15 µL de Uruprot com concentração inicial de 50 µg/mL, na ausência e presença de Ristocetina.

RESULTADOS

5 – Purificação da serinoprotease Uruprot

Na purificação da serinoprotease de *Bothrops alternatus* chamada Uruprot usou-se cromatografia de exclusão molecular em coluna Sephadex G-75, cromatografia de troca iônica em coluna SP 5PW e coluna C18 μ Bondapak como já descrito em materiais e métodos e demonstrado no esquema 1.



Esquema 1: Esquema representativo da purificação de Uruprot discriminando as etapas pelas quais passou o veneno total e suas frações.

5.1 – Cromatografia do veneno em coluna de Exclusão Molecular em Sephadex G-75.

Quatro frações correspondentes aos picos de absorbância em 280nm foram eluídas na cromatografia de exclusão molecular em Sephadex G-75 a partir do veneno total de *Bothrops alternatus* em tampão bicarbonato amônio (0,1M pH 8,0). Essas frações foram denominadas SI, SII, SIII E SIV e o perfil de eluição é mostrado na figura 7. Testes anteriores feitos em nosso laboratório demonstraram que a fração SI apresenta uma proteína com atividade “trombina-like”, a fração SII apresenta proteínas com forte atividade coagulante, e a fração SIV apresenta atividade de potenciadora de bradicinina em testes feito em cobaias (Smolka *et al.*, 1998; Camillo, 1995).

A fração SIII constituída por proteínas de massa molecular aparente em torno de 30 kDa, representou a fração do veneno de *B. alternatus* com maior rendimento e inibiu a Ristocetina na sua atividade de ativadora da agregação plaquetária.

Os testes de atividade biológica que monitoraram esta cromatografia demonstraram que a fração SIII é capaz de se ligar ao fator de von Willebrand (vWF) em teste “in vitro”. Além disso esta fração apresentou atividade de lectina (hemaglutinação) (Novello, 1995).

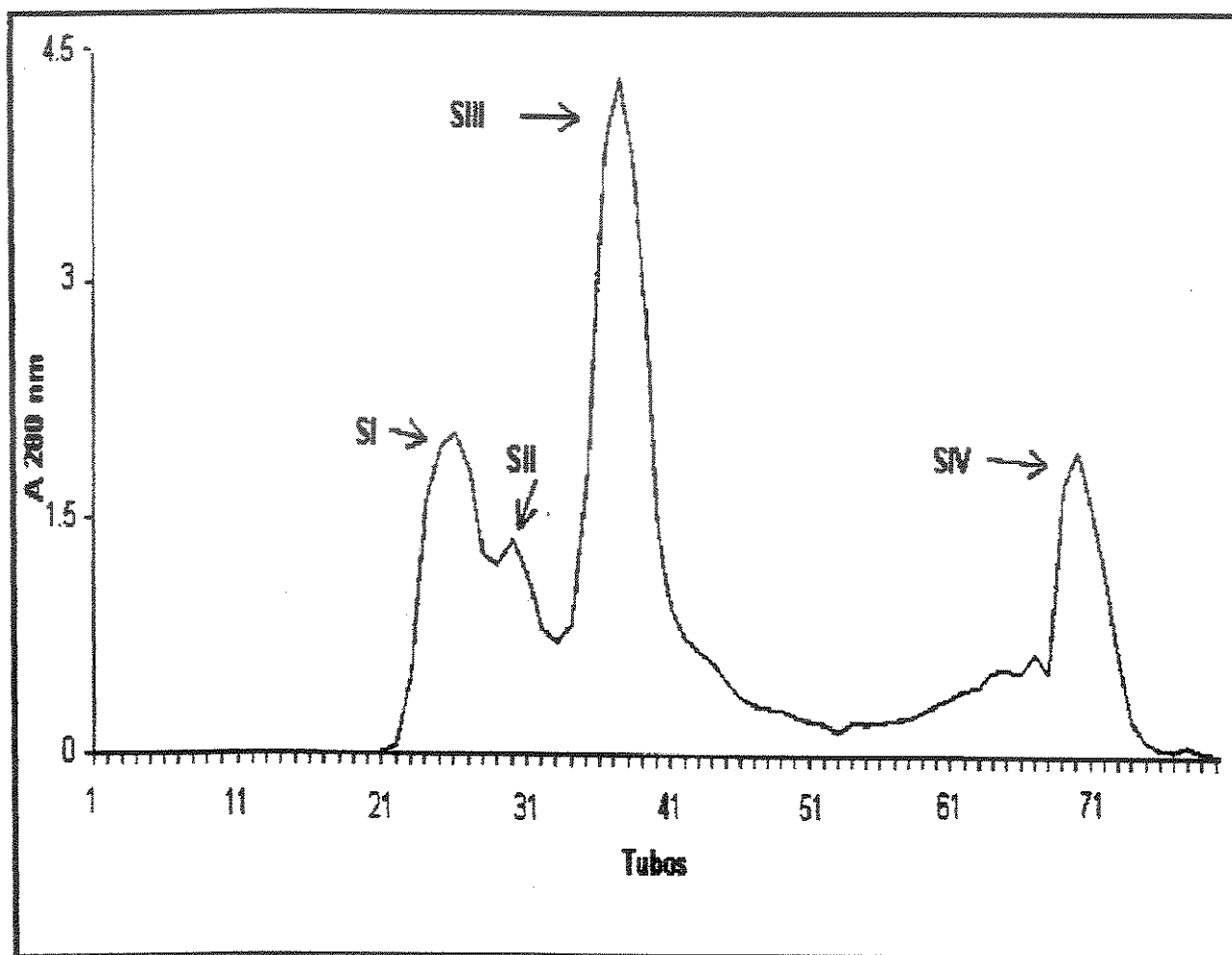


Figura 7: Cromatografia do veneno total em coluna G-75 (115 X 2,0cm) equilibrada com bicarbonato de amônia 0,1 M, pH 8,0. Frações coletadas: 4ml, fluxo constante de 12 mL/h. Apresentando quatro picos dos quais SIII foi escolhido para os estudos de caracterização.

5.2 – Cromatografia de Troca Iônica em SP 5PW

A fração ativa (SIII) proveniente da cromatografia de exclusão molecular em Sephadex G-75 foi cromatografada em coluna SP 5PW (0,75 x 7,5cm, Walters) e apresentou quatro picos principais denominados PI, PII, PIII e PIV, como evidenciado na figura 8. A fração PI não se ligou a coluna na eluição com tampão fosfato 5 mM pH 7,4. As frações PII e PIII foram eluídas com um gradiente de 40% a 60% de tampão (fosfato 5 mM pH 7,4 contendo NaCl 0,5 M). O primeiro pico (PI) após gel SDS-PAGE mostrou-se com uma única banda, portanto puro, foi dialisado, liofilizado e utilizado para os estudos seguintes.

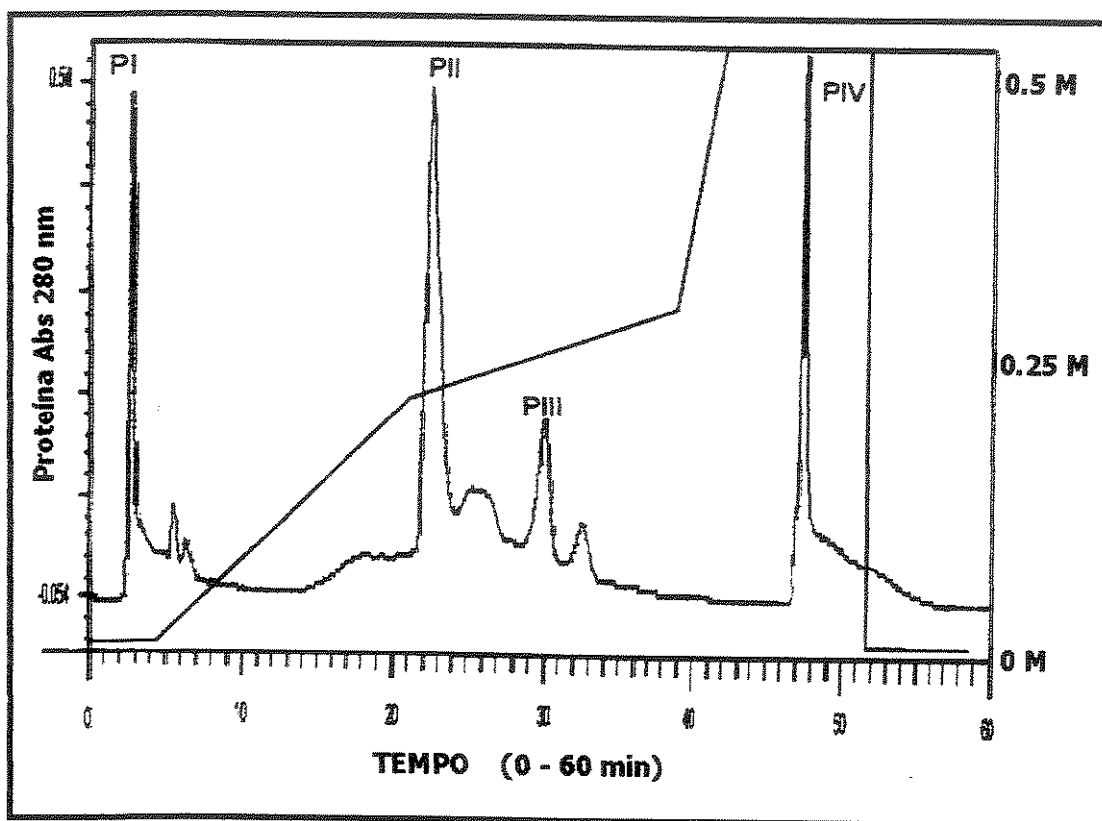


Figura 8: Cromatografia de Troca Iônica da fração SIII em SP 5PW, acoplada ao sistema de HPLC. Amostra: 4 mg de SIII proveniente da coluna de exclusão molecular. Tampão de equilíbrio fosfato 5 mM pH 7,4. Tampão de eluição fosfato 5 mM pH 7,4 com gradiente de NaCl 0,5 M. Fluxo: 1mL/min.

5.3 – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em HPLC/Fase Reversa

A fração PI (Uruprot) eluída da cromatografia em coluna SP 5PW e o pico SIII foram submetidos à cromatografia em fase reversa-HPLC. Monitorou-se o grau de pureza e hidrofobicidade da Uruprot em comparação com SIII. Esta foi eluída como um único pico simétrico em torno de 78% de acetonitrila (figura 9), demonstrando que Uruprot apresenta-se em sua forma pura, sendo de caráter apolar ou hidrofóbico. A composição de aminoácidos (tabela 1) corrobora com este dado à medida que nos mostra na composição de Uruprot a alta concentração de aminoácidos hidrofóbicos como glicina, isoleucina, e fenilalanina.

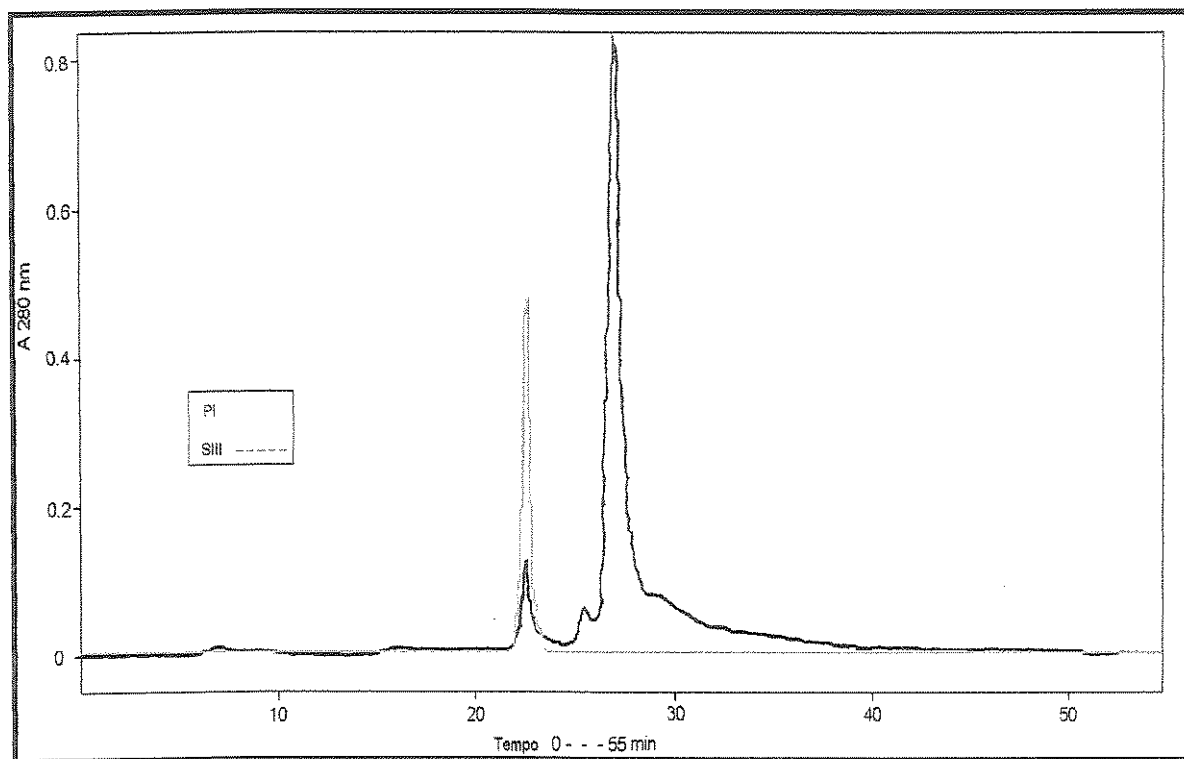


Figura 9: Cromatografia de SIII e PI em fase reversa com uma coluna C18 μ Bondapak (3,9 X 30cm), equilibrada em solução de TFA (ácido trifluoroacético) 0,1M pH 2,5 (solvente A). Amostra aplicada: 500 μ g de PI e 500 μ g de SIII. Gradiente linear contínuo até 100% de solvente B (acetonitrilina 66% em 0,01M de TFA ácido trifluoroacético). Fluxo de 1 mL/min. Absorbância monitorada em 280 nm.

5.1.1 – Caracterização Físico Química da Uruprot

5.1.2 – Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (SDS-PAGE)

A fração PI eluída com tampão fosfato 5 mM pH 7,4 e gradiente 0,5M de NaCl em coluna SP 5PW, após a diálise contra água, foi liofilizada e submetida à análise do perfil de massa aparente em gel de poliacrilamida a 12,5%, com SDS, como descrito em materiais e métodos. O gel foi corado com prata e PI apresentou, em condições não redutoras, uma única banda com aproximadamente 28 kDa e em condições redutoras uma única banda com aproximadamente 32 kDa (figura 10).

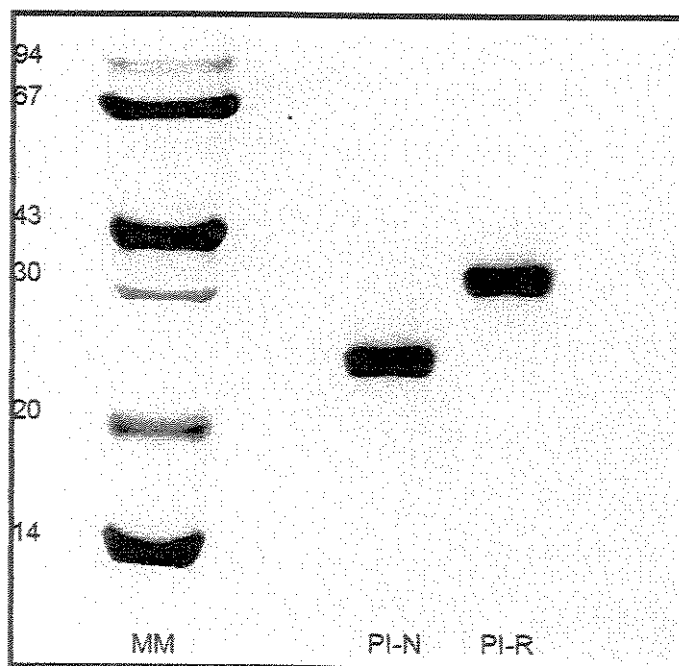


Figura 10: Eletroforese de PI em gel de poliacrilamida a 12,5%, na presença de SDS, fração obtida na cromatografia em SP 5PW. Análise de PI na presença (PI-R) e ausência (PI-N) de 0,1M de DTT. MM - marcadores de massa molecular (em kDa identificados na esquerda e descritos em métodos)

5.1.3 Ensaio para glicoproteínas

A fração PI obtida após cromatografia em SP 5PW e que corresponde à protease Uruprot foi submetida a uma eletroforese SDS-PAGE a 12.5% para identificação da presença ou não de glicoproteína, o método utilizado foi o ácido periódico reativo de Schiff (PAS).

A coloração de Uruprot realizada com ácido periódico – Reagente de Schiff, após o tratamento do gel nativo com periodato, evidenciou a presença de carboidratos ligados covalentemente à protease revelando ser uma glicoproteína (figura 11).

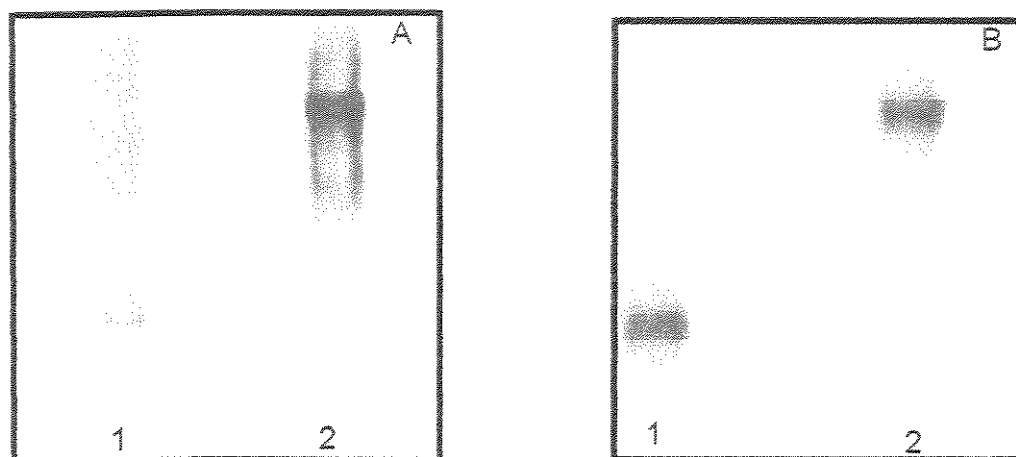


Figura 11: Eletroforese de Uruprot em condições nativas (ausência de SDS) pH 8,0. **A)** Coloração para Carboidratos; 1A: Albumina; 2A: Uruprot. **B)** Coloração para proteínas, 1B: Albumina; 2B: Uruprot.

5.1.4 – Eletroforese de Duas Dimensões em Gel de Poliacrilamida

Quando examinado por eletroforese de duas dimensões (2D) em gel SDS-PAGE, a fração SIII do veneno total mostrou duas faixas de proteínas que, fixaram-se próximas aos marcadores de 30 kDa e 14 kDa, dado observado na figura 12. Uruprot migrou entre as proteínas de 30 kDa aproximadamente e mostrou-se homogênea, apresentando um “spot” com ponto isoelétrico próximo a 4,6, dado que pode ser observado na figura 13.

Eletroforese em duas dimensões evidenciou somente um “spot”, reafirmando a pureza de Uruprot e não observou-se a heterogeneidade comum a glicoproteínas, sugerindo ser Uruprot uma glicoproteína constituída por um único tipo de carboidrato.

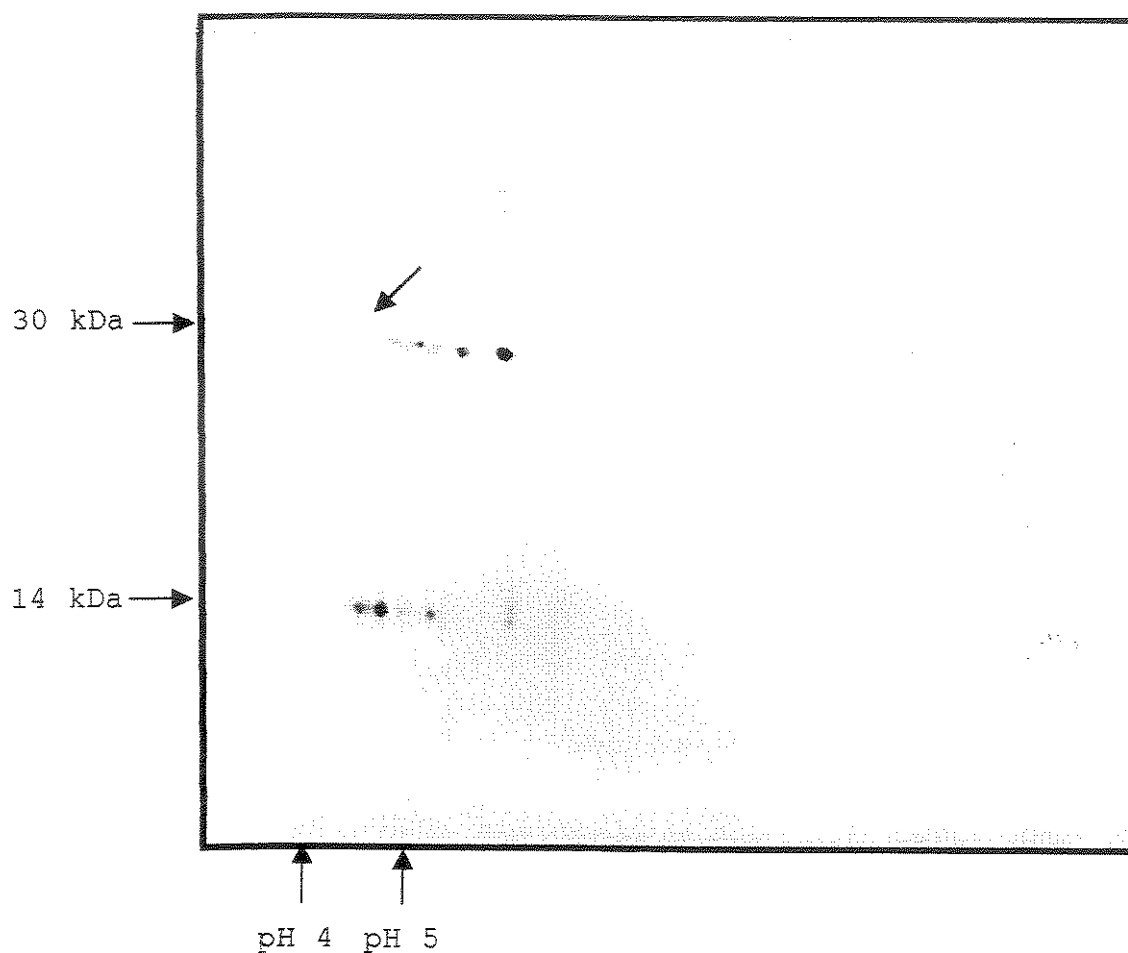


Figura 12: Eletroforese PAGE de duas dimensões em gel de poliacrilamida de proteínas da fração SIII do veneno de *Bothrops alternatus*. A seta no interior do gel indica a posição de Uruprot. Os valores da esquerda para a direita indicam o pI (valores de 3 a 10) e de baixo para cima o aumento da massa molecular (de 14 kDa a 66 kDa).

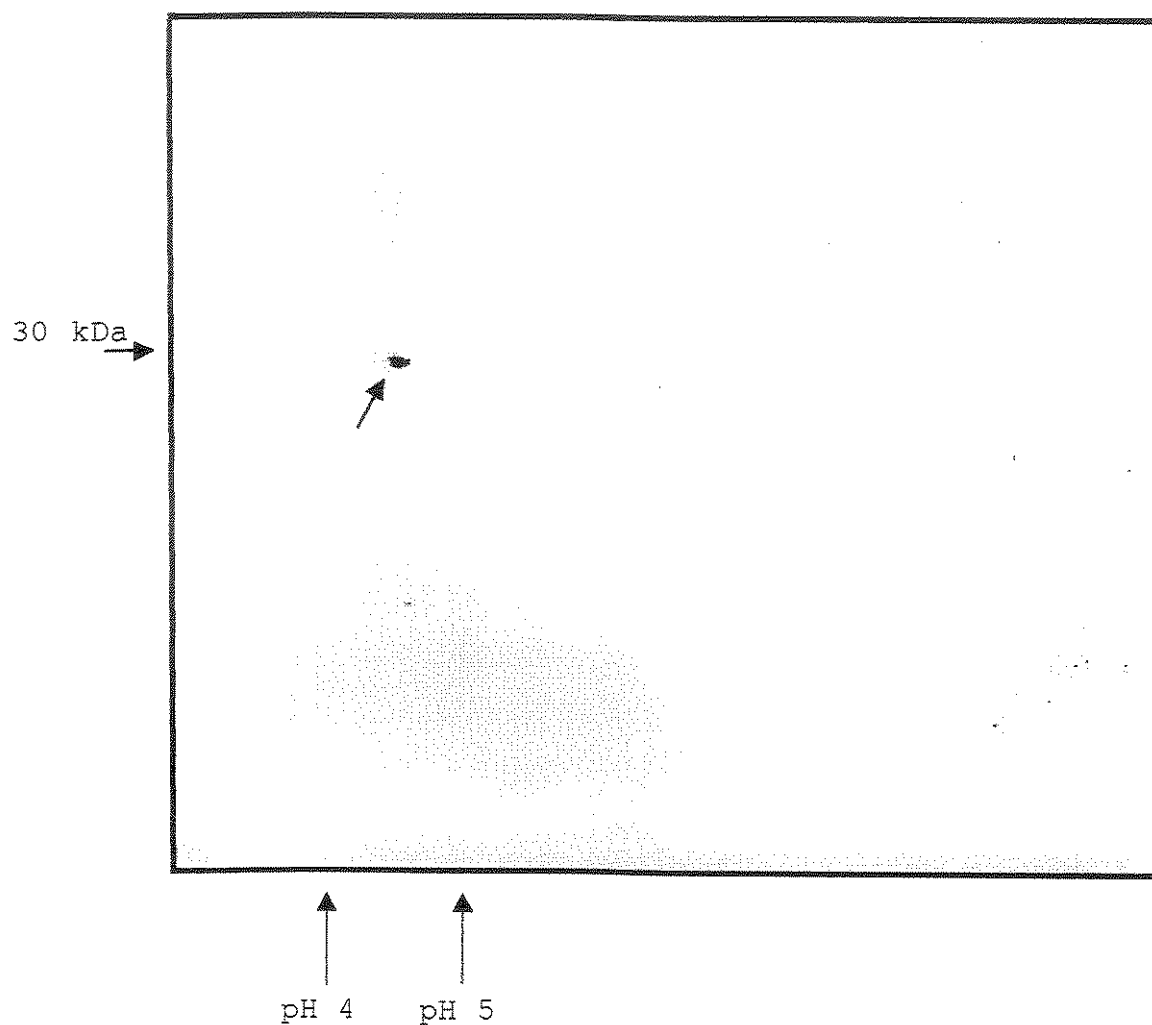


Figura 13: Eletroforese de duas dimensões em gel de poliacrilamida de Uruprot, serinoprotease purificada do veneno de *Bothrops alternatus*. A seta no interior do gel indica a posição de Uruprot no mesmo. Os valores da esquerda para a direita indicam o pI (de 3 a 10) e de baixo para cima o aumento da massa molecular (de 14 kDa a 66 kDa).

5.1.5 – Análise de Aminoácidos

A serinoprotease Uruprot foi submetida à hidrólise ácida (HCl 6 M) e à derivatização para obtenção da composição global de aminoácidos mostrada na tabela 1. A análise da composição global de aminoácidos evidenciou uma alta ocorrência de Gly, Phe, Ile, Glx, Thr e Ser, em comparação a outros resíduos. Uruprot apresenta baixo conteúdo de aminoácidos básicos como His e Arg, tratando-se de uma proteína ácida. Evidenciou-se a ausência de metionina, resíduo presente em grande concentração na albumina que é comumente encontrada em proteínas provenientes de soros.

Não foram determinados resíduos de cisteína e triptofano. O triptofano não foi detectado pelo processo empregado e outros testes como o de fluorescência não foi empregado. O único resíduo de cisteína foi computado a partir da determinação do N-terminal de Uruprot.

A comparação da composição de aminoácidos de Uruprot com outras proteínas em banco de dados (<http://expasy.crb.nrc.ca>) identificou homologia entre Uruprot e outras proteínas conhecidas. O resultado obtido comprovou a caracterização de Uruprot como uma serinoprotease, observando-se um score (medida de grau de homologia) de 331 para PA-BJ, (uma serinoprotease que tem ação de ativadora do plasminogênio, Serrano *et al.*, 1995).

Tabela 1: Nesta tabela mostrou-se a composição de aminoácidos da Uruprot, onde a composição é expressa em moles de resíduo por moles de proteína, e expressa como porcentagem molar. A abreviação n.d. significa não determinado. A presença de uma cisteína, foi estabelecida pela sequência N-terminal de Uruprot.

Aminoácido	Uruprot	Porcentagem	PM calculado
Asn	12	3.5%	1381.32
Gln	22	6.4%	2840.86
Ser	30	8.7%	2612.70
Gly	54	15.8%	3081.78
His	01	0.3%	137.160
Arg	01	0.3%	156.210
Thr	45	13.1%	5000.40
Ala	13	3.8%	924.170
Pro	14	4%	1359.82
Tyr	06	1.7%	684.900
Val	10	2.9%	1631.50
Met	00	0%	0
Cys	01	0.3%	103.140
Ile	31	9.1%	3198.27
Leu	10	2.92%	1131.70
Phe	33	9.6%	4857.27
Lys	09	2.6%	1153.71
Trp	n.d.	n.d.	n.d.
Total	292	100%	30254.9

5.1.6 . Determinação da Seqüência N-Terminal

Após determinação da seqüência N-Terminal da Uruprot, pesquisa em banco de dados de proteínas com seqüências já determinadas mostrou alta homologia da Uruprot com outras proteínas, como por exemplo as KLE I (96%) e KLE II (94%) que têm função “calicreína-like”, e serinoproteases ativadoras do plasminogênio como TSV-PA (94%), dentre outras.

A parte colorida da figura 14 representa a seqüência consenso entre as diferentes serinoproteases indicando que regiões próximas à extremidade N-terminal são muito conservadas e demonstram alto grau de homologia evidenciando mais uma das características das serinoproteases.

Proteínas	Posição																			Homol		
	1			5					10					15				20		%		
Uruprot	V	V	G	G	D	E	C	N	I	N	E	H	R	S	L	V	A	I	F	D	S	
Catroxobina	V	V	G	G	D	E	C	N	I	N	E	H	R	S	L	V	A	I	F	V	S	96
KLEI	H	V	G	G	D	E	C	N	I	N	E	H	R	S	L	V	A	I	F	V	S	96
KLEII	H	V	G	G	D	E	C	N	I	N	E	H	R	S	L	V	A	I	F	V	F	94
DE-3	V	I	G	G	D	E	C	N	I	N	E	H	R	F	L	V	A	I	Y	D		94
TSV-PA	V	F	G	G	D	E	C	N	I	N	E	H	R	S	L	V	V	L	F	N	S	94
Jerdonina	V	I	G	G	D	E	C	N	I	N	E	H	R	F	L	V	A	L	Y	D	F	92
Ancrode	V	I	G	G	D	E	C	N	I	N	E	H	R	F	L	V	A	L	Y	D	S	92
Crotalase	V	I	G	G	D	E	C	N	I	N	E	H	R	F	L	V	A	L	Y	D	Y	90
Bilineobina	V	I	G	G	D	E	C	N	I	N	E	H	R	F	L	V	A	L	Y	D	V	90

Figura 14: Análise da homologia comparativa da região N-terminal de Uruprot com outras serinoproteases. A parte destacada em cor amarela determina a região de uma seqüência invariável entre as diferentes serinoproteases: Jerdonina (Lu, *et al.*;2000), Catroxobina (Pirkle, *et al.*;1989), KLEI e KLEII (Komori, *et al.*; 1993), DE-3 (Chiou, *et al.*; 1992), TVS-PA (Zhang, *et al.*; 1995), Crotalase (Pirkle, *et al.*; 1981), Ancrode (Au, *et al.*; 1993), Bileobina (Markland & Damus 1971). A última coluna à direita indica o grau de homologia entre as diferentes proteínas.

6 – Caracterização Funcional da Uruprot

6.1. – Ensaio Hemolítico

Leituras foram feitas após 2 horas de incubação da placa de microtitulação a temperatura de 37°C. Para os ensaios da atividade hemolítica, Uruprot foi testada em eritrócitos intactos e tripsinizados de humano (A, B, AB e O), na presença de CTBS como descrito na metodologia. A concentração mínima de Uruprot capaz de hemolizar os eritrócitos tripsinizados foi de 0.97µg/mL para o tipo sanguíneo A de humano, mostrando ser este tipo mais sensível a Uruprot que também mostrou-se capaz de hemolizar todos os tipos sanguíneos tripsinizados, sem especificidade (tabela 2).

Tabela 2: Tabela demonstrando a concentração mínima hemolizante de Uruprot. Ensaio hemolítico feito com Uruprot agindo sobre diferentes tipos de eritrócitos (A, B, AB, O) na presença de cálcio. A sigla **no** (não observado) indica que até a concentração de 150µg/mL não ocorreu hemólise. As hemáceas para o ensaio foram tripsinizadas e diluídas à concentração de 2%.

Eritrócitos	Intactos	Tripsinizados
A	15.6µg/mL	0.97µg/mL
B	no	3.9µg/mL
AB	no	1.95µg/mL
O	no	3.9µg/mL

6.2 – Agregação Plaquetária

O teste de agregação plaquetária realizado com a fração PI mostrou que esta proteína não agrega plaquetas diretamente, e é capaz de inibir a agregação plaquetária induzida pela Ristocetina.

Inicialmente incubou-se as PRP com apenas Ristocetina (1 mg/mL) e o resultado foi a ativação da agregação plaquetária (linha A, figura 15), numa segunda incubação foi adicionada PRP, Ristocetina (1 mg/mL) e após 5 minutos adicionou-se à esta suspensão Uruprot e observou-se efeito inibitório numa concentração mínima de 10 µg/mL (linha B, figura 15) sobre a agregação plaquetária induzida por Ristocetina.

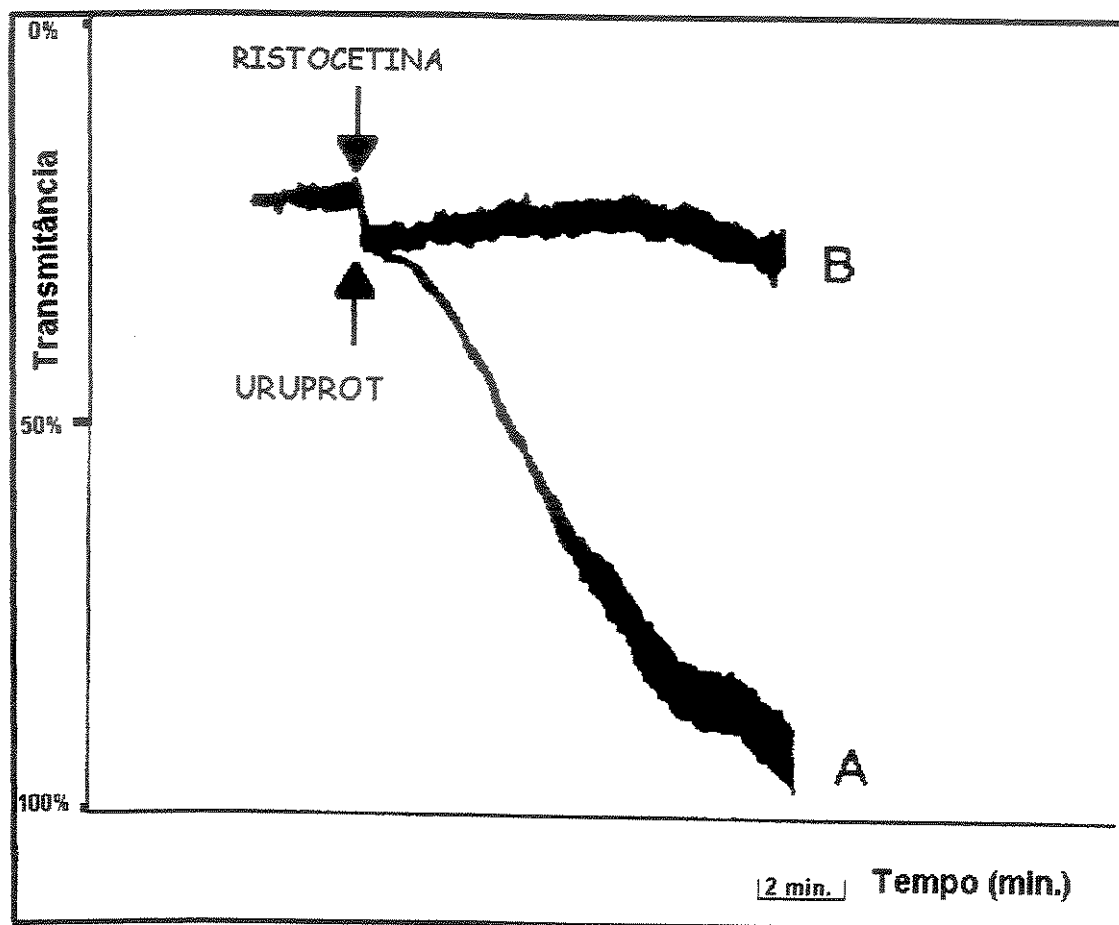


Figura 15: Efeito inibitório de Uruprot no processo de agregação plaquetária induzido pela Ristocetina. No quadro a letra **A** refere-se a suspensão de plaquetas lavadas na presença de Ristocetina (1mg/mL) onde observa-se o processo de agregação plaquetária e a letra **B** demonstra a suspensão de plaquetas lavadas na presença de Ristocetina (1mg/mL) e Uruprot (10 µg/mL) onde percebe-se o efeito inibitório da Uruprot sobre a Ristocetina.

DISCUSSÃO

Serpentes do gênero ***Bothrops*** produzem venenos ricos em componentes enzimáticos ou tóxicos que, quando introduzidos nos tecidos de suas presas ou vítimas ocasionais, induzem lesões locais que, às vezes, repercutem sistematicamente (Cardoso *et al.*, 1993; Otero-Patiño *et al.*, 1997). As serpentes do gênero ***Bothrops*** são responsáveis por 86% das ocorrências de acidentes ofídicos no Brasil (Barraviera & Pereira, 1994), torna-se portanto importante objeto de estudo.

Os acidentes causados por serpentes do gênero ***Bothrops*** mostram um quadro clínico bastante característico decorrente da ação combinada dos componentes presentes em seu veneno: ações proteolíticas, coagulantes e hemorrágicas (Cardoso, 1997). Das proteínas encontradas nos venenos de serpentes destacam-se três grupos que atuam nos processos da cascata de coagulação: desintegrinas, proteínas relacionadas com as lectinas tipo C e as proteases (Kini & Evans, 1992).

Segundo Barraviera & Pereira (1994) peçonhas da maioria das espécies de ***Bothrops***, principalmente exemplares jovens, como ***B. jararaca***, ***B. moojeni***, ***B. neuwiedi***, ***B. cotiara*** e ***B. alternatus*** (figura 1) apresentam componentes fortemente coagulantes, em contraste com as de ***B. jararacussu*** e ***B. itapetiningae*** que apresentam uma menor atividade de coagulação.

As proteases apresentam atividade fibrino(geno)lítica, agindo na coagulação sangüínea, fibrinólise, agregação plaquetária e nos processos de trombose e hemostase (Matsui *et al.*, 2000). Venenos de serpentes apresentam também componentes que provocam hemólise, que pode ocorrer de duas maneiras: diretamente agindo sobre a membrana celular desorganizando-a ou, indiretamente agindo sobre componentes da fase fluída (proteínas conjugadas) liberando ou formando substâncias que, após essa ação, adquirem capacidade de atuar sobre a membrana eritrocitária (Sugiki, *et al.*, 1995; Freire, 1998).

Neste trabalho relata-se a purificação de uma serinoprotease (Uruprot) do veneno de ***Bothrops alternatus***. A purificação da Uruprot deu-se por métodos convencionais de

química de proteínas: cromatografia em Sephadex G-75 e cromatografia de troca iônica em SP 5PW.

Inicialmente o veneno bruto foi submetido a uma filtração molecular em gel de Sephadex G-75 equilibrada com tampão bicarbonato de amônio (0,1M, pH 8,0) onde, obteve-se quatro frações: SI, SII, SIII, SIV (figura 7). Tornou-se interessante à purificação da fração SIII pois a mesma foi o componente com maior rendimento, apresentava proteínas cujas massas encontravam-se no patamar de 30 kDa e, estudos realizados mostraram que SIII não agregava plaquetas diretamente, não inibia α trombina, não induzia agregação plaquetária na presença vWF, porém inibia a agregação induzida por Ristocetina (Novello, 1995).

Estes resultados são indicativos que as proteínas contidas na fração SIII possuem atividades biológicas diferentes de outras proteínas com massa molecular aparente em torno de 30 kDa, observadas em venenos de serpentes de gêneros e até mesmo em espécies diferentes como: Albogregina-B (23, kDa cadeia única, e que induz agregação plaquetária direta através de ligação com o complexo GPIb- Yoshida *et al.*, 1993), Botrocetinas (30-32 kDa, cadeia única de 27 kDa e cadeia dupla 15 e 14,5 kDa, e que induz agregação plaquetária na presença de vWF Read *et al.*, 1978) e Botropsjaracina (27 kDa, cadeia dupla com 15 e 13 kDa e que promove inibição da α trombina Zingali *et al.*, 1993).

Na cromatografia de troca iônica em SP 5PW a fração SIII foi resolvida em quatro picos principais nomeados PI, PII, PIII E PIV (figura 8). Resultados anteriores de nosso laboratório mostraram que a fração PII tem a capacidade de se ligar ao fator de vWF, inibindo a ligação da Ristocetina com o mesmo, induzindo a hemorragia (Novello, 1995). Neste trabalho mostramos que a fração PIII apresentou pouco rendimento e nenhum teste biológico foi realizado; PIV não apresentou atividade sobre agregação plaquetária, enquanto PI apresentou a capacidade de inibir a agregação plaquetária na presença de Ristocetina (figura 15).

De acordo Zhang *et al.* 1995, as proteases parecem ser componentes constantes nos venenos de serpentes. Análises individuais do veneno de quinze espécies de *Trimeresurus stejnegeri* evidenciou similar atividade de ativação do plasminogênio “in

vitro", que é normalmente desencadeada por serinoproteases. O rendimento de proteases purificadas do veneno de serpentes fica na faixa de 0,1 a 1 % do veneno total. Uruprot representa aproximadamente 0,5% do veneno total, de acordo com a quantificação por densitometria, sendo igual ao rendimento observado para as serinoproteases TSV-PA e LV-PA, ambas ativadoras do plasminogênio, que representam 0,5% das proteínas totais do veneno (Zhang *et al.*, 1995, Sanchez *et al.*, 2000).

Eletroforese em condições desnaturantes tem sido um método muito utilizado para determinar o grau de pureza e massa molecular aparente de serinoproteases. As serinoproteases apresentam massa molecular aparente muito variável, algumas têm peso molecular em torno de 23 a 35 kDa como Flavoxobina 23,5 kDa de *Trimeresurus Flavoridis* (Shieh *et al.*, 1988), PABJ 30kda de *Bothrops jararaca* (Serrano *et al.*, 1995), TVS-PA de 33 kDa de *Trimeresurus stejnegeri* (Zhang *et al.*, 1995) e LV-PA 33kDa de *Lachesis muta* (Sanchez *et al.*, 2000). Outras apresentam massas moleculares acima de 35 kDa, como Cerastotina 40kDa de *Cerastes cerastes* (Marrakchi *et al.*, 1997), CPIE-2, 44KDa de *Agkistrodon caliginosus* Shimokawa & Takahashi, 1993) e Bilineobina 57 kDa de *Agkistrodon bilineatus* (Komori *et al.*, 1993).

SDS-PAGE 12,5% de Uruprot, corado por prata, além de confirmar um elevado grau de homogeneidade evidenciou também uma massa molecular aparente de 28 kDa em condições nativas e aproximadamente 32 kDa em condições redutoras com DTT, como ilustrado na figura 10. Assim, pode-se inferir que Uruprot é uma proteína de cadeia polipeptídica única, ou que uma possível dimerização não é estável nas condições desnaturantes. Em condições redutoras, ocorreu um pequeno aumento na massa molecular aparente, isto ocorreu devido à redução das pontes dissulfeto intracadeia, fazendo com que a cadeia polipeptídica ficasse "esticada", o que comumente ocorre com proteínas globulares, dificultando a penetração da Uruprot no gel de poliacrilamida.

O peso molecular aparente de Uruprot (não reduzido) está muito próximo ao de várias serinoproteases observadas na literatura, principalmente para PA-BJ (30 Kda) de *Bothrops jararaca* (Serrano *et al.*, 1995), TVS-PA (33 kDa) de *Trimeresurus stejnegeri* (Zhang *et al.*, 1995) e KLE II 29,2 KDa de *Crotalus atrox* (Bjarnason *et al.*, 1983). A massa

molecular em condições reduzidas também é semelhante para a serinoprotease Balterobina isolada e caracterizada por Smolka *et al.* (1998).

A homogeneidade de Uruprot é confirmada por gel nativo e cromatografia em coluna C18 em sistema de HPLC (figura 9). O gel nativo corado para proteína evidencia uma única banda, que provavelmente apresenta um baixo *pI*, devido sua facilidade de penetração em direção ao polo positivo, resultados observados por Zhang *et al.*, 1995 e Zhang *et al.* 1998.

Muitas proteínas de venenos de serpentes são glicoproteínas e em algumas espécies podem ser glicosiladas de maneira específica. Elas contêm oligossacarídeos de diversas estruturas, e as atividades biológicas e farmacológicas dessas glicoproteínas em veneno de serpente ainda permanecem obscuras (Gowda & Davidson, 1992).

A grande maioria das serinoproteases são glicoproteínas: Okinaxobina II de *Trimeresurus okinavensis* (Nose *et al.*, 1994), EI e EII de *Crotalus atrox* (Bjarnason *et al.*, 1983), Bilineobina de *Agkistrodon bilineatus* (Komori *et al.*, 1993), PA-BJ de *Bothrops jararaca* (Serrano *et al.*, 1995) Stejnobina de *Trimeresurus stejnegeri* (Zhang *et al.*, 1998), algumas apresentando resíduos de ácido siálico como EII, Crotalase de *Crotalus adamanteus* (Markland & Damus 1971) e outras manose como Loxolysina B (Feitosa, *et al.*, 1998; Veiga *et al.*, 1999).

Os carboidratos são responsáveis pela heterogeneidade aparente nos géis onde é possível pós coramento, identificar-se um arraste, que é característico de glicoproteínas em eletroforese em condições nativas, isto é, na ausência de SDS (Morris *et al.*, 1989). A coloração de Uruprot pelo reagente de Schiff, após tratamento do gel nativo com periodato evidenciou a presença de carboidratos ligados covalentemente a serinoprotease Uruprot revelando ser esta uma glicoproteína (figura 11). Entretanto, outras metodologias específicas são necessárias para que se possa saber o tipo de carboidrato ligado à estrutura de Uruprot, como análise da composição de carboidrato e quantificação pelo método de Dubois (1976).

Em géis 2D, o *pI* e a massa molecular (MM) aparente de todas as proteínas podem ser estimados ao mesmo tempo por análise da imagem do gel. A estimativa pode ser feita comparando-se o padrão da amostra em relação a proteínas padrão de *pI* e MM

conhecidos (Wilkins *et al.*, 1996; Westermeier, 1997). Estes géis 2D oferecem a maior resolução de todos os métodos conhecidos atualmente para determinação de MM de proteínas (Westermeier, 1997). A alta resolução da 2D deve-se ao fato da primeira e segunda dimensão serem embasadas em parâmetros independentes (pI e massa molecular das proteínas).

Encontram-se dentre serinoproteases purificadas muitas que apresentam pI básicos, porém atualmente a purificação e caracterização de serinoproteases ácidas têm sido demonstrada (Shimokawa & Takahashi 1993; Deshimaru *et al.*, 1996). As serinoproteases parecem advir de um gene ancestral comum divergindo nos seus processos de evolução. Isto é fundamentado nas diferentes organizações de exons e introns em seus genes, resultando em alterações de suas atividades fisiológicas. Não raro, encontram-se serinoproteases de fontes distintas que têm pI diferentes e atividades fisiológicas semelhantes. Embora seja inapropriada a suposição de que a atividade das serinoproteases depende do ponto isoelétrico, isoenzimas básicas parecem possuir atividades fisiológicas específicas diferentes das conhecidas para serinoproteases ácidas (Deshimaru *et al.*, 1996).

Podemos citar KLE I e KLE II, ambas serinoproteases ácidas (4,7 e 4,3) que possuem a mesma atividade calicreína-like (Bjarnason *et al.*, 1983). Observa-se também que serinoproteases como Okinaxobina I e Okinaxobina II que têm pI diferentes 5,4 e 8,1, respectivamente, apresentam a mesma atividade trombina. Embora Okinaxobina I degrade primeiro a cadeia β do fibrinogênio e posteriormente a cadeia α , enquanto, a Okinaxobina II quebra preferencialmente a cadeia α do fibrinogênio e lentamente a cadeia β , ação essa observada para a maioria das serinoprotease com atividade trombina-like (Nose *et al.*, 1994). Há diversos trabalhos indicando a purificação de serinoproteases de veneno de serpente que estimulam a liberação de ativadores de plasminogênio em células endoteliais (Sanchez *et al.*, 2000). Podemos citar algumas serinoproteinases ácidas como LV-PA e TSV-PA ambas com atividade de ativadoras do plasminogênio (Zhang *et al.*, 1995; Sanchez *et al.*, 2000).

A análise em eletroforese 2D (figura 13), mostra que Uruprot é homogênea com um único spot com relação a cadeia protéica e a de carboidratos, com um pI ácido (4,6).

Observa-se na literatura muitas serinoproteases ácidas com atividade trombina-like, calicreína-like e ativadoras do plasminogênio, portanto, faz-se necessário à realização de testes adicionais para confirmar a atividade específica de Uruprot.

Quando proteínas são submetidas à hidrólise ácida em elevadas temperaturas, podem ocorrer algumas alterações químicas que interferem nos resultados das análises de aminoácidos. Não há uma condição padrão de hidrólise que forneça resultados corretos para todos os aminoácidos nas moléculas de proteínas, podendo ainda ocorrer a intervenção de compostos não protéicos na recuperação dos aminoácidos (Sittampalam *et al.*, 1988).

Em serinoproteases apesar das variadas propriedades fisiológicas, verifica-se que em sua grande maioria elas são compostas por aproximadamente 235 aminoácidos que são altamente homólogos em suas sequências (Deshimaru *et al.*, 1996). A análise da composição de aminoácidos de Uruprot que pode ser vista na tabela 1 demonstrou similaridades com algumas serinoproteases trombina-like e ativadoras do plasminogênio. A alta ocorrência dos aminoácidos Gly, Thr, Phe, Ile, Ser e Glu também são características das serinoproteases: Bilineobin de *Agkistrodon bilineatus* (Komori *et al.*, 1993), Crotalase, Trombina, e Okinaxobina II. É possível observar também a baixa ocorrência de aminoácidos básicos como His e Arg, o que confirma o resultado do *pI* ácido (4.6) observado em gel 2D.

Na análise de Uruprot, o valor de triptofano não foi quantificado, pois esse resíduo não foi detectado pelo processo empregado e nenhuma correção para possíveis perdas durante a hidrólise ácida foi realizada. Não foi detectado nenhum resíduo de metionina na análise desta serinoprotease o que confirma sua pureza uma vez que metionina é um resíduo muito presente em albumina que é comumente encontrada em proteínas provenientes de soro. Contudo, o valor da massa molecular aproximada para Uruprot (30 kDa), pela análise de aminoácidos ficou próximo do valor da massa molecular aparente encontrada em gel de poliacrilamida.

Uruprot apresenta alta concentração aminoácidos hidrofóbicos como Gly, Ile, Phe e Pro conferindo um alto grau de hidrofobicidade, como demonstrado em coluna de fase reversa C18, onde Uruprot foi eluída por 78% de acetonitrila. As interações hidrofóbicas

são responsáveis pelo arranjo molecular da proteína, uma vez que, expõem os aminoácidos hidrofílicos (polares) e conservam em seu interior os hidrofóbicos (apolares). As serinoproteases conservam a grande maioria de seus aminoácidos, assim eles devem estar organizados em posições distintas em suas moléculas. A conformação resultante deste arranjo molecular determina a função da proteína, sendo possível supor que as diferentes atividades fisiológicas atribuídas as serinoproteases tenham seu fundamento nesta interação.

As regiões próximas à extremidade N-terminal das proteases são muito conservadas e apresentam alto grau de homologia. Comparando-se a região N-terminal de Uruprot com a mesma região de outras proteases de sequências já determinadas, encontram-se muitos resíduos conservados (figura 14), apresentando homologia de 96% com Catroxobin e KLE I, 94% com KLE II e TVS-PA, 92% com Ancrod, 90% com Crotalase e Bilineobin, sendo todas serinoproteases (Pirkle *et al.*, 1989; Bjarnason *et al.*, 1983; Zhang *et al.*, 1995; Burkhart *et al.*, 1992; Markland & Damus 1971; Komori *et al.*, 1993). Quando comparada a Trombina, observou-se 23% de homologia seqüencial (dado não mostrado).

Uruprot apresentou em seu N-terminal a sequência consenso dos resíduos invariáveis **VVGDECNINEHR-LVAI** (figura 14) com as serinoproteases comparadas, ao que tudo indica, estas proteases mostram muitos resíduos de aminoácidos que se conservaram durante a evolução e que estão provavelmente relacionados com sua atividade biológica. Uruprot além da alta homologia apresentou-se com pl semelhante, rendimento igual e massa molecular aparente similar a duas serinoproteases com atividade de ativadoras do plasminogênio que são: LV-PA e TSV-PA (Zhang *et al.*, 1995; Sanchez *et al.*, 2000). Entretanto a atividade fisiológica de Uruprot necessita ser melhor elucidada.

Várias enzimas de venenos de serpentes, especialmente da família Viperidae, são conhecidas por ter grande efeito sobre o sistema de coagulação sangüíneo, estas enzimas podem promover ou inibir a coagulação (Markland, 1998). Dentre as atividades biológicas dos venenos de serpentes, aranhas e insetos peçonhentos podemos citar a atividade hemolítica. O grau de hemólise é dependente do tipo de hemácia, sendo as humanas de sensibilidade moderada quando comparadas com as de cães e ratos, que são mais

sensíveis. Peptídeos isolados de venenos de serpentes produzem lise direta em hemácias lavadas e ressuspendidas em meio isotônico (Condrea *et al.*, 1964).

Ensaio de hemólise realizado com hemáceas de humanos, numa concentração de 2%, evidenciou que Uruprot tem atividade hemolítica numa concentração mínima de 0,97 µg/mL em eritrócitos tripsinizados do tipo A, mostrando serem estes mais sensíveis a ação de Uruprot, entretanto, observou-se hemólise em todos os eritrócitos tripsinizados de outros grupos sanguíneos com concentrações crescentes de Uruprot (tabela 2).

As diferentes enzimas serinoproteases têm mecanismo de ação próprio e interagem com diferentes afinidades sobre vários sítios ativos na molécula de trombina, bem como vWF, Ristocetina, Botrocetina (Marrakchi *et al.*, 1997). Por exemplo, Bothropsjaracina (Zingali *et al.*, 1993) que inibe a ligação de α trombina ao complexo glicoprotéico IIb-IIIa de plaquetas (GPIIb-IIIa), não tem atividade de coagulinina ou de inibir a ligação de Ristocetina ao vWF. Alguns autores sugerem que Bothropsjaracina pode ser um análogo da Botrocetina, uma coagulinina purificada de ***Bothrops jararaca*** (Andrews *et al.*, 1989),

Ristocetina é um antibiótico análogo da Botrocetina, que “*in vitro*” mimetiza a ação de agonistas liberados na lesão de vasos sanguíneos. Nos testes de agregação plaquetária Uruprot não teve ação sobre a agregação em células lavadas, mas foi capaz de inibir o efeito da Ristocetina (1 mg/mL), em concentração mínima de 10 µg/mL, impedindo sua ligação ao vWF (figura 15). Os resultados observados para Uruprot são comparáveis àqueles encontrados para Urucetina, embora Uruprot não tenha apresentado homologia sequencial, apresentou homologia funcional com Urucetina (Novello, 1995). As serinoproteases trombina-like têm potente atividade coagulante sendo seu mecanismo de ação similar ao da trombina. Podemos então sugerir que Uruprot não apresenta similaridade com serinoproteases “trombina-like”.

Em conclusão, do veneno de ***Bothrops alternatus*** foi purificado uma serinoprotease ácida, cuja eletroforese em gel de poliacrilamida revelou ser de cadeia única mesmo em condições redutoras, com peso molecular aparente de 28-32 kDa. Uruprot apresentou atividade hemolítica e inibiu o efeito da Ristocetina na agregação plaquetária. Os dados aqui apresentados esclarecem algumas particularidades funcionais

dessas proteínas que se relacionam com a sua organização estrutural. Um maior conhecimento das serinoproteases de serpentes, através da purificação e caracterização bioquímica e funcional é necessário, e muito contribuirá para a elucidação das variadas atividades das proteases, permitindo assim, uma melhor aplicação destas em prevenção de doenças trombóticas.

Os resultados obtidos são estimulantes e somado ao grau de pureza observado principalmente por SDS-PAGE 2D, onde têm-se um único spot para Uruprot, justifica um estudo mais detalhado quanto à atividade biológica e caracterização da estrutura primária de Uruprot.

Sendo Uruprot uma glicoproteína, seria importante identificar e quantificar o(s) açúcar(es) constituinte(s) na molécula de Uruprot.

Do ponto de vista físico-químico, seria interessante realizar uma caracterização da estrutura molecular de Uruprot, por sequenciamento total de seus resíduos (estrutura primária), determinação da porcentagem de estrutura secundárias (por dicroísmo circular) e análise da estrutura terciária a partir de estudos cristalográficos.

O interesse no estudo das serinoproteases não se restringe unicamente na estrutura físico-química de Uruprot, mas também tem o objetivo de elucidar as possíveis diferenças estruturais que contribuem para expressão da atividade biológica. Como mencionado anteriormente, outras metodologias são necessárias para inferir as atividades biológicas de Uruprot, objetivando uma maior aplicabilidade desta serinoprotease.

UNICAMP

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

- Alevriadou, B. R.; Moake, J. L.; Turner, N. A.; Ruggeri, Z. M.; Folie, B. J.; Phillips, M. D.; Schreiber, A. B.; Hrinda, M. E.; McIntire, L. V. (1993). Real-time analysis of shear-dependent thrombus formation and its blockade by inhibitors of von Willebrand factor binding to platelets. **Blood**, 81: 1263 – 1276.
- Altschul, S. F.; Gish, W.; Miller, W.; Myers, E. W.; Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. **J. Mol. Biol.**, 215(3): 403 – 410.
- Andrews, R. K.; Booth, W. J.; Gorman, J. J.; Castaldi, P. A.; Berndt, M. C. (1989). Purification of botrocetin from *Bothrops jararaca* venom. Analysis of the botrocetin-mediated interaction between von Willebrand factor and the human platelet membrane glycoprotein Ib-IX complex. **Biochemistry**, 28: 8317 – 8326.
- Barraviera, B. & Pereira, P.C.M. (1994). Acidentes por serpentes do gênero *Bothrops*. In: Barraviera, B. **Venenos Animais. (1. ed.) EPUC**, Rio de Janeiro, Brasil.
- Bauer, K. A. (1997). Activation of the VII-tissue factor pathway. **Thromb. Haemost.**, 78: 108 – 111.
- Berndt, M. C.; Ward, C. M.; Booth, W. J.; Castaldi, P.A.; Mazurov, A.V.; Andrews, R. K. (1992). Identification of aspartic acid 514 through glutamic acid 542 as a glycoprotein Ib-IX complex receptor recognition sequence. Mechanisms of modulation of von Willebrand factor by ristocetin and botrocetin. **Biochemistry**, 31: 11144 – 11151.
- Bidlingmeyer, B. A.; Gohem, S. A.; Tarvin, T. L. (1984). Rapid analysis of aminoacids using pre column derivatization. **J. Chromatogr.**, 336: 93 – 104.
- Bjarnason, J. B.; Barish, A.; Drenzo, G. S.; Campbell, R.; Fox, J. W. (1983). Kallikrein-like enzymes from *Crotalus atrox* venom. **J. Biol. Chem.**, 258: 12566 – 12573.
- Bodde, W.; Brandstetter, H.; Mather, T.; Stubbs, M. (1997). Comparative analysis of haemostatic proteinases: structural aspects of thrombin factor Xa, factor IXa and protein C. **Thromb. Haemost.**, 78: 501 – 511.

- Brinkhous, K. M.; Read, M. S.; Fricke, W. A.; Wagner, R. H. (1983). Botrocetin (venom caoglutinin): reaction with a broad spectrum of multimeric forms of factor VIII macromolecular complex. **Proc. Natl Acad. Sci. USA**, 80: 1463 – 1466.
- Burklart, W.; Smith, G. F. H.; Su, J.-L.; Parikh, I.; LeVine, H. (1992). Amino acid sequence determination of ancrod, the thrombin-like α -fibrinogenase from the venom of *Agkistrodon rhodostoma*. **Febs Lett.**, 297: 297 – 301.
- Caen, J. P. & Rosa, J. P. (1995). Platelet – vessel wall interaction: from the bedside to molecules. **Thromb. Haemost.**, 74: 18 – 24.
- Cardoso, J. L. C.; Fan, H. W.; França, F. O. S.; Jorge, M. T.; Leite, R. P.; Nishio, S. A.; Avila, A.; Sano-Martins, I. S.; Tomy, S. C.; Santoro, M. L.; Chudzinski, A. M.; Castro, S. C. B.; Kamaguti, A. S.; Kelen, E. M. A.; Hirata, M. H.; Mirandola, R. M. S.; Theakston, R. D. G.; Warrell, D. A. (1993). Randomized comparative trial of three antivenoms in the treatment of envenoming by lance-headed vipers (*Bothrops jararaca*) in São Paulo, Brazil. **Quart. J. Med.**, 86: 315 – 325.
- Cardoso, J. L. C. (1997). Bothrops. In: Nicoletta, A.; Barros, E.; Torres, J. B.; Marques, M. G. **Acidentes com animais peçonhentos: consulta rápida**. (1. ed.) Porto Alegre: Serviço de Eventos do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, 207 p.
- Carvalho, D. D.; Marangoni, S.; Oliveira, B.; Novello, J. C. (1998). Isolation and Characterization of a new lectin from the venom of the snake *Bothrops jararacussu*. **Biochem. Molecular Biology International**, 44: 933 – 938.
- Chiou, S.-H.; Hung, C.-C.; Lin, C.-W. (1992). Isolation of crotalase-like protease with α -fibrinogenase activity from the western diamondback rattlesnake, *Crotalus atrox*. **Biochem. Intl**, 26: 105 – 112.
- Christophe, O.; Obert, B.; Meyer, D.; Girma, J. P. (1991). The binding domain of von Willebrand factor to sulfatides is distinct from those interacting with glycoprotein Ib, heparin, and collagen and resides between amino acid residues Leu 512 and Lys 673. **Blood**, 78: 2310 – 2317.
- Coller, B. S.; Anderson, K.; Weisman, H. F. (1995). New antiplatelet agents: platelet GPIIb/IIIa antagonists. **Thromb. Haemost.**, 74: 302 – 308.

- Collins, J. F. & Coulson, A. F. W. (1990). Significance of protein sequence similarities. **Methods Enzimol.**, 183: 474 – 486.
- Condrea, E.; Mammon, Z.; Aloof, S.; de Vries, A. (1964). Susceptibility of erythro cytes of various animal species to the hemolytic and phospholipid-splitting action of snake venom. **Biochim. Biophys. Acta**, 84: 365 – 375.
- Daltry, J. C.; Wüster, W.; Thorpe R. S. (1996). Diet and snake venom evolution. **Nature**, 379: 537 – 540.
- Davie, E. W. Fujikawa, K.; Kisiel, W. (1991). The coagulation cascade: initiation, maintenance and regulation. **Biochemistry**, 30: 10365 – 10370.
- Davie, E. W. (1995). Biochemical and molecular aspects of the coagulation cascade. **Thromb. Haemost.**, 74: 1 – 6.
- Derenleau, D. A. (1987). Blood platelet shape change ABCs. **Trends Biochem.Sci**, 12: 439 – 442.
- Deshimaru, M.; Ogawa, T.; Nakasjima, K.; Nobuhisa, I.; Chijiwa, T.; Shimohigashi, Y.; Fukumaki, Y.; Niwa, M.; Yamashina, I.; Hattori, S.; Ohno, M. (1996). Accelerated evolution of crotaline snake venom gland serine proteases. **FEBS Lett.**, 397: 83 – 88.
- Drickamer, K. (1988). Two distinct classes of carbohydrate recognition-domains in animal lectins. **J. Biol. Chem**, 263: 9557 – 9560.
- Dubois, M.; Gilles, K. A.; Hamilton, J. K.; Rebers, P. A.; Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of singers and related substances. **Anal. Chem.**, 28 (3): 350 – 360.
- Edman, P. & Begg, G. (1967). A protein sequenator . **Eur. J. Biochem.**, 1: 80 – 91.
- Federici, A. B.; Stabile, M. T.; Canciani, S.; Miyata, S.; Ware, J. L. (1995). New mutation Ile (546) Val in family with type IIB von Willebrand disease characterized by spontaneous platelet aggregation, thrombocytopenia and normal levels of ristocetin cofactor. **Thromb. Haemost.**, 73: 1170.
- Feitosa, L.; Gremski, W.; Veiga, S. S.; Elias, M. C. Q. B.; Graner, E.; Mangili, O C.; Brentani, R. R. (1998). Detection and characterization of metalloproteinases with

- gelatinolytic, fibronectinolytic and fibrinogenolytic activities in brown spider (*Loxosceles intermedia*) venom. **Toxicon**, 36: 1039 – 1051.
- Fenton II, J. W.; Ofosu, F. A.; Brezniak, D. V.; Hassouna, H. I. (1998). Thrombin and antithrombotics. **Semin. Thromb. Haemost.**, 24: 87 – 91.
- Freire, M. G. M. (1998). Glicoproteína de 66 kDa de veneno de *Bothrops atrox* transforma eritrócitos humanos em ativadores do sistema complemento autólogo. **Tese de Mestrado**, IB – UENF.
- Fujimura, Y.; Titani, K.; Usami, Y.; Suzuki, M.; Oyama, R.; Matsui, T.; Fukui, H.; Sugimoto, M.; Ruggeri, Z. M. (1991). Isolation and chemical characterization of two structurally and functionally distinct forms of botrocetin, the platelet coagglutinin isolated from the venom of *Bothrops jararaca*. **Biochemistry**, 30: 1957 – 1964.
- Fujimura, Y. & Titani, K. (1993). Structure and function of von Willebrand factor. In **haemostasis and thrombosis**, (3. ed.) Bloom, A. L.; Forbes, C. D.; Thomas, D. P.; Tuddenham E. G. D.; Churchill Livingstone, London, pp 379 – 395.
- Fujimura, Y.; Kawasaki, T.; Titani, K. (1996). Snake venom proteins modulating the interaction between von Willebrand factor and platelet glycoprotein Ib. **Thromb. Haemost.**, 76: 633 – 639.
- Ganz, P. N.; Tackaberry, E. S.; Rock, G. (1986). The binding of purified factor VIII to platelets. In: **Progress in Clinical and Biological Research**, vol. 283, Platelet Membrane Receptors: Molecular Biology, Immunology, Biochemistry, and Pathology, pp. 255 – 261 (Jamieson, G. A., Ed.) New York: Alan R. Liss.
- Giga, Y.; Ikai, A.; Takahashi, K. (1987). The complete amino acid sequence of echinoidin, a lectin from the coelomic fluid of the sea urchin *Anthocidaris crassispina*. **J. Biol. Chem.**, 262: 6197 – 6203.
- Ginsburg, D. & Sadler, J. E. (1993). von Willebrand disease: a database of point mutations, insertions and deletions. **Thromb. Haemost.**, 69: 177 – 184.
- Gowda, D. C. & Davidson, E. A. (1992). Structural features of carbohydrate moieties in snake venom glycoproteins. **Biochim. Biophys. Res. Commun.**, 182: 294 – 301.

- Halkier, T. (1991). **Mechanisms in blood coagulation, fibrinolysis and the complement system**. Cambridge, Cambridge University Press, pp. 467.
- Halton, M. W. C. (1973). Studies on the coagulant enzyme from *Agkistrodon rhodostoma* venom. Isolation and some properties of the enzyme. **J. Biochem.**, 131: 799 – 807.
- Handa, M.; Titani, K.; Holland, L. Z.; Roberts, J. R.; Ruggeri, Z. M. (1986). The von Willebrand factor-binding domain of platelet membrane glycoprotein Ib. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 261: 12579 – 12585.
- Hati, R.; Mitra, P.; Sarker, S.; Bhattacharyya, K. K. (1999). Snake Venom Hemorrhagins. **Crit. Rev. in Toxicol.**, 29: 1 – 19.
- Hawiger, J. (1989). Platelet secretory pathways. **Meth. Enzymol.**, 169: 191 – 195.
- Hawiger, J. (1992). Introduction to platelet structural and function organization. **Meth. Enzymol.**, 215: 3 - 20. 00
- Henschen-Edman A.H.; Theodor, I.; Edwards, B. F. P.; Pirkle, H. (1999). Crotalase, a fibrinogen-clotting snake venom enzyme: primary structure and evidence for a fibrinogen recognition exosite different from thrombin. **Thromb. Haemost.**, 81: 81 – 86.
- Herwald, H.; Renné, T.; Meijers, J. C. M.; Chung, D. W.; Page, J. D.; Colman, R. W.; Müller-Esterl, W. (1996). Mapping of the discontinuous kininogen binding site of prekallikrein. **J. Biol. Chem.**, 271: 13061 – 13067.
- Hilbert, L.; Gaucher, C.; de Romeuf, C.; Horellou, M. H.; Mazurier, C. (1994). Leu 697 – Val mutation in mature von Willebrand factor is responsible for type IIB von Willebrand disease. **Blood**, 83: 1542 – 1550.
- Hirabayashi, J.; Kusunoki, T.; Kasai, K. (1991). Complete primary structure of a galactose-specific lectin from the venom of the Rattlesnake *Crotalus atrox*. Homologies with Ca^{2+} dependent-type lectins. **J. Biol. Chem.**, 266: 2320 – 2326.
- Hite, L. A.; Shannon, J. D.; Bjarnason, J. B. and Fox, J. W. (1992) Sequences of a cDNA Clone Encoding the Zinc Metalloproteinase Hemorrhagic Toxin from *Crotalus Atrox*: Evidence For Signal, Zymogen, and Disintegrin-Like Structures. **Biochemistry**, 31, p. 6203 – 6211.

- Hoge, A. R. & Romano H., S.A.R.W.L. (1978/1979). **Sinopse das Serpentes Peçonhentas do Brasil** (2. ed.). Mem. Inst. Butantan São Paulo 42/43: 373 – 402.
- Hung, C. C.; Huang, K. F.; Chiou, S. H. (1994). Characterization of one novel venom protease with β -fibrinogenase activity from the Taiwan habu (*Trimeresurus mucrosquamatus*): purification and cDNA sequence analysis. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 205: 1707 – 1715.
- Ikeda, Y.; Handa, M.; Kamata, T.; Kawano, K.; Kawai, Y.; Watanabe, K.; Kawakami, K.; Sakai, K.; Fukuyama, M.; Itagaki, I.; Yoshioka, A.; Ruggeri, Z. M. (1993). Transmembrane calcium influx associated with von Willebrand factor binding to GPIb in the initiation of shear-induced platelet aggregation. **Thromb. Haemost.**, 69: 496 – 502.
- 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.
- Iwanaga, S. & Suzuki, T. (1979). Enzymes in Snake Venom. In: Snake Venoms. **Handbook of Experimental Pharmacology.**, Lee, C. Y. vol. 52, cap. 4, pp 105. Springer – Verlag Berlin- Heidelberg – New York.
- Iwanaga, S. & Takeya, H. (1993). Structure and function of snake venom metalloproteinase family. In: Imahori, K.; Sakiyama, F. (Eds), Methods in Protein Sequence Analysis. **Plenum Press**, New York, pp. 107 – 115.
- Jamieson, G. A. (ED.) (1988). **Progress in clinical and biological research**, vol. 283, Platelet membrane receptors: molecular biology, immunology, biochemistry and pathology. New York: Alan R. Liss.
- Kamiguti, A. S. & Sano-Martins, I. (1995). South american snake venoms affecting haemostasis. **J. Toxicol.**, – Toxin Review 14: 359 – 374.
- Kamiguti, A. S.; Zuze, M.; Theakston, R.G.D. (1998). Snake Venom Metalloproteinases and Desintegrins: Interactions with Cells. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, 31: 853 – 862.
- Kassab, B. H. (1999). Purificação e caracterização parcial de uma lectina do veneno da serpente *Bothrops moojeni*. **Tese de mestrado**, IB – UNICAMP.

- Kawasaki, T.; Sakai, Y.; Taniuchi, Y.; Sato, K.; Maruyama, K.; Shimizu, M.; Kaku, S.; Yano, S.; Inagaki, O.; Tomioka, K.; Ynagisawa, I.; Takenaka, T. (1996). Biochemical characterization of a new desintegrin, flavostatin, isolated from *Trimeresurus flavoviridis* venom. **Biochimie**, 78: 245 – 252.
- Kini, R. N. (1996). Are C-type lectin-related proteins derived by proteolysis of metalloproteinase/desintegrin precursor proteins. **Toxicon**, 34: 1287 – 1294.
- Kini, R. M. & Evans, H. J. (1992). Structural domains in venom proteins: Evidence that metalloproteinases and nonenzymatic platelet aggregation inhibitors (desintegrins) from snake venoms are derived by proteolysis from a common precursor. **Toxicon**, 30: 265 – 293.
- Komori, Y.; Nikai, T.; Ohara, A.; Yagihashi, S.; Sugihara, H. (1993). Effect of bilineobin, a thrombin-like proteinase from the venom of common cantil (*Agkistrodon bilineatus*). **Toxicon**, 31: 257 – 270.
- Korn, E. D. & Wright, P. L. (1973). Macromolecular composition of amoeba plasma membrane. **J. Biol. Chem.** 248: 439 – 447.
- Kornalik, F. (1990). Toxins affecting blood coagulation and fibrinolysis. In: **Handbook of Toxicology**, pp 683 (Shier, W. T. & Mebs, D., Eds) New York: Marcel Dekker.
- Kroll, M. H.; Harris, T. S.; Moake, J. L.; Handin, R. I.; Schafer, A. I. (1991). von Willebrand factor binding to GPIb initiates signals for platelet activation. **J. Clin. Invest**, 88: 1568 – 1573.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins among the assembly of the head of the bacteriophage T₄. **Nature**, 227: 680 – 685.
- LeGendre, N. & Matsudaira, P. (1988). Direct protein microsequencing from immobilized-P transfer membrane. **Biotechnol.**, 6: 154 – 157.
- Li, Z. Y.; Yu, T. F.; Lian, E. C. Y. (1994). Purification and Characterization of L-amino acid oxidase from King cobra (*Ophiophagus hannah*) venom and its effects on human platelet aggregation. **Toxicon**, 32 (11): 1349 – 1358.

- Lin, Y.; Shenoy, S. S.; Harris, R. B.; Colman, R. W. (1996). Direct evidence for multifacial contacts between high molecular weight kininogen and plasma prekallikrein. **Biochemistry**, 35: 12945 – 12949.
- Lis, H. & Sharon, N. (1972). Soy bean (Glycine Max) agglutinin. **Meth. Enzimol.**, 28: 360 – 365.
- London, F.; Ahmad, S. S.; Walsh, P. W. (1996). Annexin V inhibition of factor IXa – catalyzed factor X activation on human platelet and on negatively – charged phospholipid vesicles. **Biochemistry**, 35: 16886 – 16897.
- Lowry, O. H.; Rosebrough, N. J.; Farr, A.L.; Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.**, 193: 265 – 275.
- Lu, Q.-M.; Yang, J.; Li, D.-S.; Wang, W.-Y.; Xiong, Y.-L. (2000). Characterization of a thrombin-like enzyme from the venom of *Trimeresurus jerdonii*. **Toxicon**, 38: 1225 – 1236.
- Magalhães, A.; Da Fonseca, B. C. B.; Diniz, D. R.; Gilroy, J.; Richardson, M. (1993). The complete amino acid sequence of a thrombin-like enzyme gyroxin analogue from venom of the bushmaster snake (*Lachesis muta muta*). **FEBS Lett.**, 329: 116 – 120.
- Makita, K.; Miura, S.; Shimoyama, T.; Narita, N.; Sakurai, T.; Sugimoto, M.; Yoshioka, A.; Titani, K.; Ruggeri, Z. M.; Fujimura, Y. (1995). Characterization of murine anti-biotrocin monoclonal antibodies. **Int. J. Haematol.**, 61: 276.
- Markland, F. S. & Damus, P. S. (1971). Purification and properties of a thrombin-like from the venom of *Crotalus adamanteus* (Eastern diamond back rattlesnake). **J. Biol. Chem.** 246: 6460 – 6473.
- Markland, F. S. (1991). Inventory of α and β fibrinogenases from snake venom. **Tromb. Haemost.**, 65: 438 – 443.
- Markland, F. S. (1998). Snake venoms and the hemostatic system. **Toxicon**, 36: 1749 – 1800.
- Marrakchi, N.; Barbouche, R.; Guermazi, S.; Karoui, H.; El Ayeb, M. (1997). Cerastotin, a serine protease from *Cerastes cerastes* venom, with platelet-aggregating and agglutinating properties. **Eur J. Biochem.**, 247: 121 – 128.

- Marsh, N. (1994). Inventory of haemorrhagic factors from snake venoms. **Thromb. Haemost.**, 71: 793 – 797.
- Matos, M. F. C. (1993). Agregação de plaquetas induzida por trombina. Ação de calicreína plasmática humana e inibidores de serino proteinases de origem vegetal. São Paulo, **Tese Doutorado** – Universidade Federal de S.P.
- Matsui, T.; Sakurai, Y.; Fujimura, Y.; Hayashi, I.; Oh-Ishi, S.; Suzuki, M.; Hamako, J.; Yamamoto, Y.; Yamazaki, J.; Kinoshita, M.; Titani, K. (1998). Purification and amino acid sequence of halystase from snake venom of *Agkistrodon halys blomhoffii*, a serine protease that cleaves specifically fibrinogen and kininogen. **Eur. J. Biochem.**, 252: 569 – 575.
- Matsui, T.; Fujimura, Y.; Titani, K. (2000).– Snake venom proteases affecting hemostasis and thrombosis. **Biochim. Biophys. Acta**, 1477: 146 – 156.
- McLean, R. L.; Massaro, E. J.; Elliot, W. B. (1971). A comparative study of the homology of certain enzymes in ellapide venoms. **Comp. Biochem. Physiol.**, 39B: 1023 – 1037.
- Meyer, K.; Kiffman, P.; Linker, A. (1960). Hyaluronidases. In : Boyer, P. D.; Lardy, H.; Myrback, K. (ed). **The Enzymes**, vol.4 Academic Press.
- Meyer, D.; Baumgarther, H. R.; Edgington, T. S. (1984). Hybridoma antibodies to human von Willebrand factor. **Meth. Enzymol.**, 104: 441 – 447.
- Moake, J. L.; Turner, N. A.; Stathopoulos, N. A.; Nolasco, L.; Hellums, J. D. (1988). Shear induced platelet aggregation can be mediated by vWF released from platelets, as well as by exogenous large or unusually large vWF multimers, requires adenosine diphosphate and resistant to aspirin. **Blood**, 71: 1366 – 13374.
- Mohri, H.; Fujimura, Y.; Shima, M.; Yoshioka, K.; Houghten, R. A.; Ruggeri, Z. M.; Zimmerman, T. S. (1988). Structure of the von Willebrand factor domain interacting with glycoprotein Ib. **J. Biol. Chem.**, 263: 17901 – 17904.
- Morrissey, J. H.; Neuenschwander, P. F.; Huang, Q.; McCallum, C. D.; Su, B.; Johnson, A. E. (1997). Factor VIIa-tissue factor functional importance of protein-membrane interaction. **Thromb. Haemost.**, 78: 112 – 116.

- Morris, M. F.; Waheed, A.; Risley, J. M.; Etten, V. (1989). Carbohydrate removal fails to eliminate the heterogeneity of human prostatic acid phosphatase. **Clin. Chim. Acta.**, 182: 9 – 20.
- Nachman, R. L.; Levine, R.; Jaffe, E. A. (1977). Syntesis of factor VIII antigen by cultured guinea pig megakaryocytes. **J. Clin. Invest.**, 60: 914 – 921.
- Niewiarowski, S.; MacLan, M. A.; Kloczewiak, M.; Stewart, G. J. (1994). Desintegrins and other naturally occurring antagonists of platelet fibrinogen receptors. **Semin. Hematol.**, 31: 289 – 300.
- Nikai, T.; Ohara, A.; Komori, Y.; Fox, J. W.; Sugihara, H. (1995). Primary structure of a coagulant enzyme, bilineobin, from *Agkistrodon bilineatus* venom. **Arch. Biochem. Biophys.**, 318: 89 – 96.
- Nishida, S.; Fujimura, Y.; Miura, S.; Ozeki, 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.
- Nose, T.; Shimohigashi, Y.; Hattori, S.; Kihara, H.; Ohno, M. (1994). Purification and characterization of a coagulant enzyme, okinaxobinII, from *Trimeresurus okinavensis* (himehabu snake) venom which releases fibrinopeptides A and B. **Toxicon**, 32: 1509 – 1520.
- Nouyang, C.; Teng, C.-M.; Huang, T.-F. (1990). Characterization of snake venom principles affecting blood coagulation and platelet aggregation. **Adv. Exp. Med. Biol.**, 281: 151 – 163.
- Novello, J. C. (1995). Purificação e caracterização de uma proteína (SIII-3rp) do veneno de *Bothrops alternatus* que se liga ao fator de von Willebrand (vWF). **Tese de Doutorado**, IB – UNICAMP.
- Nurden, A. T. (1993). Human platelet membrane glycoproteins. In: Haemost. Thrombosis, (3. ed). **Bloom, A. L.; Forbes, C. D.; Thomas, D. P.; Tuddenham EGD**, Churchill Livingstone, London, pp 115 – 165.

- Oackley, B. R.; Kirsch, D. R.; Morris, N. R. (1980). A simplified ultrasensitive silver stain for detecting proteins in polyacrylamide gels. **Anal. Biochem.**, 105: 361 – 363.
- Okumura, T.; Hasitz, M.; Jamilson, G. A. (1978). Platelet glycolalicin. **J. Biol. Chem.**, 253: 3435 – 3445.
- Otero-Patiño, R.; Cardoso, J. L. C.; Silva, W. D.; Higashi, H. G.; Nuñez, V.; Dias, A.; Toro, M. F.; Garcia, M. E.; Sierra, A.; Garcia, L. F.; Moreno, A. M.; Medina, M. C.; Castañeda, N.; Silva-Diaz, J. F.; Murcia, M.; Cardenas, S. Y.; and Regional Group on Antivenom Therapy Research (Regather) (1997). A randomized blinded comparative trial of three antivenoms in *Bothrops* snake bites in Uraba, Colômbia. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, 58: 183 – 189.
- Ouyang, C.; Teng, C. – M.; Huang, T. – F. (1990). Characterization of snake venom principles affecting blood coagulation and platelet aggregation. **Adv. Exp. Med. Biol.** 281: 151 – 163.
- Ozaki, Y.; Satoh, K.; Yatomi, Y.; Miura, S.; Fujimura, Y.; Kume, S. (1995). Protein tyrosine phosphorylation in human platelets induced by interaction between glycoprotein Ib and von Willebrand factor. **Biochim. Biophys. Acta**, 1243: 482 – 488.
- Ozeki, Y.; Matsui, T.; Hamako, J.; Suzuki, M.; Fujimura, Y.; Yoshida, E.; Nishida, S.; Titani, K. (1994). C-type galactoside binding lectin from *Bothrops jararaca* venom: comparison of its structure and function with those of botrocetin. **Arch. Biochem. Biophys.**, 308: 306 – 310.
- Paine, M. J. I.; Desmond, H. P.; Theakston, D. G.; Crampton, J. M. (1992). Purification, cloning, and molecular characterization of a high molecular weight hemorrhagic metalloprotease, jararhagin, from *Bothrops jararaca* venom. **J. Biol. Chem.**, 267: 22869 – 22876.
- Peng, M.; Lu, W.; Kirby, E. P. (1991). Alboggregin-B: a new platelet agonist that binds to platelet membrane glycoprotein Ib. **Biochemistry**, 30: 11529 – 11536.
- Peng, M.; Lu, W.; Kirby, E. P. (1992). Characterization of three albogregins purified from *Trimeresurus alborablis* venom. **Thromb. Haemost.**, 67: 702 – 707.

- Pirkle, H.; Theodor, I.; Lopez, R. (1989). Catroboxin, a weakly thrombin-like enzyme from the venom of *Crotalus atrox* NH₂-terminal and active site amino acid sequences. **Thromb. Res.**, 56: 159 – 168.
- Pirkle, H. & Stocker, K. (1991). Thrombin-like enzymes from snake venoms: an inventory. **Thromb. Haemost.**, 65: 444 – 450.
- Pirkle, H. & Theodor, I. (1991). Thrombin-like enzymes from snake venoms. In: **Handbook of Natural Toxins**, vol.5, Reptile Venoms and Toxins, ed. Tu, A. T. 225 – 252. Pergamon Press, Oxford.
- Radomski, M. W. & Moncada, S. (1983). An improved method for washing human platelets with prostacyclin. **Thromb. Res.**, 30: 383 – 389.
- Read, M. S.; Smith, S. V.; Lamb, M. A.; Brinkhous, K. M. (1989). Role of botrocetin in platelet agglutination: formation of the activated complex of botrocetin and von Willebrand Factor. **Blood**, 74: 1031 – 1035.
- Read, M. S.; Shermer, R. W.; Brinkhous, K. M. (1978). Venom coagglutinin: An activator of platelet aggregation dependent on von Willebrand factor. **Proc. Natl. Acad. Sci., USA**, 75: 4514 – 4518.
- Sadler, J. E. (1991). von Willebrand factor. **J. Biol. Chem.**, 266: 22777 – 22780.
- Sanchez, E. F.; Santos, C. I.; Magalhães, A.; Diniz, C. R.; Figueiredo, S.; Gilroy, J.; Richardson, M. (2000). Isolation of a proteinase with plasminogen-activating activity from *Lachesis muta muta* (bushmaster) snake venom. **Arch. Biochem Biophys.**, 378: 131 – 141.
- Savage, B.; Sadlir, E.; Ruggeri, Z. M. (1996). Initiation of platelet adhesion by arrest onto fibrinogen or translocation on von Willebrand factor. **Cell**, 84: 289 – 297.
- Scarborough, R. M.; Hsu, M. A.; Teng, W.; Nannizi, L.; Rose, J. W. (1991). Purification and characterization of potent inhibitors of von Willebrand factor binding to glycoprotein (GP) Ib from the venom of the timber rattlesnake, *Crotalus horridus horridus*. **Blood**, 78: 1568 (abstract).
- Schmaier, A. H. (1997). Contact activation: A revision. **Thromb. Haemost.**, 78:101 – 107.

- Serrano, S. M. T.; Mentele, R.; Sampio, C. A. M.; 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.
- Serres, M. H.; Fladmark, K. E.; Doskeland, S. O. (2000). An ultrasensitive competitive binding assay for the detection of toxins affecting protein phosphatases. **Toxicon**, 38: 347 – 360.
- Sharon, N.; & Lis, H. (1993). Carbohydrates in cell recognition. **Sci. Am.**, pp: 74 – 81.
- Sherry, S. (1992). **Fibrinolysis, Thrombosis and Haemostasis. Concepts, Perspectives and Clinical Application**. Malvern, Lea & Febiger, 318 p.
- Shieh, T. C.; Kawabata, S.; Kihara, H.; Ohno, M.; Iwanaga, S. (1988). Amino acid sequence of a coagulant enzyme, flavoxobin, from *Trimeresurus flavoridis* venom. **J. Biochem.**, 103: 596 – 605.
- Shimokawa, K.-I.; & Takahashi, H. (1993). Some properties of a capillary permeability-increasing enzyme 2 from the venom of *Agkistrodon caliginosus* (Kankoku-Manushi). **Toxicon**, 31: 1221 – 1227.
- Sittampalam, G. S.; Ellis, R. M.; Miner, D. J.; Richard, E. C.; Clodfelter, D. K. (1988). Evaluation of amino acid analysis as reference method to quantitate highly purified proteins. **J. Anal. Chem.**, 71: 833 – 838.
- Sixma, J. J.; Zanten, G. H.; Saelman, E. U. M.; Verkleij, M.; Lankhof, H.; Nieuwenhuis, H. K.; Groot, P. G. (1995). Platelet adhesion to collagen. **Thromb. Haemost.**, 74: 454 – 459.
- 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.
- Sobel, M.; Sobel, D.F.; Kermode, J.C.; Harris, R. B. (1992). Localization and characterization of a heparin binding domain peptide of human von Willebrand factor. **J. Biol. Chem.**, 267: 8857 – 8862.

- Stubbs, M.T. & Bode, W. (1995). The clot thickens: clues provided by thrombin structure. **Trends Biochem. Sci.**, 20: 23 – 28.
- Sugiki, M.; Maruyama, M.; Yoshida, E.; Mihara, H.; Kamiguti, A. S.; Theakston, G. (1995). Enhancement of plasma fibrinolysis in vitro by jararhagin, the main haemorrhagic metalloproteinase in *Bothrops jararaca* venom. **Toxicon** 33: 1605 – 1617.
- Suhr, S. M. & Kini, D. S. (1996). Identification of the snake venom substance that induces apoptosis. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 224 (1): 134 – 139.
- Titani, K.; Kumar, S.; Takeo, K.; Ericsson, L. H.; Wade, R. D.; Ashida, K.; Walsh, K. A.; Chopek, M. W.; Sadler, N. E.; Fuyikawa, K. (1986). Amino acid sequence of human von Willebrand factor. **Biochemistry**, 25: 3171 – 3184.
- Toyama, M. H., Soares, A. M., Wen-Hwa, L., Polikarpov, I., Giglio, J. R., Marangoni, S. (2000). Amino acid sequence of piratoxin-II, a myotoxic Lys49 phospholipase A₂ homologue from *Bothrops pirajai* venom. **Biochimie**, 82(3): 189 – 264.
- Tracy, P. B. & Mann, K. G. (1966a). Platelet involvement in coagulation. In: **Platelet Responses and Metabolism**, vol. I, Responses, pp. 297 – 324 (Holmsen, H., Ed.). Boca Raton, FL: CRC Press.
- Tracy, P. B. & Mann, K. G. (1966b). A model for assembly of coagulation factor complexes on cell surfaces: prothrombin activation on platelets. In: **Biochemistry of Platelets**, 295 – 318 (Phillips, D. R. & Schuman, M. A., Eds). Orlando, FL: Academic Press.
- Tu, A. T. (1977). Venoms. **Chemistry and Molecular Biology**, New York – London – Sydney – Toronto, John Willey.
- Tu, A. T. (1996). Overview of snake venom chemistry. **Adv. Exp. Med. Biol.**, 391: 37 – 62.
- Usami, Y.; Fujimura, Y.; Miura, S.; Shima, H.; Yoshida, E.; Yoshioka, A.; Hirano, K.; Suzuki, M.; Titani, K. (1994). A 28 kDa-protein with desintegrin-like structure (jararhagin C) purified from *Bothrops jararaca* venom inhibits collagen and ADP-induced platelet aggregation. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 201: 331 – 339.
- Usami, Y.; Fujimura, Y.; Suzuki, M. Ozeki, Y.; Nishio, K.; Fukui, H.; Titani, K. (1993). Primary structure of two-chain botrocetin; a von Willebrand factor modulator purified from the venom of *Bothrops jararaca*. . **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 90: 928 – 932.

- Utaisincharoen, P.; Mackessy, S. P.; Miller, R. A.; Tu, A. T. (1993). Complete primary structure and biochemical properties of gilatoxin, a serine protease with kallikrein-like and angiotensin-degrading activities. **J. Biol. Chem.**, 268: 21975 – 21983.
- Varanda, E. A. & Giannini, M. J. S. (1994). Bioquímica dos venenos de serpentes. In: Barraviera, B. **Venenos Animais. (1. ed.)** EPUC, Rio de Janeiro, Brasil.
- Veiga, S. S.; Gremski, W.; Santos, V. L. P.; Feitosa, L.; Mangili, O. C.; Nader, H. B.; Dietrich, C. P.; Brentani, R. R. (1999). Oligosaccharide residues of *Loxosceles intermédia* (Brown spider) venom proteins: dependence on glycosylation for dermonecrotic activity. **Toxicon**, 37: 587 – 607.
- Voet, D.; Voet, J. G.; Pratt, C. W. (2000). **Fundamentos de Bioquímica**, trad. Artur Germano Fett Neto *et al*, Porto Alegre: Artes Médicas Sul.
- Ward, C. M.; Vinogradov D.V.; Andrews, R. K.; Berndt, M. C. (1996). Characterization of mocarhagin, a cobra venom metalloproteinase from *Naja mocambique mocambique*, and related proteins from other elapidae venoms. **Toxicon**, 31: 1203 – 1206.
- Weiss, H. J. & Lages, B. (1997). Platelet protombinase activity and intracellular calcium responses in patients with storage pool deficiency, glycoprotein IIb-IIIa deficiency, or impaired platelet coagulant activity. A comparison with Scott syndrome. **Blood**, 89: 1599 – 1611.
- Westermeier, R. (1997). **Electroforesis in practice**, (2. ed.), VCH-Verlag, Weinheim (Federal Republic of Germany).
- Wilkins, M. R.; Pasquali, C.; Appel, R. D.; Ou, K.; Golaz, O.; Sanchez, J. C.; Yan, J. X.; Gooley, A. A.; Hughes, G.; Humphrey-Smith, I.; Williams, K. L.; Hochstrasser, D. F. (1996). From proteins to proteomes: Large-scale protein identification by two-dimensional electroforesis and amino acid analysis. **Biotechnology**, 14: 61 – 65.
- Wittcoff, H. (1951). **The phosphatides**. pp: 99 – 115. Ed. Reinhold Publishing Corporation (new York).
- Yoshida, E.; Fujimura, Y.; Miura, S.; Sugimoto, M.; Fukui, H.; Narita, N.; Usami, Y.; Suzuki, M.; Titani, K. (1993). Alboaggregin-B and botrocetin, two snake venom proteins

- with highly homologous amino acid sequences but totally distinct functions on von Willebrand factor binding to platelets. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 1386 – 1392.
- Zhang, Y.; Wisner, A.; Xiong Y.; Bon, C. (1995). A novel plasminogen activator from snake venom: purification and characterization, and molecular cloning. **J. Biol. Chem.**, 270: 10246 – 10255.
- Zhang, Y.; Wisner, A.; Maroun, R.C.; Choumet, V.; Xiong Y. L.; Bon, C. (1997). Expression and site-directed mutagenesis of *Trimeresurus stejnegeri* snake venom plasminogen activator. **J. Venom Anim. Toxins**, 3: 207.
- Zingali, R. B.; Jandrot-Perrus, M.; Guillin, M.C.; Bom, C. (1993). Bothrosjaracin, a new thrombin inhibitor isolated from *Bothrops jararaca* venom: characterization and mechanism of the thrombin inhibition. **Biochemistry**, 32: 10794 – 10802.
- Zucker, N. B. (1989). Platelet aggregation measured by the photometric method. **Meth. Enzimol.** 169: 117 – 133.