



AUTARQUIA ASSOCIADA À UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

***Moojenina* - UM INIBIDOR PROTÉICO DA
TROMBINA ISOLADO DO VENENO DA SERPENTE
*Bothrops moojeni***

LEONARDO MUSSI DA SILVA

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do Grau de Mestre em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear - Aplicações.

Orientadora:
Profa. Dra. Nanci do Nascimento

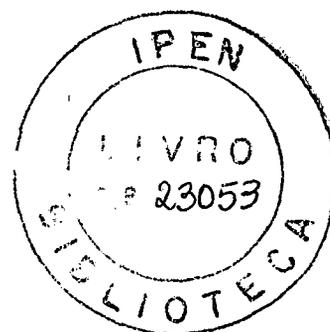
**São Paulo
2005**

AUTARQUIA ASSOCIADA À UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

***Moojenina* – UM INIBIDOR PROTÉICO DA
TROMBINA ISOLADO DO VENENO DA SERPENTE**

Bothrops moojeni

LEONARDO MUSSI DA SILVA



Dissertação apresentada como
parte dos requisitos para obtenção
do Grau de Mestre em Ciências
na Área de Tecnologia Nuclear -
-Aplicações

Orientadora:

Prof^ª. Dra. Nanci do Nascimento

SÃO PAULO

2005

Este trabalho é dedicado aos meus amores **Ondina Soares, Murillo Severino da Silva Filho**, minha avó e meu pai (*in memoriam*) e **Sônia Silêda Mussi**, minha mãe, por andarem sempre de mãos dadas comigo e serem os melhores exemplos de sabedoria, honestidade, respeito e amor.

Anjos da minha vida

Obrigado por tudo!

AGRADECIMENTOS

Emocionado, quero deixar registrado que o *melhor* de ter vindo trabalhar em São Paulo, no Instituto Butantan e especialmente no IPEN, foi o fato de ter conhecido pessoas tão especiais, as quais agora agradeço:

Prof^a. Dra. Nanci do Nascimento que nunca mediu esforços para me ajudar durante o decorrer deste trabalho. A característica mais marcante da minha querida orientadora está na sua irreverência e no seu incomparável bom humor. Obrigado 'Nan' por ter me acolhido incondicionalmente e me inserido em seu grupo de trabalho.

Patrick Jack Spencer, meu amigo e co-orientador.

Certa vez, num congresso da *Sociedade Brasileira de Toxinologia* – (SBTx) em São Pedro – SP em 1999, eu conheci um sujeito com pinta de maluco, cabelo arrepiado, **conhecido e querido por todos** do congresso. Logo nos primeiros minutos de conversa com aquele "*maluco beleza*", já comecei a aprender novidades com relação às toxinas. Depois vim a descobrir que se tratava de um certo gênio da purificação de proteínas e biologia molecular.

Obrigado "*três pra um*", por ter me trazido para a toxinologia e me ensinado, dentre inúmeras outras coisas, que para se fazer pesquisa é necessário ser mais maluco do que eu já era. Obrigado "*fi*", pela sua notável irreverência, pelas nossas viagens pro Rio e principalmente pela sua essencial ajuda no laboratório sem a qual este trabalho não existiria.

Patrick ... "*I feel good*" ...!

Obrigado por tudo!

Obrigado **Tânia Rúbia** e demais integrantes do Laboratório de Hemostasia, do Hospital das Clínicas de São Paulo que lá, pacientemente, me ajudaram com os testes de agregação plaquetária e coagulação.

Prof^a. Dra. Maria Aparecida P. Camillo. “Cidinha” também é uma pessoa com um bom humor invejável. Sempre brincava com ela chamando-a de “tia” para provocá-la, mas ela SEMPRE levava na brincadeira e nunca se chateou... assim nem tem graça. Cida saiba que só se brinca assim com quem a gente gosta muito. Obrigado por ter me dado a chance de ser seu amigo. Obrigado pelos reagentes!

João Ezequiel de Oliveira “Jhonny Boy” - por toda ajuda e paciência com as purificações e muito mais que isso, *pela amizade e todas as conversas de bar* as quais sempre renderam ótimas idéias com relação às novas diretrizes para o meu trabalho. Obrigado por tantas vezes ter me acolhido em sua casa. Obrigado pelos conselhos.

Prof. Dr. João Luiz Costa Cardoso que foi quem começou tudo isso quando no 3º *Seminário Nacional de Zoonoses e Animais Peçonhentos* em Guarapari – ES, 1998, convidou-me a fazer um estágio no Hospital Vital Brazil do Instituto Butantan, deixando-me hospedado na enfermaria. Graças a ele pude observar e acompanhar inúmeros casos de acidentes. Doutor João Luiz consegue ser ao mesmo tempo extremamente simples e uma das maiores autoridades do mundo no tratamento de acidentes por animais peçonhentos.

Prof. Dr. Francisco Oscar de Siqueira França por me receber sempre tão bem no Hospital Vital Brazil. “Chico”, obrigado pelas nossas conversas no Hospital as quais me foram muito proveitosas.

Profª. Dra. Marisa Manzoncini de Azevedo-Marques por “emanar conhecimento” e passá-lo de forma clara, objetiva, além de conquistar a todos com seu carisma. Junto com Dr. João Luiz é também um dos maiores nomes da toxilogia e tratamento dos acidentados por animais peçonhentos que conhecemos. Uma cientista sem precedentes! Obrigado pela estimulante e belíssima dedicatória no livro *“Animais Peçonhentos no Brasil”*.

Prof. Dr. José Carlos de Freitas “Zé Freitas” como gosta de ser chamado. Sinto orgulho em ser seu amigo e poder te encontrar num mercado e ouvir os conselhos sobre a Austrália de quem tem **trinta anos como professor da USP**. Freitas, obrigado por dirigir **a melhor disciplina** que eu pude cursar em todo o mestrado! Obrigado por proporcionar à turma, a chance única de conhecer e mergulhar ao redor da **Ilha de Alcatrazes** em São Sebastião - SP. Indescritível, inesquecível!

José Alberto Alves da Silva, carinhosamente chamado por nós do laboratório de “Troxa”. Por ser extremamente tímido, acredito que o Alberto tenha dificuldade de expressar seus sentimentos por quem ele goste muito, a menos que seja a IRA! Virei analista agora? Obrigado Alberto por tantas e tantas vezes ter me defendido quando eu não estava presente! Você é REALMENTE um grande amigo!

Murilo Casare, o químico ocioso (assim denominado pelo Alberto) que de ocioso não tem nada sendo um dos alunos que mais produz. Quero vê-lo cheio de alunos (alunas de preferência). Obrigado MOM, por ter sido tão amigo, por ter compartilhado tantas risadas e ter me ajudado em experimentos no laboratório.

Janáina Baptista Alves por ter ouvido as minhas histórias intermináveis. Para quem não sabe, a Jana é especialista em “achar” as suas “porcarias” que você esqueceu na bancada e devolvê-las. Esqueceu na bancada? Vai parar na sua mesa! Agora, como ela descobre que foi você? Obrigado pela amizade Jana.

Renan Fernandes Loureiro - "*Renan san*" ou "oráculo". Poucas pessoas conhecem o Renan tão bem quanto eu e vice-versa. Esse meu amigo é um guerreiro e batalhador pelos seus ideais. Renan sempre esteve comigo nas horas mais divertidas e nas mais tristes também. Acredito ter valido a pena tê-lo "arrastado" para fazer o mestrado em São Paulo, não? Obrigado Renan por ter sido "meu irmão" por todos esses anos. Caro "*Renanzinho das Candôngas*", você gosta de jogar "Diablo"? Porque você não aprende então?

Agradeço a amizade dos meus colegas de trabalho, Solange Gubbelini (Sol), André Baceti, Rosa M. Chura Chambi, Danielle Borim Rodrigues, Tais L. de Oliveira, Felipe Lino, Juliana Lully, Willian Sato, Camila Yonamine, Natália Malavasi, Lucélia Campos, Fátima Klingbeil, Prof^a. Dra. Olga Higa, Prof^a. Dra. Lígia Morgante F. Dias, José Maria de Souza, Claudia Cecchi, Fernanda Izilda, Fernanda Mendonça, Adriana Ozaki, Prof^a. Dra. Kayo Okazaki, Prof^a. Dra. Teresa Ribela, Prof. Dr. Carlos Soares, Prof. Dr. Paolo Bartolini, Prof^a Dra. Cibele Peroni, Miriam Suzuki, Prof^a Dra. Márcia Silva, Dra. Andréa Rodas, Rute Batista, Eduardo Moura, Neide Mascarenhas, Genivalda, Sr. Longino, Elenice "Nice", Calixto e Cícero e Luís Antônio Lobo "leão lobo".

Ao amor e carinho dos meus tios **Alfredo** e **Imaculada** e meus primos queridos **Beatriz** e **Neto**. Aos primos **Alexandre**, **Patrícia** e **Fernanda Calvente**. Aos meus irmãos **Marcos Pereira** (*in memorian*), **Murilo S. Neto** e ao amor da minha vida: minha irmã **Lenise!**

Agradeço a **Elisângela Teixeira** por ter sido a melhor companhia em São Paulo. Obrigado pelo carinho, amizade e por ter permitido que eu fizesse parte de sua vida para sempre.

Agradeço a Comissão de Pós Graduação, em especial a Ilze Puglia pela eficiência em todos os processos burocráticos e pela amizade.

Aos mineiros (as) ou cariocas

O autor "mineiroca", pelo amor e amizade incondicional, agradece à: **Simone Gomes Nunes, Juliana Vargas** (minha melhor amiga), **João Rodrigues** (melhor amigo), **Victória e Luciana Schetino, Wladmir B. Barbosa, Stella Silveira Cunha, Fabiane Brandão Capella, Rodolfo C. Oliveira, Felipe Batalha, Cristina España, Leila Abboud e Antônio Marmo** (meu segundo pai) e à algumas outras poucas pessoas que acreditaram em mim.

Saibam que depois da minha família, vocês mineiros (as) ou cariocas, são algumas das pessoas mais importantes na minha vida!

Obrigado por tudo!

Leonardo Mussi da Silva

*“... Don't be afraid to be weak
Don't be too proud to be strong ...
... Don't care what people say
Just follow your own way
Don't give up
And use the chance
To return to innocence”.*

Michael Cretu

***Moojenina* – UM INIBIDOR PROTÉICO DA TROMBINA ISOLADO DO VENENO DA SERPENTE**

Bothrops moojeni

Leonardo Mussi da Silva

RESUMO

Os venenos das serpentes da família *Viperidae* são compostos por inúmeras proteínas com atividade proteolítica. Várias dessas proteínas possuem atividade sobre a coagulação sangüínea durante o processo de envenenamento de suas vítimas. Algumas serpentes do gênero *Bothrops*, distribuídas por todo o Território Nacional, possuem proteínas com atividade anticoagulante por inibirem trombina, protrombina ou agregação plaquetária. No presente trabalho foi demonstrado que no veneno da serpente *Bothrops moojeni* existe uma proteína com atividade anticoagulante. A nova proteína isolada recebeu o nome de "moojenina" e foi purificada por cromatografia de afinidade à trombina, seguida de troca iônica Mono Q ou exclusão molecular. Testes revelaram que a "moojenina" inibe a trombina em sua atividade pró-coagulante e pró agregante plaquetária e é desprovida de atividade esterásica sobre substrato TAME. A análise eletroforética mostrou que a "moojenina" tem massa molecular semelhante àquela descrita para botrojaracina, o mais potente inibidor da trombina, isolada de veneno da serpente *Bothrops jararaca*. Foi demonstrado que proteínas botrojaracina-símile são largamente distribuídas em venenos

botrópicos.

***Moojenin* – A PROTEIC THROMBIN INHIBITOR ISOLATED FROM THE *Bothrops moojeni* SNAKE VENOM**

Leonardo Mussi da Silva

ABSTRACT

Many snakes from the family *Viperidae* have enzymes with proteolytic activity, many of them acting on haemostatic system. Many of these proteins activate the coagulation cascade. Some snakes from the *Bothrops* genus display proteins with anticoagulant activity, inhibiting thrombin, prothrombin and platelet aggregation. In the present work we purified "moojenin", a new anticoagulant agent from the venom of the Brazilian pit viper *Bothrops moojeni*. "Moojenin" was purified from pooled *Bothrops moojeni* venom using affinity chromatography on the CNBr 4B Sepharose-thrombin column followed by ion exchange or size exclusion chromatography. "Moojenin" was able to inhibit thrombin induced platelet aggregation as well as coagulation. "Moojenin" did not show esterase activity on TAME substrate. On SDS-PAGE analyses, "moojenin" showed similar molecular mass to bothrojaracin, the most potent thrombin inhibitor from *Bothrops jararaca* snake venom. It has been shown that bothrojaracin-like proteins are widely distributed among *Bothrops* venoms.

SUMÁRIO

	Página
1 - INTRODUÇÃO	1
1.1 - Atividade coagulante	5
1.2 - Inibidores da coagulação sanguínea	8
1.3 - <i>Bothrops moojeni</i>	9
2 - OBJETIVOS	11
3 - MATERIAL E MÉTODOS	12
3.1 - Confeção da coluna de trombina	12
3.2 - Cromatografia por afinidade	13
3.3 - Cromatografia por troca iônica	14
3.4 - Cromatografia Líquida de Alto Desempenho	15
3.5 - Dosagem protéica	16
3.6 - Eletroforese em gel de poliacrilamida 12%	16
3.7 - Agregação plaquetária	19
3.8 - Atividade esterásica	20
3.9 - Tempo de trombina	20
4 – RESULTADOS	22
4.1 - Confeção da coluna de trombina	22
4.2 - Cromatografia por afinidade	22
4.2.1 – Efeito da temperatura na interação das proteínas do veneno	24
com a resina	
4.3 – Cromatografia por troca iônica	25
4.4 – Cromatografia Líquida de Alto Desempenho	27
4.5 – Dosagem protéica	29
4.6 - Eletroforese em gel de poliacrilamida 12%	30
4.7 – Recromatografia do pico referente à “moojenina”	33

4.8 - Agregação plaquetária	35
4.9 - Tempo de trombina – T T.....	40
4.10 – Atividade esterásica	42
5 – DISCUSSÃO	43
6 – CONCLUSÕES	50
7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	51

1 - INTRODUÇÃO

O temor pelas serpentes - bem como a outros animais peçonhentos - encontra-se impregnado no imaginário popular, muito embora esse medo não tenha sido suficiente para motivar medidas eficientes no controle dos acidentes por eles provocados (*apud* CARDOSO *et al*, 2003). Deve-se a José de Anchieta lugar de destaque pelo registro original e pioneiro, com enfoque de conotações “clínico-epidemiológicas”, na célebre e sempre citada carta de 1560, escrita em São Vicente:

“[...] E em primeiro lugar há diversos gêneros de cobras venenosas. Umam chamam-se jararaca, muitíssimo freqüentes nos campos, nos matos e nas próprias casas, onde não raro as encontramos e cuja mordedura mata no espaço de vinte e quatro horas [...] se foram mordido uma só vez e escapam à morte, mordidos daí por diante, não só não correm risco de vida, como até sentem menos dor [...]” (ANCHIETA, 1958).

As serpentes são os animais mais mistificados do mundo. Aparecem na Bíblia como indutoras do pecado original. Surgem daí, inúmeras lendas envolvendo estes animais. As lendas estendem-se ainda para os acidentes ofídicos. Aplicar folha de fumo ou estrume de vaca no local da picada, fazer torniquetes, tentar (sem sucesso) sugar o veneno são práticas quase sempre utilizadas pelos acidentados. Tudo isso apenas piora a saúde do paciente e atrasa o tratamento correto que é a soroterapia heteróloga (AZEVEDO-MARQUES, 2001; BRAZIL, 1903; FRANÇA, 1997).

O soro antiofídico é produzido a partir de imunoglobulinas de cavalos imunizados com venenos. A radiação ionizante com ^{60}Co atenua ou cessa os efeitos tóxicos dos venenos não prejudicando a produção nem a eficiência na produção dos

anticorpos quando estas toxinas são inoculadas em animais (NASCIMENTO,1995; NASCIMENTO *et al*, 1996; SPENCER, 1995).

Os pacientes acometidos, geralmente, são trabalhadores rurais. Medidas de prevenção tais como calças compridas e botas poderiam ajudar a diminuir o número de casos, uma vez que mais de 70% dos acidentes ocorrem abaixo do joelho (BRASIL, 1998).

Por sua dimensão continental, o Brasil possui uma heterogeneidade de habitats, o que leva a significativa diversidade de espécies de serpente, aracnídeos, insetos e peixes, muitos de importância médica por produzirem toxinas (PUORTO, 2005)

Cerca de 20.000 acidentes ofídicos ocorrem todos os anos no Brasil causados por quatro gêneros de serpentes peçonhentas. O Ministério da Saúde informa que 90,5% destes acidentes envolvem as serpentes do gênero *Bothrops* (jararacas), 7,7% dos acidentes são causados por *Crotalus* (cascavéis). As serpentes do gênero *Lachesis* (surucucus) são responsáveis por 1,4% dos acidentes e finalmente 0,4% dos acidentes correspondem àqueles causados pelas serpentes do gênero *Micrurus* (corais verdadeiras). O índice de letalidade no Brasil é de 0,4% (BRASIL, 1998).

Os venenos ofídicos são constituídos por uma grande diversidade de componentes químicos, tais como proteínas e peptídeos e, em menores concentrações, carboidratos, lipídeos, nucleotídeos, aminoácidos e componentes inorgânicos. A toxicidade dos venenos ofídicos é promovida por proteínas e enzimas que estão diretamente relacionadas com a alimentação e defesa da serpente, promovendo imobilização, morte e, na maioria das vezes, o início do processo digestivo da presa (BARRAVIERA, 1994).

Serpentes do gênero *Bothrops*, popularmente conhecidas como jararaca, jararacuçu, urutu, caiçaca, dentre vários outros nomes populares, possuem na constituição de seus venenos uma gama bastante diversa e complexa de componentes que atuam no sistema hemostático. Atribuem-se aos venenos dessas serpentes as atividades proteolítica, hemorrágica e coagulante .

A atividade proteolítica ou inflamatória (figura 1) provoca manifestações locais de edema, dor, eritema, equimoses, bolhas e necrose (BRASIL, 1998). A atividade hemorrágica do veneno botrópico é decorrente da presença de metaloproteases (enzimas que contém Zn) responsáveis pela degradação da membrana basal das células endoteliais (QUEIROS *et al*, 1985).

Acidente botrópico



Figura 1. Fase evolutiva de acidente botrópico: picada no tornozelo há 2 dias com edema extenso e equimose. (Gentilmente cedido por Dr. João Luiz C. Cardoso – Hospital Vital Brazil, Instituto Butantan. Foto: Acervo Hospital Vital Brazil / Instituto Butantan).

Inúmeros animais peçonhentos, de diferentes regiões da Terra, possuem, na composição de seus venenos, substâncias capazes de provocar alterações do sistema hemostático. Das diversas atividades farmacológicas dos venenos, as que atuam sobre a hemostasia sempre suscitaram maior interesse nos pesquisadores, quer pela possibilidade de aplicação terapêutica e diagnóstica, quer pela importância dos envenenamentos ofídicos (KAMIGUTI & CARDOSO, 1989).

Os mecanismos fisiopatológicos pelos quais os venenos causam distúrbios hemostáticos são variados e complexos. Contudo, os componentes dos venenos podem ser agrupados segundo as atividades que exercem sobre o mecanismo hemostático. Assim, aquelas toxinas que atuam na coagulação podem ser classificadas como coagulantes e anticoagulantes (*apud* CARDOSO *et al*, 2003). As toxinas que agem diretamente sobre as plaquetas podem ser classificadas em agregantes e antiagregantes plaquetárias. Finalmente, aquelas que causam lesão vascular são denominadas fatores hemorrágicos ou hemorraginas (MOURA da SILVA *et al*, 1996). Muitas vezes uma mesma toxina pode apresentar mais de uma atividade sobre a hemostasia.

1.1 - ATIVIDADE COAGULANTE

Os venenos que possuem a capacidade de ativar fatores da coagulação sangüínea e de formar um coágulo visível *in vitro* (figura 2) são tidos como coagulantes. Genericamente, os componentes que ativam os fatores da cascata da coagulação podem ser classificados como ativadores do tipo pró-coagulante ou como ativadores do tipo trombina-símile (CASTRO *et al*, 2001).

Entendem-se como ativadores do tipo pró-coagulantes os componentes do veneno que clivam o fator X ou fator II (protrombina) da cascata de coagulação, gerando trombina, que por sua vez hidrolisa o fibrinogênio em fibrina . No entanto, os ativadores do tipo trombina-símile são aqueles que clivam diretamente o fibrinogênio em fibrina, sem a necessidade de geração de trombina (BRAUD *et al*, 2000).

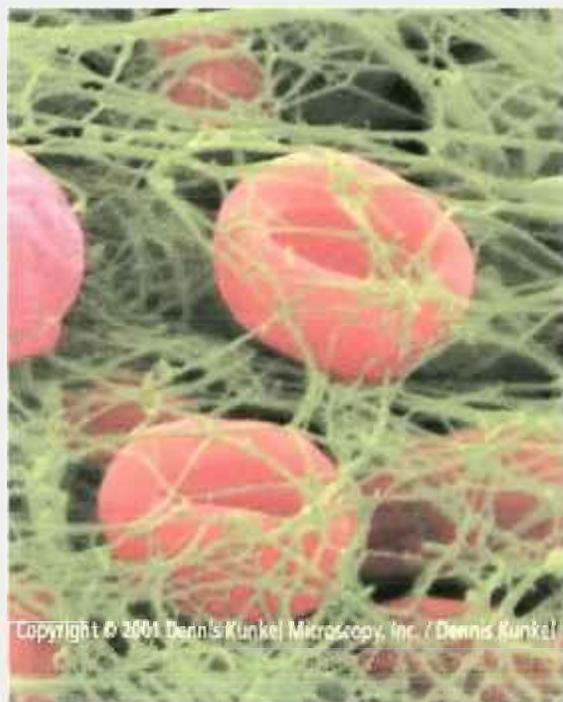


Figura 2: Microfotografia mostrando a rede de fibrina (em verde) e hemácias retidas (em vermelho) caracterizando o coágulo. Foto: Dennis Kunkel Microscopy, Inc.\ Dennis Kunkel 2001.

A cascata da coagulação pode ser ativada pelos venenos das seguintes formas: (1) promovendo a conversão do fator X em fator Xa; (2) conversão de protrombina em trombina, na ausência de fator V (ativação direta); (3) conversão de protrombina em trombina, na presença de fator V (ativação indireta) e (4) conversão de fibrinogênio em fibrina (atividade trombina símile) (AMARAL *et al*, 1980; DENSON, 1969; DENSON & ROUSSEAL, 1970; NAHAS *et al*, 1979; OUYANG *et al*, 1987).

A coagulopatia de consumo ocorre quando o fibrinogênio é clivado em fibrina pela gradativa absorção do veneno pela circulação sangüínea. A fibrina formada prontamente ativa o sistema fibrinolítico que promove a degradação da mesma. A deposição de microtrombos formados pode ocorrer nos capilares glomerulares e contribuir para o quadro de Insuficiência Renal Aguda (IRA). Dentre os vários fatores que desencadeiam a Insuficiência Renal Aguda (IRA) estão ainda o seqüestro de líquidos para o local da picada no acidente botrópico e laquétrico, substâncias vasoativas, vômitos, desequilíbrio hidreletrolítico e nefrotoxicidade direta. Este fato desencadeia os quadros clínicos de oligúria, anúria e posteriormente Insuficiência Renal Aguda (IRA), principal *causa mortis* dos pacientes (AMARAL *et al*, 1986; AZEVEDO-MARQUES *et al*, 1985; CARDOSO *et al*, 2003).

Os distúrbios da coagulação podem, de forma sinérgica, agravar os sintomas de hemorragias, tanto locais quanto sistêmicas (OUYANG *et al*, 1987). A trombocitopenia observada *in vivo* pode ser decorrente da Batroxobin, uma proteína com atividade agregante plaquetária na presença de fator de von Willebrand (KAMIGUTI *et al*, 1986; READ *et al*, 1978). Os pacientes acometidos por acidentes ofídicos envolvendo serpentes dotadas de veneno com atividade sobre as plaquetas,

geralmente apresentam uma importante queda no número de plaquetas (plaquetopenia), fato que é revertido após a administração do soro (CARDOSO, J.L.C.; 2003)

A tabela abaixo mostra algumas proteínas com atividade sobre o fibrinogênio, isoladas do veneno de serpentes.

Tabela 1: Principais serinoproteases isoladas do veneno de serpentes

Ancrod - <i>Calloselasma hodostoma</i>	Fibrinogênio (A, [B])* , fator XII
Batroxobin - <i>Bothrops atrox</i>	Fibrinogênio (A, [B]), fator XII
Bilineobin - <i>A. binlineatus</i>	Fibrinogênio (B, [A])
Bothrobin - <i>B. jararaca</i>	Fibrinogênio (A), fator VIII
Calobin - <i>C. atrox</i>	Fibrinogênio (A, [B])
Crotalase - <i>C. adamanteus</i>	Fibrinogênio (A, [B])
Flavoxobin - <i>Trimeresurus flavoviridis</i>	Fibrinogênio (A)
Giroxina símile - <i>Lachesis muta</i>	Fibrinogênio (A, [B])
TM-VIG - <i>T. mucrosquamatus</i>	Fibrinogênio (A)

* Entre parênteses, principal fibrinopeptídeo liberado do fibrinogênio. Entre colchetes, fibrinopeptídeo liberado em menor velocidade. Modificada de MATSUI *et al.*, (2000).

1.2 - INIBIDORES DA COAGULAÇÃO SANGÜÍNEA

Inibidores de proteases estão presentes em venenos ou ainda no plasma de serpentes. Arni e colaboradores (2004) isolaram e cristalizaram uma proteína denominada BmjMIP, oriunda do plasma de *B. moojeni*, capaz de neutralizar algumas atividades enzimáticas, tóxicas e farmacológicas de várias fosfolipases ácidas e básicas dos venenos de *B. moojeni*, *B. pirajai* e *B. jararacussu*.

Foi demonstrado por ZINGALI e colaboradores (1993) que a botrojaracina, uma proteína de 27 kDa e pertencente à família das lectinas do tipo C, é capaz de inibir 50% da atividade da trombina em agregar plaquetas, numa concentração relativamente baixa (0,06 µg/mL), sendo o mais importante inibidor da coagulação sangüínea, proveniente do veneno de serpente estudado até hoje.

A botrojaracina é uma proteína ácida (pI = 4,2) purificada do veneno de *B. jararaca* que forma um complexo não covalente com a trombina. A botrojaracina inibe a atividade da trombina sobre fibrinogênio, fator V, plaquetas, a ativação da proteína C, a ligação da trombina com a trombomodulina e o complexo antitrombina-heparina (AROCAS *et al*, 1996; ZINGALI *et al*, 1993). A botrojaracina também se liga à protrombina e inibe a trombina ligada ao coágulo. Diversas isoformas da botrojaracina foram descritas para o veneno de *Bothrops jararaca* (MONTEIRO *et al*, 1997 e 1998).

CASTRO e colaboradores (1999) isolaram e identificaram, no veneno da serpente *Bothrops alternatus* (urutu), um novo inibidor da coagulação. A botralternina é uma proteína com 95% de homologia à botrojaracina nos primeiros 25 aminoácidos analisados. Com 27 kDa de massa molecular, a botralternina é também uma lectina

com capacidade de inibir a atividade da trombina, ligando-se ao exossítio da mesma. Contudo, a botralternina mostra-se menos eficiente que a botrojaracina na capacidade de inibir a trombina com um IC 50 de 0,19 μ g/mL (CASTRO *et al*, 1998).

Componentes ativadores da proteína C foram descritos para os venenos de *Bothrops moojeni* e *Bothrops pradoi*, atuando como agentes anticoagulante, uma vez que a proteína C ativada inibe os fatores V e VIII ativados e também a trombina (STOCKER, 1996). Frações isoladas dos venenos de algumas serpentes *Bothrops sp* podem inibir a coagulação sangüínea ou agregação plaquetária (ANDREWS *et al*, 2004). Algumas proteínas com esta propriedade foram isoladas do veneno de *Bothrops jararaca* e *Bothrops alternatus*, contudo, pouco se conhece sobre qualquer inibidor da trombina presente no veneno de *Bothrops moojeni*.

1.3 - *Bothrops moojeni*

Durante a construção de Brasília (DF), foram capturados inúmeros espécimes de *Bothrops moojeni* e remetidos ao Instituto Butantan, propiciando sua identificação como uma espécie nova. Trata-se da principal espécie de *Bothrops* dos cerrados do Brasil central, distribuindo-se desde o Paraná até o Maranhão (FURTADO, M.F.; 1987). É uma das poucas espécies que tem crescido em importância médica, pois consegue se adaptar bem aos ambientes modificados pelo homem, além de apresentar comportamento extremamente agressivo e ter um porte avantajado podendo, os exemplares adultos, superar 1,5 m de comprimento (figura 3).



Figura 3: *Bothrops moojeni*

Foto: L. Mussi



Distribuição geográfica da
Bothrops moojeni

Sabe-se que a trombina constitui a principal enzima da cascata de coagulação além de estar envolvida no desenvolvimento de processos patológicos como a inflamação (SUO *et al*, 2004). Distúrbios na produção normal de trombina podem gerar quadros tromboembólicos. Como já demonstrado na literatura, algumas serpentes possuem, na constituição de seus venenos, proteínas capazes de inibir a atividade da trombina ou mesmo evitar a sua formação a partir da protrombina (ZINGALI *et al*, 1993; MONTEIRO & ZINGALI, 2000).

É cada vez maior a procura por fármacos com a propriedade de modular a formação de trombos, principalmente àqueles que evitam sua formação. Assim pesquisas que buscam por componentes de venenos, envolvidos no processo de coagulação, poderá contribuir sobremaneira para uma mudança substancial na sobrevivência dos pacientes vítimas dos acidentes tromboembólicos.

2 - OBJETIVOS

Os objetivos deste trabalho visam:

- Pesquisar, no veneno da serpente *Bothrops moojeni*, componentes com capacidade de inibir a atividade da trombina em formar trombos ou agregar plaquetas.
- Obtenção da proteína pura através de processos cromatográficos.
- Realizar testes de agregação plaquetária e Tempo de Trombina (TT) para avaliar a atividade biológica da proteína.

3 - MATERIAL E MÉTODOS

3.1 - Confeção da coluna de trombina

Para a realização da purificação de um inibidor da trombina optou-se como primeiro passo, o processo cromatográfico por afinidade àquela proteína. Assim, a primeira ação foi a de acoplar a trombina à resina adequada, para então dar início ao processo de purificação.

Para tanto, foram pesados 10g de resina Sepharose 4B CNBr e esta foi inchada em HCl 1mM por 1 hora rendendo cerca de 12 mL de gel. A resina foi ativada com uma lavagem da mesma solução de HCl por 1 hora. Uma vez ativada, a resina foi ambientada em tampão fosfato 50mM, pH 8,0.

Equilibrada a resina, o tampão foi substituído pela solução de trombina. Foram pesados 65 mg de trombina (Sigma). Em seguida a trombina foi dissolvida em 25 mL de *Phosphate Buffer Saline* (PBS). Antes da adição à resina, a solução de trombina teve sua absorvância mensurada em comprimento de onda a 280 nm para comparação dos valores antes e após o acoplamento da proteína à resina Sepharose.

A trombina foi adicionada à resina e incubada durante 12 horas no *rotator* à temperatura de 4° C. Para preencher possíveis sítios ativos da resina foi utilizado um tampão com grupamento amina. Para tanto foi preparado um tampão contendo 50mM de glicina em pH 7,5 e adicionado à solução da resina contendo trombina por 1 hora no *rotator* (cerca de 20 mL da solução).

Após a adição da glicina e incubação por 1 hora no *rotator* em geladeira a 4°C, a solução foi colocada em repouso para a sedimentação da resina e posterior remoção do sobrenadante e substituição do mesmo por 30 mL de PBS. O empacotamento ocorreu de forma lenta para evitar o surgimento de bolhas. A solução com a resina foi elevada para um volume maior (de 30 para 100 mL) também para evitar a formação de bolhas. Após o empacotamento foram passados 3 vezes o volume da coluna com tampão A: tris HCl 20 mM + 150 mM NaCl pH 7,5, quando a coluna foi armazenada em geladeira a 4°C.

3.2 - Cromatografia por afinidade

O veneno total de *Bothrops moojeni* (100 mg) foi solubilizado com tampão A (tris HCl 20 mM +150 mM NaCl, pH 7,5) e passou por um pré-tratamento com inibidor de metaloproteases (ácido etilenodiamino tetracético – EDTA 8 mM) e inibidor de serinoproteases (fenilmetilsulfonil fluoreto – PMSF 5 mM) como descrito por AROCAS *et al* (1996) para evitar a clivagem da trombina acoplada à resina pelas enzimas do veneno. Em seguida a solução foi centrifugada a 14000 RPM a 600g por 5 minutos para retirada de material insolúvel e o sobrenadante aplicado na coluna de trombina (Sepharose CNBr 4B – trombina). O veneno aplicado permaneceu incubado na coluna por 2 horas à temperatura ambiente. O produto não retido pela coluna foi eluído com a adição de tampão A, sendo utilizados 3 vezes o volume da coluna.

As frações com afinidade foram eluídas com uma redução do pH de 7,5 para pH 2,0 com uma solução HCl 0,01N e 0,5M de NaCl. As frações foram coletadas em tubos com volume de 1 mL /tubo e imediatamente neutralizadas com 100 µl de tris 1M pH 8,0. A absorvância a 280 nm foi obtida através da leitura das frações em um espectrofotômetro (Pharmacia, Ultrospec III). Os tubos contendo a fração inibitória da trombina foram reunidos e dialisados contra PBS ou contra água por 12 horas a 4°C. Após este processo a fração foi congelada a -80 C° e liofilizado. As amostras dialisadas contra PBS foram utilizadas para avaliar atividade biológica.

3.3 – Cromatografia por troca iônica

Foram pesadas 30 mg da terceira fração proveniente da cromatografia de afinidade. Esta massa de proteína foi ressuspendida em 1,2 mL e injetada em uma coluna de troca iônica Mono Q. A resina possui carga positiva, assim retém proteínas com carga negativa. O tampão A constituía-se de (Tris HCl 50 mM pH 8,0). Após dez minutos o tampão B (Tris HCl 50 mM + 1M NaCl pH 8,0) foi introduzido e chegou a concentração de 50% em 45 mL. O coletor foi programado para 1mL/tubo.

3.4 – Cromatografia Líquida de Alto Desempenho

(High Performance Liquid Chromatography – HPLC)

A coluna CNBr Sepharose-trombina foi utilizada para pré purificar as frações com afinidade por trombina, onde foram produzidos três picos (figura 3). O terceiro pico, proveniente daquela coluna, promoveu a melhor atividade biológica ao inibir trombina. Este pico foi submetido à cromatografia por exclusão molecular em coluna TSK – 3000 no sistema HPLC. A resina da coluna era constituída de microporos o que faz com que proteínas com pequena massa molecular e peptídeos entrem em vários desses poros e sofram assim, atraso. Proteínas com maior massa molecular não entram nos poros, não sofrem atraso e assim são eluídas mais rapidamente. Conseqüentemente os primeiros picos do cromatograma são referentes às proteínas com maior massa molecular e os últimos picos, às proteínas com menor massa molecular ou peptídeos.

O tampão utilizado para esta cromatografia foi bicarbonato de amônio 50 mM, pH 7,0. Cerca de 3 mg de massa do terceiro pico da coluna de trombina foram ressuspêndidos em 250 µL do tampão supracitado e aplicados em coluna TSK 3000 no sistema HPLC

3.5 - Dosagem protéica

A concentração protéica das amostras provenientes da cromatografia por afinidade e troca iônica foi determinada através do método de Bradford (1976). Tal método baseia-se na capacidade das proteínas de interferir com a absorvância do corante *Coomassie Brilliant Blue* (CBB) G-250 em meio altamente ácido, resultando em modificação proporcional da cor, detectável em 595 nm. O reagente utilizado nesse método consiste de uma mistura de *Coomassie Brilliant Blue* (CBB) G-250, etanol absoluto, ácido fosfórico e H₂O destilada.

Para a curva padrão fez-se uma diluição seriada de albumina bovina 1mg/mL em solução salina, obtendo as diluições 1:2, 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32. Para a realização da curva padrão, foram acrescentados 100 μ L das amostras de albumina em 3mL do reagente, em duplicatas. Os dados da curva padrão foram ajustados por regressão linear e a equação $y = ax + b$, foi utilizada para calcular a concentração protéica das amostras, sendo (y) a densidade óptica, (x) a concentração protéica, (a) o coeficiente angular da reta e (b) o coeficiente linear.

3.6 - Eletroforese em gel de poliacrilamida 12%

Foi feita uma análise em *Sodium Dodecil Sulfato - Poliacrilamide Gel Electrophoresis* (SDS-PAGE) segundo o método descrito por Laemmli (1970) para determinar o conteúdo protéico dos picos obtidos do fracionamento pela coluna de trombina e troca iônica e, assim estimar o peso molecular das proteínas das frações.

As amostras e padrões de peso molecular foram desnaturadas em tampão de amostra (Tris HCl 0,08M, SDS 2%, glicerol 10%, azul de bromofenol 0,001%, 50% v/v) a 85°C por aproximadamente 5 minutos. O azul de bromofenol foi utilizado como traçador e permitiu acompanhar a evolução da eletroforese.

Tabela 2 - Soluções e reagentes utilizados no preparo do gel de poliacrilamida.

Soluções	Resolução (gel 15%)	Empilhamento (gel 3.5%)
Solução A/B	7,5 mL	3,4 mL
Tampão resolução	3,8 mL	-
Tampão empilhamento	-	0,63 mL
Água destilada	3,5 mL	3,4 mL
Solução PA 10%	0,15 mL	0,05 mL
TEMED	0,006 mL	0,005 mL
SDS	0,15 mL	0,05 mL

Relação dos reagentes utilizados para produção do gel de poliacrilamida com SDS: **A/B** Acrilamida 30%, Bisacrilamida 0,8%, em água destilada; **PA** persulfato de amônio a 10% em água destilada. Reagentes: **Tampão de resolução** Tris HCl 1,5M, pH 8,8 contendo 1% de SDS; **Tampão de empilhamento** Tris HCl 1M, pH 6,8 contendo 1% de SDS; **SDS** dodecil sulfato de sódio; **TEMED** N,N,N',N'-tetrametiletilenediamida (Sigma Chemical Co, USA).

Tabela 3 - Padrões protéicos utilizados para a curva de calibração de peso molecular em SDS-PAGE.

Proteínas	Peso Molecular (Daltons)
Soro albumina bovina	66.000
Anidrase carbônica	29.000
Citocromo C	12.400

Foram aplicados 20 μ g de massa protéica em cada poço do gel. Para a corrida da eletroforese, foi utilizado o tampão Tris 0,025M glicina 0,20M, pH 8,3 e SDS 1%. Foi aplicada uma voltagem de 80 Volts no gel por aproximadamente 1,5 horas à temperatura ambiente. Após a corrida o gel foi corado em uma solução contendo Brilliant Blue (CBB) R-250 0,4% em metanol 50% e ácido acético 7% por 1 hora e em seguida descorado em uma solução de ácido acético 10% e etanol 30% por 12 horas, à temperatura ambiente.

3.7 - Agregação plaquetária

A agregação plaquetária foi realizada no Laboratório de Hemostasia da Fundação Pró Sangue (Hemocentro de São Paulo) do Hospital das Clínicas – HC. Os experimentos visavam avaliar a atividade inibitória da “moojenina” frente a capacidade da trombina em ativar a coagulação e agregar plaquetas. Para tanto, foi realizado o experimento onde plaquetas lavadas eram submetidas à agregação induzida por trombina ou trombina com “moojenina”.

Para a obtenção das plaquetas, amostras de sangue, de vinte doadores do hemocentro, foram coletadas e submetidas à centrifugação por 6 minutos a 1000 RPM e 400g. O plasma rico em plaquetas (PRP) apresentou uma concentração de 560.000 plaquetas/mm³. Uma diluição foi realizada para se obter uma concentração de 300.000 plaquetas/mm³ como protocolo utilizado pela Fundação Pró Sangue.

Todos os testes com agregação plaquetária foram realizados incubando as frações das cromatografias com trombina por 5 minutos. Em seguida a solução foi adicionada às plaquetas lavadas e a agregação assim mensurada. As plaquetas foram obtidas através da centrifugação de 4 mL de sangue em cada um dos tubos siliconizados. Cerca de 20 mL de sangue total foram centrifugados a 1000 RPM por 6 minutos. Para impedir a coagulação sangüínea, citrato de sódio 3,2% foi utilizado uma vez que se trata de um quelante de cálcio, íon fundamental para o processo de coagulação. Todo o processo ocorreu em tampão de lavagem Tyrode (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 0,3 mM NaHCO₃, 0,42 mM NaH₄PO₄, 2mM MgCl₂) contendo 1% de glicose, 0,25% de gelatina e 2 mM de EGTA em pH 6,1. Plaquetas foram ressuspensas em um tampão Tyrode modificado contendo 1 mM MgCl₂, 128 mM

NaCl, pH 7, 4 e sem EDTA. As plaquetas foram mantidas a temperatura ambiente e utilizadas em menos de 6 horas.

3.8 - Atividade esterásica

Foi realizado um experimento para avaliar uma possível atividade esterásica da "moojenina" segundo método descrito por NOLAN *et al* (1976). As frações provenientes da coluna de afinidade por trombina e frações da coluna Mono Q, bem como "moojenina" foram submetidas ao teste. As amostras foram dissolvidas em tampão tris HCl 8 mM, pH 8,0, contendo 20 mM de CaCl₂. Tripsina 1 mg/mL, em solução com ácido clorídrico 1 mM, foi utilizada como padrão positivo. O substrato Tosil Arginina Metil Éster - TAME (1 mL, 2,5mM) foi incubado com 10 µg das frações das cromatografias e a densidade óptica mensurada a 247 nM por 5 minutos.

3.9 – Tempo de trombina

O tempo de trombina é utilizado para avaliar, em segundos, o tempo necessário para aquela enzima clivar o fibrinogênio e formar um coágulo a partir dos monômeros de fibrina. A trombina tem como alvo principal na cascata de coagulação a molécula de fibrinogênio. Contudo é uma enzima multifuncional e cliva também fatores X, V, XIII, dentre outras proteínas.

O teste do Tempo de Trombina (TT) foi realizado no Laboratório de Hemostasia do Hemocentro de São Paulo – Hospital das Clínicas. Cerca de 10 mL de Plasma Pobre em Plaquetas (PPP) foram obtidos de 20 doadores de sangue do hemocentro e centrifugados a 1800 g por 15 minutos. O plasma assim estava livre das plaquetas, contendo somente os fatores da coagulação. Diferentes concentrações (0,10µg/mL, 0,20µg/mL, 0,50µg/mL, 1µg/mL) das frações oriundas das purificações ou “moojenina” foram incubadas com trombina 2 nM (concentração final) como descrito por ZINGALI *et al*, 1993 e o complexo trombina e frações ou trombina e moojenina foi adicionado a 200 µL de plasma pobre em plaquetas e a coagulação monitorada em um coagulômetro.

4 - RESULTADOS

4.1 - Confeção da coluna de trombina

Os 10g de resina, quando inchados e ativados com HCL 1 mM produzem cerca de 15 mL de gel. A dosagem protéica da solução contendo trombina, antes do acoplamento, determinou a concentração de 1,335 mg em comprimento de onda de 280 nm. Após a reação o valor foi de 0,391 mg. As amostras de veneno adicionadas a essa coluna foram pré-tratadas com inibidor de serinoproteases como fenilmetilsulfonil fluoreto e inibidor de metaloproteases como ácido etilenodiamínico tetracético, como descrito em Material e Métodos.

4.2 – Cromatografia por afinidade

A nova coluna mostrou-se com resolução adequada mesmo depois de 30 cromatografias. A cromatografia por afinidade com trombina resultou em três picos os quais foram testados para as atividades anticoagulante e antiagregante plaquetária (figura 4).

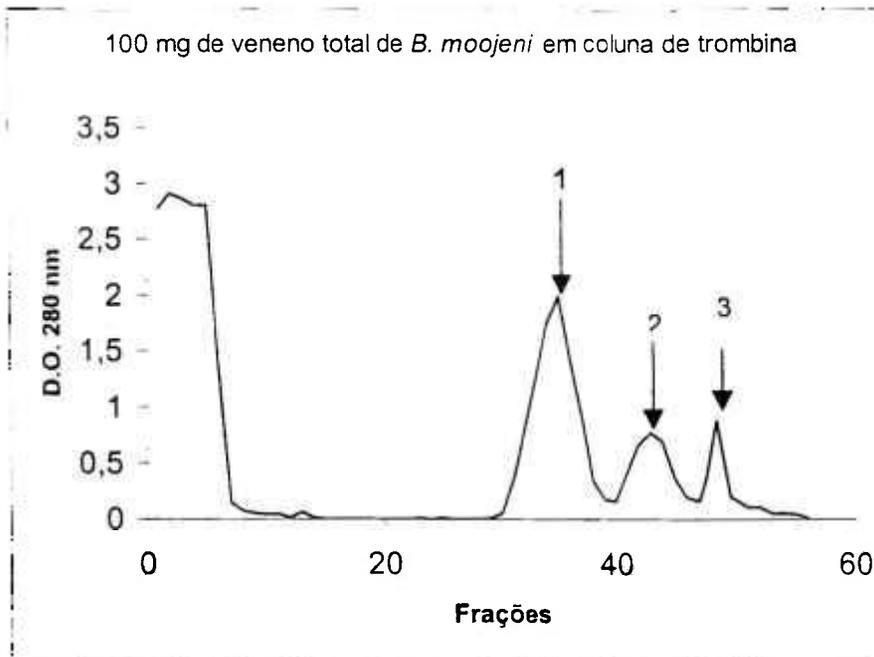


Figura 4: Cromatografia por afinidade em coluna Sepharose CNBr trombina. 100 mg de veneno total de *Bothrops moojeni* pré-tratados com inibidores de serinoproteases e metaloproteases (PMSF e EDTA,) respectivamente. As setas indicam os picos com afinidade pela trombina. O pico 3 refere-se à fração contendo a “moojenina”.

4.2.1 – Efeito da temperatura na interação das proteínas do veneno com a resina

Foi observado que há uma significativa diferença na interação das proteínas do veneno com afinidade pela coluna CNBr Sepharose-trombina, quando considerada a variação de temperatura. Uma média da absorvância em comprimento de onda de 280 nm entre 20 cromatografias realizadas em temperatura entre 12 e 15 °C (figura 5) e outras 20, em temperatura entre 26 e 29 °C (figura 4) foi obtida. Nota-se que o aumento da temperatura promove uma maior interação das proteínas pela resina de afinidade.

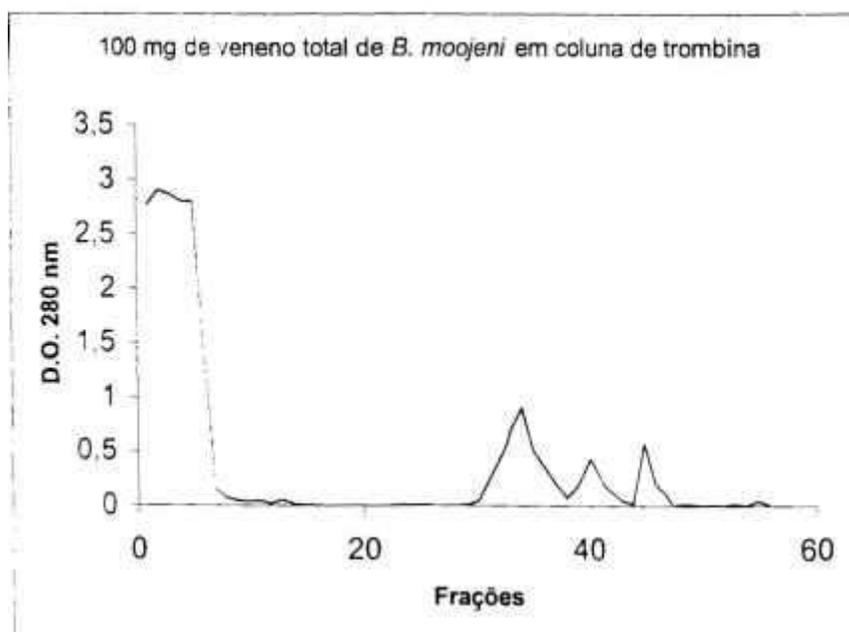


Figura 5: Cromatografia com 100 mg de veneno de *Bothrops moojeni* pré-tratados, em coluna CNBr Sepharose-trombina. Temperatura entre 12 e 15 °C.

4.3 – Cromatografia por troca iônica

O veneno de *Bothrops moojeni* foi fracionado em cromatografia por afinidade à trombina (figura 6). As frações oriundas desta cromatografia eram dialisadas contra 2 L de PBS ou água destilada, congeladas e finalmente liofilizadas. Foram então pesados 30 mg de massa da fração 3, aquela com maior atividade inibitória da trombina, diluída em tampão A e injetada numa coluna Mono Q. A coluna tem o seu gel carregado com cátions (carga positiva), possui assim, afinidade por proteínas com carga negativa. A eluição foi realizada com adição de tampão com alta concentração de sal. O tampão A constituía-se de (Tris HCl 50 mM pH8). Após dez minutos foi introduzido o tampão B (Tris HCl 50 mM + 1M NaCl pH 8,0) o qual atingiu 50% de sua concentração em 45 mL.

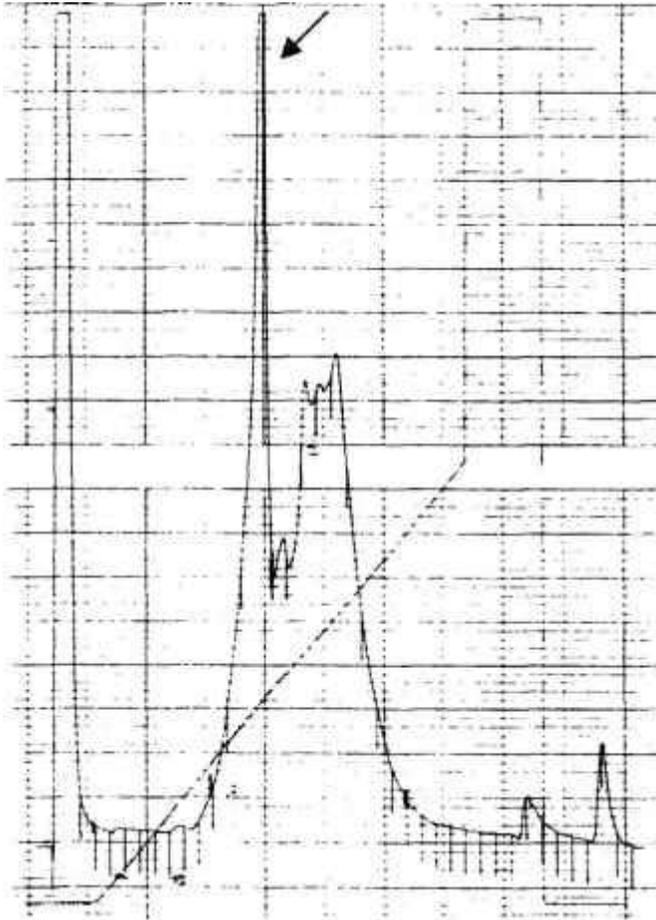


Figura 6: Cromatografia, em coluna de troca iônica, do terceiro pico da coluna de trombina (30 mg) em coluna Mono Q. A seta indica o pico referente à "moojenina". Tampão A (Tris HCl 50 mM pH 8,0). Após dez minutos foi introduzido o tampão B (Tris HCl 50 mM + 1M NaCl pH 8,0). *Absorbance Unit Full Scale (AUFS) = 1*. Fluxo 0,5 mL/min. 1 mL/tubo.

Podem ser observados, na figura 6, os três picos da coluna Mono Q, onde o segundo refere-se à "moojenina". As frações foram coletadas, dialisadas contra 2L de PBS ou água destilada por 12 horas. Amostras de 1 mL de cada pico foram coletadas após o processo de diálise e mantidas congeladas até o momento dos testes de atividade biológica. O restante dos produtos dialisados foi congelado a -80°C .

4.4 – Cromatografia Líquida de Alto Desempenho

(High Performance Liquid Chromatography – HPLC)

O terceiro pico, oriundo da cromatografia por afinidade a trombina, além de ter sido submetido à cromatografia por troca iônica em coluna Mono Q (figura 6), também foi cromatografado em uma coluna TSK utilizando sistema HPLC, onde o sétimo pico daquela cromatografia refere-se à “moojenina” (figura 7). O sétimo pico da cromatografia supracitada foi liofilizado e recromatografado na mesma coluna, como mostrando a eliminação da maioria dos contaminantes (figura 10).

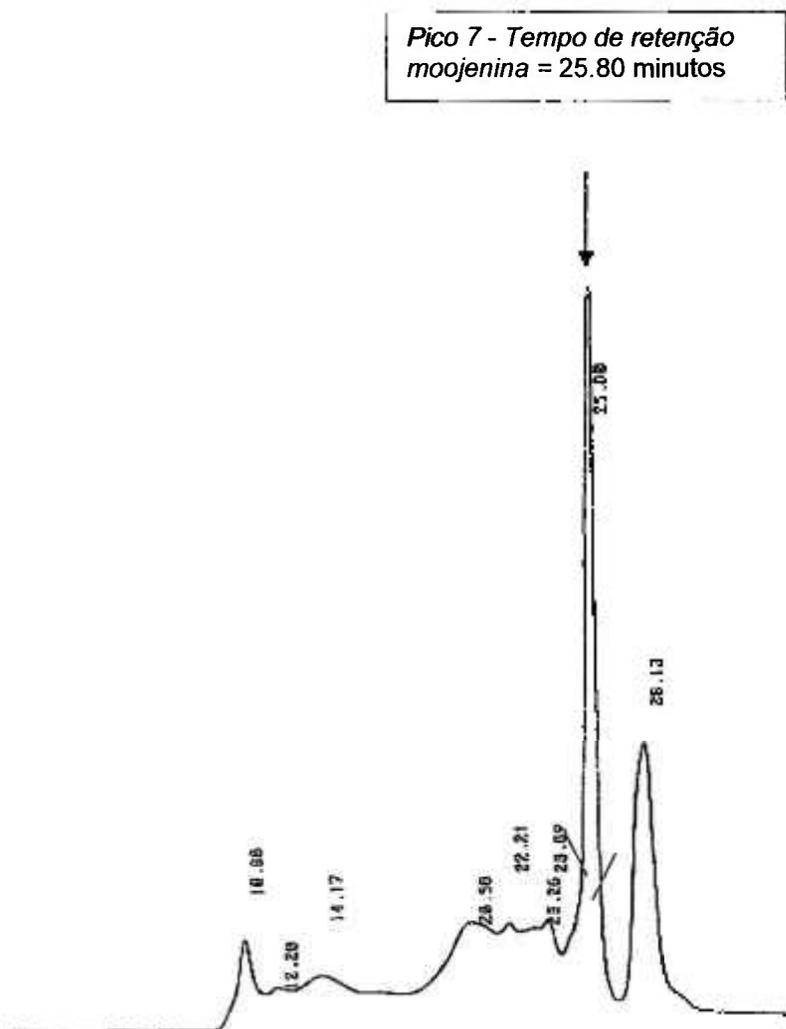


Figura 7: Cromatografia Líquida de Alto Desempenho – HPLC utilizando coluna TSK 3000. Os traços em vermelho indicam o começo e o término da coleta do sétimo pico. Tampão: bicarbonato de amônio 50mM, fluxo 0,5 mL/minuto.

O penúltimo pico (pico 7) da cromatografia em sistema HPLC (indicado pelos cortes em vermelho na figura 7) representa a “moojenina”. A fração referente ao pico 7 foi coletada, dialisada contra 2L de PBS ou água destilada por 12 horas. Amostras de 1 mL desse pico foram coletadas após o processo de diálise, liofilizada e

mantidas a -20°C até o momento dos testes de atividade biológica. O restante dos produtos dialisados foi congelado a -80°C .

4.5 – Dosagem protéica

Para avaliar o conteúdo protéico eluído das cromatografias, foi construída uma curva padrão utilizando albumina de soro bovino. A correlação dos resultados foi alta com $r^2 = 0,9972$. A construção da curva com os resultados das D.O. foi feita com o auxílio do programa ORIGIN.

4.6 - Eletroforese em gel de poliacrilamida 12%

Sodium Dodecyl Sulfate – Poliacrilamida Gel Electrophoresis (SDS-PAGE)

Amostras com cerca de 20 μg de massa dos picos 2 e 3 da cromatografia por afinidade, bem como o produto não retido naquela coluna, foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida 12% para verificação do material protéico e estimativa do peso molecular das proteínas. Amostra do veneno total de *B. moojeni* também foi submetida ao mesmo teste.

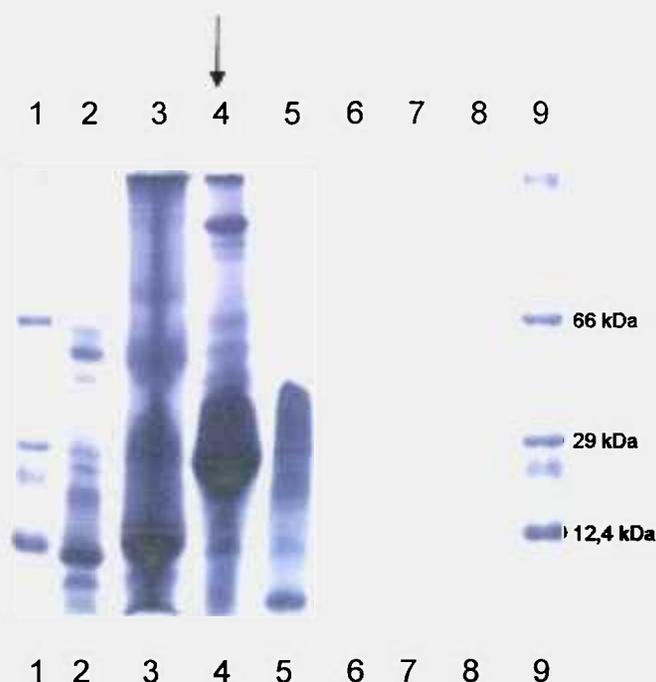


Figura 8: SDS 10% - PAGE com 20 ou 40 μg de massa em cada *lane*. A seta indica a fração contendo “moojenina”.

Lane 1 – padrão de peso molecular

Lane 2 – veneno total de *Bothrops moojeni*

Lane 3 – não retido em coluna de trombina (40 μg)

Lane 4 – pico 3 coluna de trombina (40 μg)

Lane 5 – pico 2 coluna de trombina

Lane 6 e 7 – vazios

Lane 8 - vazio

Lane 9 – padrão de peso molecular

Na figura 8 pode-se verificar SDS-PAGE 12% onde nos *lanes* 1 e 9 os padrões de peso molecular com soro albumina bovina (66 kDa), anidrase carbônica (29 kDa) e citocromo C com 12.400 kDa. No *lane* 2 pode-se observar a presença de inúmeras proteínas com variadas massas moleculares no veneno total de *Bothrops moojeni*. O produto não retido na coluna de afinidade por trombina foi aplicado no *lane* 3 (figura 8) mostrando proteínas que não estão presentes no *lane* 4 onde foi aplicado o terceiro pico (figura 4) da coluna de trombina. No *lane* 5 é observado o perfil eletroforético do segundo pico da coluna de trombina e ausência de proteínas na faixa de 66 kDa como aparecem no *lane* 4. Não foi aplicado material nos *lanes* 6,7 e 8.

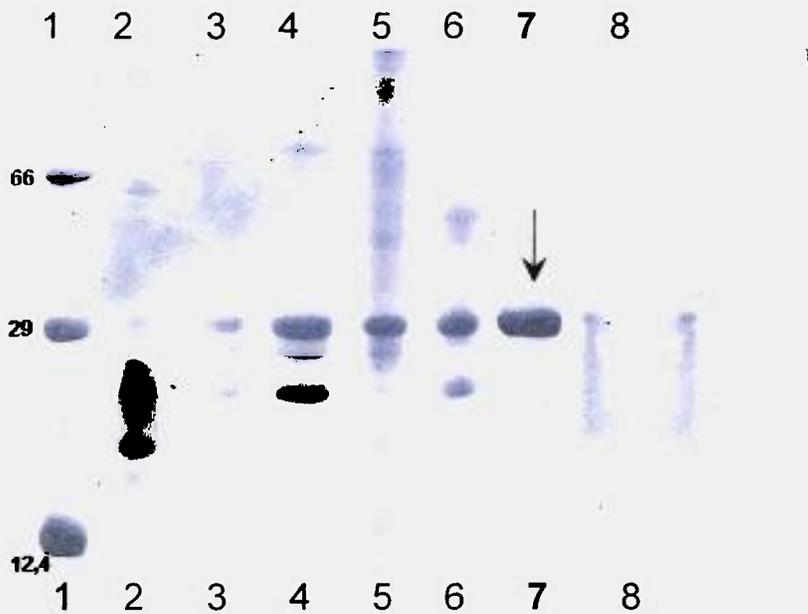


Figura 9: Eletroforese em gel de poliacrilamida 12% com SDS. Seta indica "moojenina".

Lane 1 - 20 µg padrão de peso molecular

Lane 2 - 10 µg veneno total de *B. moojeni*

Lane 3 - 5 µg pico 3 da coluna de trombina

Lane 4 - 10 µg pico 2 da coluna de trombina

Lane 5- 10 µg pico 1 da coluna de trombina

Lane 6- 10 µg não retido coluna Mono Q

Lane 7 - 20 µg "moojenina" - coluna Mono Q

Lane 8 - 10 µg pico 3 da coluna Mono Q

A figura 9 mostra SDS-PAGE 12% onde se se observa no *lane* 1 os padrões de massa molecular como descrito em Material e Métodos. No *lane* 2 foram aplicados 10 µg de veneno total de *B. moojeni* revelando proteínas com massas moleculares entre 15 e 66 kDa. No *lane* 3 foi aplicada uma menor massa (5 µg) do terceiro pico da coluna de trombina uma vez que 40 µg da mesma amostra, torna-se difícil a verificação da banda correspondente à “moojenina”. Ainda no *lane* 3 nota-se uma banda protéica com massa molecular próximo a 30 kDa. O segundo pico da coluna de trombina (figura 4) foi aplicado no *lane* 4 e revela proteínas com perfil eletroforético semelhantes ao pico 3 da cromatografia. O *lane* 5 mostra que o primeiro pico da coluna de trombina possui proteínas com diferentes massas moleculares variando de 70 a 15 kDa e possui atividade pró-coagulante. No *lane* 6 foram aplicados 10 µg do produto não retido na coluna de troca iônica Mono Q, revelando três proteínas com massas moleculares em torno de 60 kDa, 29 kDa e 20 kDa. O *lane* 7 refere-se à “moojenina” purificada através da cromatografia por troca iônica em coluna Mono Q.

4.7 – Recromatografia do pico referente à “moojenina”



Figura 10: Recromatografia do pico 7 proveniente da cromatografia em coluna TSK 3000 em sistema HPLC, indicando “moojenina”. Tampão: bicarbonato de amônio 50mM, fluxo 0,5 mL/minuto.

O sétimo pico proveniente da cromatografia por exclusão molecular em coluna TSK 3000 em sistema HPLC (figura 7), foi recromatografado na mesma coluna para avaliação de sua pureza. A figura 10 mostra a pureza do material coletado no pico sete daquela cromatografia, com um tempo de retenção (25,1 minutos) próximo àquele obtido quando se aplicou a terceira fração (pico 3) da coluna de trombina (25,8 minutos – figura 7).

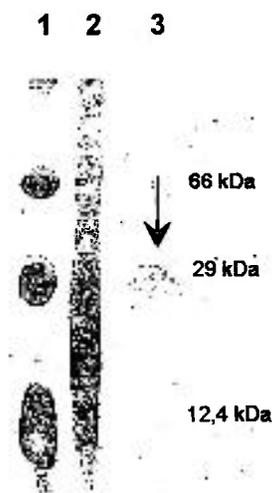


Figura 11: SDS10%-PAGE. Seta indica “moojenina” proveniente da recromatografia por gel filtração (figura 10) em coluna TSK no sistema HPLC.

Lane 1 – 30 μ g do padrão de peso molecular

Lane 2 – 30 μ g de veneno total de *Bothrops moojeni*

Lane 3 – 5 μ g da recromatografia do pico 7 da coluna TSK (HPLC)

Foi realizado teste em SDS 10%-PAGE para avaliar a pureza do material (“moojenina”) recromatografado por exclusão molecular. A figura 11 mostra no *lane 1*, padrão de massa molecular como descrito em Material e Métodos. No *lane 2* pode ser observado veneno total de *B. moojeni* enquanto no *lane 3* foram aplicados 7 μ g de “moojenina” oriunda da recromatografia por gel filtração mostrando a eliminação da maioria dos contaminantes.

4.8 - Agregação plaquetária

Os três picos oriundos da cromatografia por troca iônica em sistema FPLC e exclusão molecular em sistema HPLC foram testados para as atividades anticoagulante e antiagregante plaquetária. Os resultados da atividade antiagregante plaquetária e anticoagulante (tempo de trombina) mostraram que os picos 2 e 3, provenientes coluna de trombina, assim como o segundo pico gerado pela coluna Mono Q, são capazes de inibir a trombina em sua atividade pró agregante plaquetária e pró-coagulante. Os testes de coagulação e agregação plaquetária revelam que o terceiro pico possui a maior atividade inibitória da trombina.

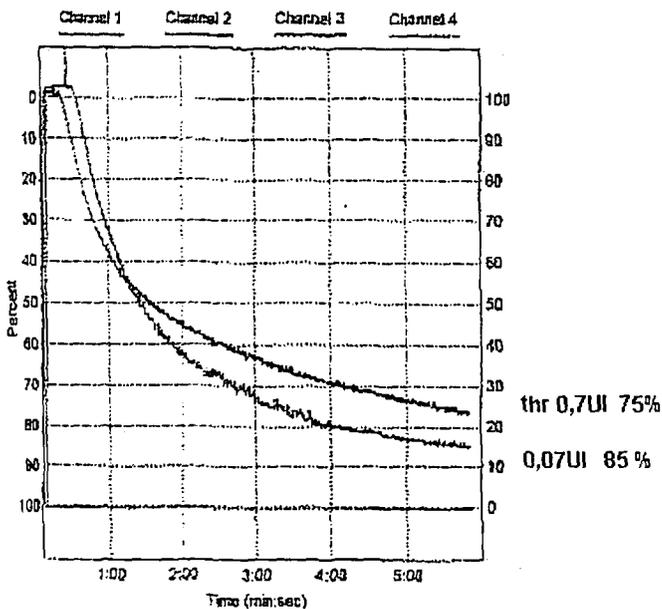


Figura 12: Controle positivo mostrando agregação plaquetária com diferentes concentrações de trombina (0,7 e 0,07 U/mL). O gráfico refere-se ao tempo decorrido em minutos logo após a adição de trombina em relação ao percentual crescente da agregação.

O controle positivo foi obtido através da adição de trombina 0,07 UI (concentração final) às plaquetas lavadas. No protocolo para agregação plaquetária do Laboratório de Hemostasia da Fundação Pró Sangue utiliza trombina 0,7 U/mL como padrão para controle positivo. Todavia foi utilizada a concentração de 0,07 U/mL conforme descrito por ZINGALI *et al* (1993).

Em contato com plaquetas, a trombina tem a propriedade de ativá-las (figura 12). Um processo em que a trombina cliva a glicoproteína Ib (GPIb) ativando plaquetas vizinhas. Isso faz com que estas emitam pseudópodes e liberarem substâncias (ADP, tromboxana A₂, etc) que atuam na adesão e agregação plaquetária. Todas as plaquetas envolvidas, assim tornam-se extremamente viscosas, facilitando a adesão e agregação plaquetária. Um processo que requer fator de von Willibrand.

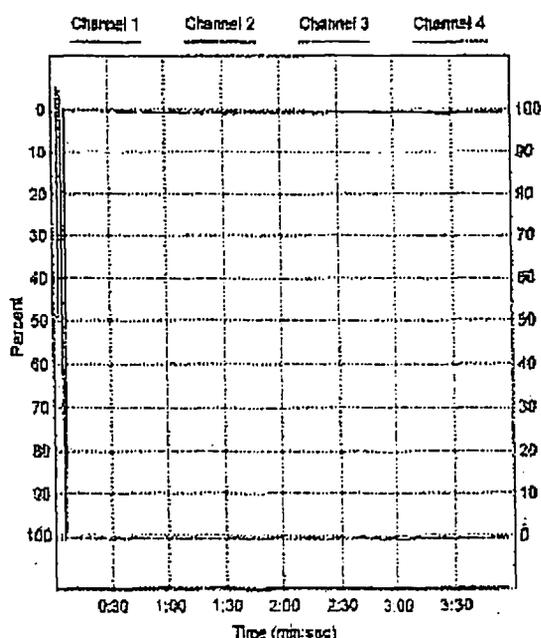


Figura 13: Controle negativo da agregação plaquetária utilizando PBS. O gráfico refere-se ao tempo decorrido em minutos logo após a adição de PBS em relação ao percentual crescente da agregação.

No controle negativo pode-se observar que o PBS não é capaz de induzir a agregação plaquetária. Todas as amostras de toxinas utilizadas encontravam-se em presença de PBS.

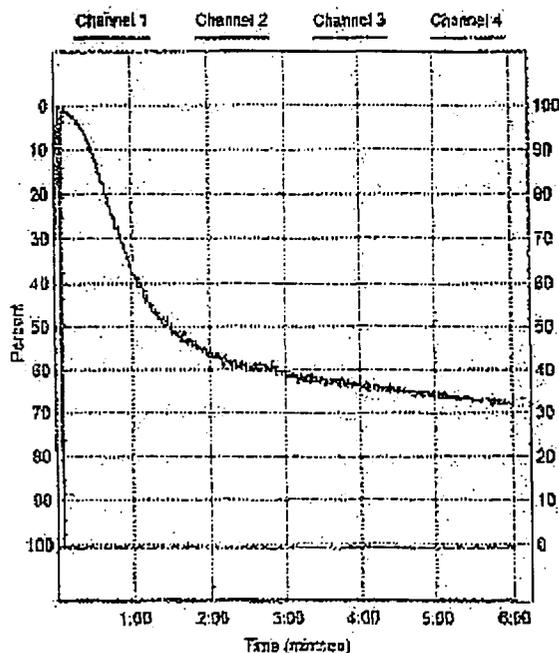


Figura 14: Atividade pró-coagulante do pico 1 (5 µg) proveniente da coluna por afinidade à trombina. Indução da agregação plaquetária de 65%. O gráfico refere-se ao tempo decorrido em minutos logo após a adição do pico 1 em relação ao percentual crescente da agregação.

Os resultados dos testes de agregação plaquetária revelam que mesmo possuindo afinidade pela coluna de trombina, o pico 1 da coluna de trombina não possui atividade antiagregante plaquetária e revela atividade pró agregante. Isso se deve ao fato de nem todas as proteínas serem neutralizadas pelos inibidores de serinoproteases.

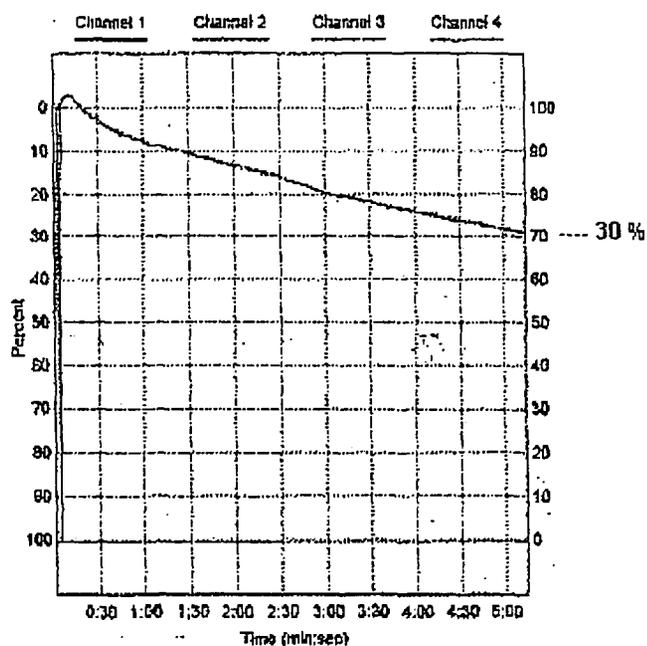


Figura 15: Atividade antiagregante plaquetária do terceiro pico oriundo da cromatografia por afinidade em coluna de trombina. Indução de 30% da agregação. O gráfico refere-se ao tempo decorrido em minutos logo após a adição de trombina e o pico 3 (15 μ g) da coluna de trombina em relação ao percentual crescente da agregação (figura 12).

Como a fração do terceiro pico da coluna de trombina não se encontrava totalmente pura, uma maior massa protéica da terceira fração da cromatografia por afinidade à trombina foi utilizada pra promover a inibição da agregação plaquetária induzida por trombina. Neste experimento 15 μ g de massa do terceiro pico foram utilizados para promover apenas 30% de agregação plaquetária.

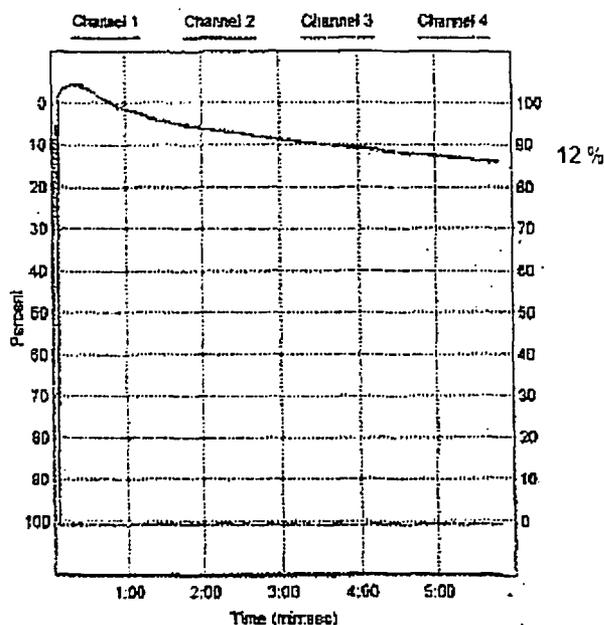


Figura 16: Atividade antiagregante plaquetária da "moojenina". Indução de 12% da agregação plaquetária. O gráfico refere-se ao tempo decorrido em minutos logo após a adição de trombina e "moojenina" (1 μ g) em relação ao percentual crescente da agregação.

Na figura 16 pode-se observar uma importante inibição da agregação plaquetária induzida por trombina utilizando 1 (1 μ g) de "moojenina" purificada através da cromatografia por troca iônica. O mesmo resultado é obtido com "moojenina" purificada através da cromatografia por exclusão molecular utilizando coluna TSK- 3000 em sistema HPLC. Dados não apresentados.

4.9 – Tempo de trombina – T T

O teste avalia quanto tempo em segundos é necessário para que a trombina clive a molécula de fibrinogênio em fibrina formando coágulo. A trombina é a forma ativa do zimogênio protrombina (ou fator II) da coagulação. A “moojenina” foi testada em sua atividade inibitória da trombina. Esta é a principal enzima da cascata de coagulação tendo como substrato principal, a molécula de fibrinogênio. A trombina ainda participa de diversos processos moleculares e celulares. A “moojenina” foi incubada com trombina (0,07 U/mL) por 5 minutos e este complexo adicionado ao plasma pobre em plaquetas.

Segundo os padrões utilizados pela Fundação Pró Sangue, valores com três unidades (em segundos) acima do padrão são considerados Tempo de Trombina (TT) prolongado. O padrão de TT do *pool* de plasma era de 14 segundos. Resultados com “moojenina”, 1µg/mL mostram TT incoagulável, apresentados aqui somente até 40 segundos.

Tempo de Trombina

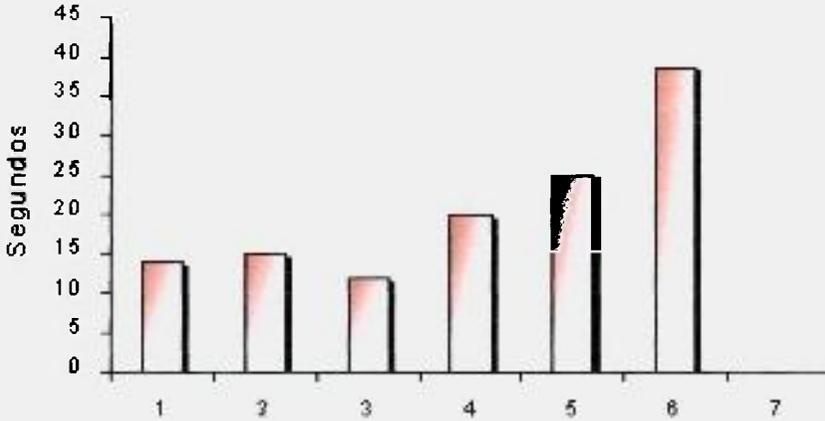


Figura 17: Gráfico do Tempo de Trombina (TT) utilizando diferentes amostras mostrando a coagulação do plasma pobre em plaquetas em relação ao tempo em segundos. O agente indutor da coagulação foi trombina 2 nM.

1 – controle (+) com trombina 2 nM

2 – Veneno total de *Bothrops moojeni*

3 – Pico 1 da coluna Mono Q

4 – Pico 2 da coluna de trombina

5 – Pico 3 da coluna de trombina

6 – “Moojenina” 1 μ g

4.10 – Atividade esterásica

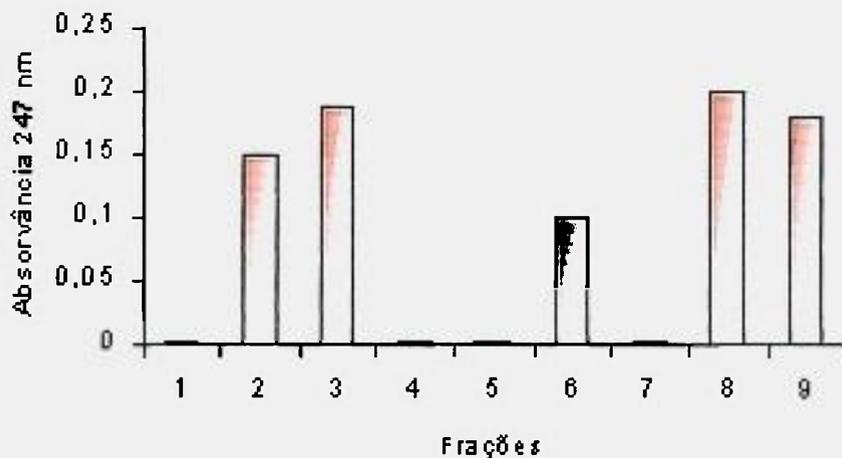


Figura 18: Gráfico da atividade esterásica em diferentes passos cromatográficos na purificação da moojenina. Amostras com 5 µg do substrato TAME (2,5 Mm) e 10 µg das amostras das frações ou “moojenina”; 5 minutos, temperatura ambiente.

1 – PBS

2 – Veneno total de *B. moojeni*

3 – Pico 1 da coluna de trombina

4 – Pico 2 da coluna de trombina

5 - Pico 3 da coluna de trombina

6 – Não retido da coluna de trombina

7 – “Moojenina”

8 – Controle (+) com tripsina

9 – Trombina 2nM + “moojenina” 10µg

5 – DISCUSSÃO

Os venenos e peçonhas de diversas espécies animais possuem toxinas que induzem o aparecimento de distúrbios hemostáticos durante o envenenamento de suas vítimas. Determinados animais desenvolveram toxinas, altamente específicas e eficientes, muitas vezes complexas, algumas únicas na natureza. O entendimento de seus mecanismos de ação em diversos sistemas e/ou grupos celulares e moleculares permite a compreensão de vários processos fisiopatológicos, fenômenos celulares e moleculares ocasionados pelas intoxicações agudas por esses venenos, trazendo ainda a perspectiva da utilização dessas substâncias como ferramentas farmacológicas (SANTORO & SANO-MARTINS, 1993).

Os venenos ofídicos geralmente possuem uma variedade de substâncias, dentre as quais estão fatores com atividade pró e anticoagulante, além de indutores e inibidores da agregação plaquetária (LEE, 1979; STOKER, 1990; BRASIL, 1998; ALVES DA SILVA, 2004).

Os venenos das serpentes da família *Viperidae*, distribuídas pelas Américas, África e Europa, possuem na constituição de seus venenos, uma variedade muito grande de enzimas. Aquelas pertencentes à família das serinoproteases são hidrolases que possuem um resíduo do aminoácido serina, essencial para o mecanismo de catálise. As proteínas da cascata da coagulação são, em geral, serinoproteases e promovem proteólise limitada ao hidrolisarem seu substrato que é um zimogênio (proteína na sua forma inativa).

A trombina constitui a principal enzima da cascata da coagulação além de participar de diversos outros processos moleculares e celulares.

Na cascata da coagulação, esta enzima tem como principal substrato à molécula de fibrinogênio. O fibrinogênio quando clivado, gera monômeros de fibrina, ainda instáveis. Estes formam a malha disforme, conhecida como coágulo (figuras 2 e 19). A trombina ainda cliva fator XIII que estabiliza o coágulo. Posteriormente, o coágulo retrai-se e limita o sangramento. Esta enzima também atua na hidrólise dos fatores V, VIII, XI e plaquetas (MONTEIRO, 2000). A trombina é uma proteína multifuncional uma vez que participa de processos inflamatórios além de estar envolvida na cicatrização, anticoagulação quando ativa a proteína C, proliferação e maturação celular e no desenvolvimento de algumas doenças tais como Acidente Vascular Cerebral (AVC), Infarto Agudo do Miocárdio (IAM), coronariopatias, dentre outras (AMARAL, C.F.S. (1986).; ZINGALI, R. B. (1993); AZEVEDO-MARQUES, M.M. (1995); FRANÇA, F. O. S. (1997); CARDOSO, J.L.C. (2003).

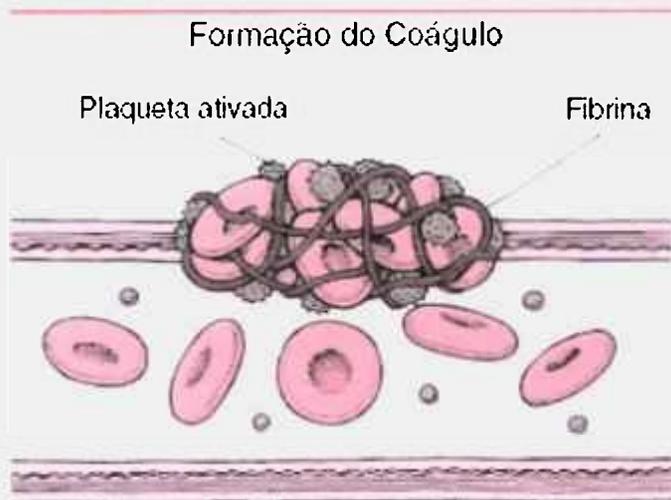


Figura 19: Formação do coágulo no local da injúria mostrando as plaquetas ativadas aderindo-se ao local do sangramento e a malha disforme de fibrina envolvendo todas as células.

A trombina é a forma ativa do zimogênio protrombina ou fator II da coagulação. Além de clivar o fibrinogênio em fibrina, a trombina ainda atua como um fator anticoagulante quando ativa a proteína C que inativa a trombina. A proteína C ainda se liga à trombomodulina e o complexo trombina – trombomodulina (T-TM) inibe a maioria das ações coagulantes incluindo formação do coágulo, ativação de plaquetas e do endotélio, além da inibição da ativação do fator V.

Como não se dispunha de uma resina com trombina acoplada para a cromatografia por afinidade à mesma, foi desenvolvida pelo nosso grupo, uma coluna com esta propriedade. A resina CNBr 4B Sepharose-Trombina constitui assim uma nova ferramenta na purificação de compostos com afinidade à molécula de trombina, uma vez que não era descrita a existência da mesma na literatura. Um resultado pouco provável no presente trabalho é o fato de proteínas do veneno, ainda que pré-tratadas com inibidores de proteases se ligam à resina contendo trombina (figuras 4 e 5). Esse dado é corroborado por CASTRO *et al* (1999) onde foi verificado que inúmeras proteínas de vários venenos botrópicos possuem afinidade por trombina numa resina *PPAK- α -thrombin-Sepharose*. Ainda no trabalho citado, os venenos de *B. atrox*, *B. cotiara*, *B. jararacussu*, *B. moojeni* e *B. neuwiedi* foram cromatografados na coluna supracitada e também veneno *Crotalus durissus terrificus* e *Lachesis muta*. Todos venenos possuíam proteínas com afinidade pela coluna de trombina com massas moleculares variando entre 14 e 70 kDa, contudo, apenas aquelas com cerca de 27 kDa possuíam atividade inibitória da trombina.

Com exceção do veneno de *C.d. terrificus*, todos os venenos analisados naquele trabalho, possuíam proteínas com massa molecular em torno de 27 kDa reconhecidas por anticorpos antibotrojaracina em análise por Western blot. Foi

observado ainda no mesmo trabalho que em veneno de *B. moojeni*, proteínas com diferentes padrões de migração em SDS-PAGE, eram reconhecidas por anticorpos antibotrojaracina. Esse dado sugere que no veneno de *Bothrops moojeni*, estão presentes isoformas da “moojenina”.

A “moojenina” foi primeiro purificada através de uma cromatografia por afinidade utilizando uma resina CNBr 4B Sepharose-trombina e o terceiro pico dessa cromatografia (figura 4) foi aplicado numa coluna de troca iônica (figura 6). O segundo pico desta cromatografia refere-se a “moojenina”.

O produto do terceiro pico da cromatografia por afinidade foi submetido à eletroforese em gel de acrilamida 12% quando foi verificado que havia uma significativa diferença entre as massas moleculares das proteínas (figura 8, linha 4). Fato que levou a uma terceira cromatografia constituída por exclusão molecular com coluna TSK – 3000 no sistema HPLC (figura 7).

Em gel SDS-PAGE, a banda majoritária correspondia a uma proteína com cerca de 30 kDa, o que sugeria uma botrojaracina símile. Este dado é confirmado quando o pico 7 da coluna TSK-3000 foi coletado e submetido à nova eletroforese mostrando a pureza da proteína e sua massa molecular estimada.

A cromatografia por exclusão molecular constitui uma segunda forma de purificação da “moojenina” que é eluída no sétimo pico (figura 7). CASTRO e colaboradores (1999) sugerem que proteínas contendo maior massa molecular e com afinidade à trombina, possam ser zimogênios (ou precursores) das proteínas ativas como a botrojaracina, botralternina ou como no presente trabalho, “moojenina”.

A primeira fração eluída na cromatografia por afinidade a trombina, provavelmente ocorra pela adição de sal com a solução B (0,01 N HCl, 0,5 M NaCl, pH 2) uma vez que ao final da eluição do pico 1 o pH ainda encontra-se em 7. A eluição do segundo pico pode ocorrer pela mudança de pH de 7 para 5 e finalmente o terceiro pico, aquele com maior afinidade pela coluna, começa a ser eluído com pH 2 (figuras 3 e 4). O terceiro pico da cromatografia por afinidade foi capaz de inibir a trombina em sua atividade pró agregante plaquetária como observado na figura 15. Acredita-se que as outras proteínas presentes naquela fração tenham perdido sua atividade pela adição dos inibidores de proteases como PMSF e EDTA. Este dado sugere que a "moojenina" não é uma enzima, pois mantém sua atividade biológica ao se ligar à trombina e inibir sua atividade pró agregante plaquetária (figura 16). A "moojenina" não só inibe a agregação como também a coagulação induzida por trombina.

Nos testes realizados na Fundação Pró Sangue, pôde-se observar que em plasma livre de plaquetas, contendo apenas as proteínas da coagulação, a "moojenina" foi capaz de inibir a atividade pró-coagulante da trombina após uma incubação por cinco minutos com esta enzima. Segundo protocolo utilizado pela Fundação Pró Sangue, valores acima de três segundos do tempo normal de trombina são considerados valores para Tempo de Trombina (TT) prolongados. O tempo normal para o *pool* utilizado foi de 14 segundos. Quando a trombina era incubada com o terceiro pico da coluna de trombina (15 µg), o TT foi prolongado para cerca de 25 segundos como observado na coluna 5 da figura 17. Quando a "moojenina" pura (1 µg) foi incubada com trombina (0,07U/mL) o TT foi incoagulável e apresentado neste trabalho somente até 40 segundos (figura 17).

A “moojenina” ainda foi testada para possível atividade esterásica sobre substrato TAME que constitui o principal substrato sintético para enzimas serinoproteases. Os resultados deste experimento mostram que a “moojenina” não possui atividade esterásica mesmo em altas concentrações (coluna 7, figura 18). Por outro lado o primeiro pico oriundo da cromatografia por afinidade cliva o substrato TAME tanto quanto o controle positivo com tripsina, mostrando assim uma potente atividade esterásica (coluna 3, figura 18). O mesmo pico quando submetido a testes de agregação plaquetária, ativa plaquetas como mostrado na figura 14.

Ainda é desconhecido o mecanismo pelo qual a “moojenina” inibe a trombina. Em caso da “moojenina” ser uma botrojaracina símile, o mecanismo de inibição poderia se dar através da ligação ao exosítio I e II da trombina, bloqueando a região da trombina que atua no fibrinogênio e que também é reconhecida pela antitrombina. A botrojaracina ainda inibe os fatores IX e X e protrombina da cascata da coagulação, atuando assim como uma possível droga preventiva de doenças como trombose. Contudo a botrojaracina não é capaz de inibir a atividade proteolítica da trombina em clivar substratos sintéticos como S-2238.

Algumas enzimas têm a propriedade de inibir alguns peptídeos com atividade na coagulação e podem ser reunidas em famílias de acordo com sua seqüência de aminoácidos quando levado em consideração o ancestral comum (RAWLINGS *et al*, 2004).

A descoberta de novos compostos capazes de interferir e/ou prevenir a formação de trombos pode representar uma mudança substancial no prognóstico dos pacientes vítimas de acidentes tromboembólicos, cada vez mais freqüentes em nossa civilização sendo algumas das doenças que mais levam ao óbito no mundo. O

isolamento de toxinas a partir de venenos ofídicos e de outros animais, bem como o estudo sistemático dos seus efeitos, constitui uma estratégia de grande importância para a identificação de novos compostos com potencial uso terapêutico. Este tipo de abordagem já resultou na identificação de compostos, atualmente utilizados tanto no tratamento, como no diagnóstico e acompanhamento de várias doenças como o composto *Captopril*, largamente utilizado no tratamento da pressão arterial ou ainda *Ancrod* e *Reptilase* (LONGENEKER, 1991; ZINGALI, 1993; BRAUD 2000).

6 – CONCLUSÕES

O presente trabalho permite concluir que:

- A “moojenina” pode ser purificada em cromatografia por afinidade seguida tanto por troca iônica quanto por exclusão molecular.
- A resina CNBr 4B Sepharose-trombina retém proteínas capazes de inibir trombina bem como proteínas trombina-símile, capazes de ativar a cascata da coagulação e plaquetas.
- A “moojenina” é um inibidor protéico da trombina, presente no veneno da serpente *Bothrops moojeni*, com massa molecular de 27 kDa, similar à da botrojaracina.
- As atividades coagulante e agregante plaquetária, induzidas por trombina, são inibidas pela “moojenina”.
- A “moojenina” é desprovida de atividade esterásica.
- A “moojenina” prolonga o Tempo de Trombina à incoagulabilidade.

7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES DA SILVA, J. A. Aspectos de atividade biológica da gioxina (enzima trombina-símile) isolada do veneno de *Crotalus durissus terrificus*. Dissertação (Mestrado). Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares - IPEN, São Paulo. (2004).

AMARAL, C.F.S.; SILVA, O.A.; LOPEZ, M.; PEDROSO, E.R.P. Afibrinogenemia following snakebite. (*Crotalus durissus terrificus*) *Amer.J.Trop. Med.Hyg* **29**,1453-1455. (1980).

AMARAL, C.F.S.; da SILVA. O. A.; GOODOY, P.; MIRANDA, D. Renal cortical necrosis following *Bothrops jararaca* and *Bothrops jararacussu* snakebite. *Toxicon* **23**, 877-1985. (1985).

AMARAL, C.F.S.; de RESENDE, N. A. ; da SILVA, O. A. RIBEIRO, M. M.; MAGALHÃES, R. A. ; do REIS, R. J. ; CARNEIRO, J. G. ; CASTRO, J.R. Insuficiência renal aguda secundária a acidentes botrópico e crotálico. Análise de 63 casos. *Rev. Inst. Med. Trop.* **28**, São Paulo, 220. (1986).

ANCHIETA, J. Do Ir. José de Anchieta ao P. Diego Laynes, Roma. São Vicente 31 de maio de 1560. In: Leite Serafim, editor. *Cartas dos primeiros jesuítas*. Coimbra: Edit. Da Atlântida, 202-36. (1958).

ANDREWS, R. K.; GARDINER, E. E. BERNDT, M. C.; Snake venom toxins affecting platelet function. *Methods Mol Biol.* **273**, 335-48. (2004).

AROCAS, V.; ZINGALI, R. B.; GUINLLIN M. C.; BOM, C.; JANDROT-PERRUS, M. Bothrojaracin: A potent two-site-directed thrombin inhibitor. *Biochemistry.* **35** (28), 9083-9. (1996).

AZEVEDO-MARQUES, M.M.; CUPO, P.; COIMBRA, T. M.; HERING, S. E.; ROSSI, M. A. LAURE, C. J. Myonecrosis, myoglobinuria and acute renal failure induced by South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*) envenomation in Brasil. *Toxicon* **23** (4), 631-6. (1985).

AZEVEDO-MARQUES, M.M; Comunicação pessoal. (2001).

BARRAVIERA, B. *Venenos Animais – Uma Visão Integrada*. Rio de Janeiro: Ed. de Publicações Científicas. 205 – 251p. (1994).

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgam quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochemistry* **72**, 248-254. (1976).

BRASIL. *Manual de Diagnóstico e Tratamento dos Acidentes por Animais Peçonhentos*. Brasília: Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde, 131p. (1998).

BRAUD,S.; BOM, C.; WISNER, A.; Snake venom proteins acting on hemostasis. *Biochimie*. **82**, 851-859. (2000).

BRAZIL, V. Contribuição ao estudo do veneno ofídico: tratamento das mordeduras de cobras. *Rev Méd, São Paulo*. **13**, 265-78. (1903).

CARDOSO, J.L.C.; FRANÇA, F.O.S.; FAN,H.W.; MÁLAQUE, C.S.; HADDAD Jr, V. In: Sarvier. *Introdução ao Ofidismo*. São Paulo: Ed. Sarvier, 3. (2003). *Animais Peçonhentos no Brasil – Biologia, Clínica e Terapêutica dos Acidentes*. São Paulo. Ed. Sarvier. 3. (2003).

CASTRO, H. C.; DUTRA, D. L. S.; OLIVEIRA-CARVALHO, A. L.; ZINGALI, R. B. Bothralternin, a thrombin inhibitor from the venom of *Bothrops alternatus*. *Toxicon* **36** (12), 1903-1912. (1998).

CASTRO, H. C.; FERNANDES, M.; ZINGALI, R. B. Identification of Bothrojaracin-like proteins in snake venoms from *Bothrops* species and *Lachesis muta*. *Toxicon* **37**, 1403-1416. (1999).

CASTRO, H. C.; SILVA, D. M.; CRAIK, C.; ZINGALI, R. B.; Structural features of a snake venom thrombin-like enzyme: thrombin and trypsin on a single catalytic platform? *Biochim Biophys Acta* **1547** (2), 183-95. (2001).

DENSON, K. W. E. Coagulant and anticoagulant action of snake venom. *Toxicon* **7**, 5-11. (1969).

DENSON, K.W.E. & ROUSSEAL, W.E. Separating of coagulant of components of *Bothrops jararaca* venom. *Toxicon* **8**, 15-18. (1970).

FRANÇA, F. O. S.; Associação da venenemia e da gravidade em acidentes botrópicos, no momento da admissão no Hospital Vital Brazil do Instituto Butantan – SP, com variáveis epidemiológicas e laboratoriais Tese (Doutorado). Universidade de São Paulo. (1997).

FURTADO, M.F.; Contribuição ao estudo do veneno de *Bothrops moojeni* (HOGEM 1965) em função da idade das serpentes. (*Tese de Doutorado*), Universidade de São Paulo. (1987).

GUTIÉRREZ, J.M. & LOMONTE, B. Local tissue damage induced by *Bothrops* snake venoms. A review. *Mem. Inst. Butantan.* **51** (4), 211-223. (1989).

KAMIGUTI, A.S.; MATSUNAGA, S.; SPIR, M.; SANO-MARTINS, I.S.; NAHAS, L. Alteration of the blood coagulation system after an accidental human inoculation by *Bothrops jararaca* venom. *Braz. Med. Biol. Res.* **19**, 199-204. (1986).

KAMIGUTI, A. S. & CARDOSO, J. L. C. Haemostatic changes caused by the venoms of South America snakes. *Toxicon.* **27**. 955-63. (1989).

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* **227**, 680-685. (1970).

LARSON, L. Disorders on hemostasis *In: Textbook of Hematology.* Mackenzie, SB Ed. Lea & Febiger. Philadelphia. 417-475. (1988).

LEE C. Y.; *Handbook of Experimental Pharmacology, Snake Venom.* Springer-Verlag, Berlin. 1129. (1979).

MAGRO, A. J.; MURAKAMI, M. T.; MARCUSSI, S.; SOARES, A. M.; ARNI, R. K.; FONTES, M. R.; Crystal structure of an acidic platelet aggregation inhibitor and hypertensive phospholipids A₂ in the monomeric and dimeric states: insights into its oligomeric state. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* New York, **1**, (323), 24-31. (2004).

MATSUI, T. FUJIMURA, Y. TITANI, K. Snake venom proteases affecting hemostasis and thrombosis. *Biochemical et Biophysica Acta.* **1477**. 146-156. (2000).

MONTEIRO, R. Q.; CARLINI, C. R. GUIMARÃES, J. A. ; BOM, C.; ZINGALI, R. B. Distinct bothrojaracin isoform produced by individual jararaca (*Bothrops jararaca*) snakes. *Toxicon.* **35** (5), 649-57. (1997).

MONTEIRO, R. Q.; YAMANOEYE, CARLINI, C. R.; GUIMARÃES, J. A. ; BOM, C.; ZINGALI, R. B. Variability of bothrojaracin isoform and other venom principles in individual jararaca (*Bothrops jararaca*) snakes maintained under seasonally invariant conditions. *Toxicon*. **36** (1), 153-63. (1998).

MONTEIRO R. Q. & ZINGALI, R. B. Inhibition of prothrombin activation by bothrojaracin, a C-type lectin from *Bothrops jararaca* venom. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **382** (1), 123-128. (2000).

MOURA DA SILVA, THEAKSTON, R. D. G.; CRAMPTON, J. M. Evolution of Desintegrin Cystein-Rich and Mammalian Matrix-Degrading Metalloproteinases: Gene Duplication and Divergence of a Common Ancestor Rather Than Convergent Evolution. *Journal of Molecular Evolution* **43**, 263-269. (1996).

NAHAS, L.; KAMIGUTI, A. S.; BARROS, M. A. R. Thrombin-like and factor X Activator components of *Bothrops* snake venoms. *Thrombosis and haemostasis* **2**(41), 314-328. (1979).

NASCIMENTO, N.; Caracterização bioquímica e imunológica dos principais produtos gerados pela irradiação de crotoxina. Tese (Doutorado). Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – IPEN. São Paulo. (1995).

NASCIMENTO, N; SEEBART, C. S; FRANCIS, B; ROGERO, J. R; KAISER, I. I., Influence of ionizing radiation on crotoxin: biochemical and immunological aspects. *Toxicon*, **34**(1):123-131. (1996).

NOLAN, C.; HALL, L. S.; BARLOW, G. H.; Ancrod, the coagulating enzyme of Malayan pit viper (*Agkistrodon rhodostoma*) venom. *Methods in Enzimology*. **45**, 205-213. (1976).

OUYANG, C.; TENG, C. M.; HUYANG, T. F. Characterization of snake venom principles affecting blood coagulation and platelet aggregation. *Asian Pacific J.Pharm.* **2**, 169-179. (1987).

PUORTO, G. Comunicação Pessoal. (2005).

QUEIROZ, L. S.; SANTO NETO, H.; ASSAKURA, M. T.; REICHL, A. P. Pathological changes in muscle caused by haemorrhagic and proteolytic factors from *Bothrops jararaca* Snake Venom. *Toxicon.* **23** (2), 341-5. (1985).

RAWLINGS, N.D.; TOLLE, D. P.; BARRET, A J.; Evolucionary families of peptide inhibitors. *Biochem J.* v. 15, n 378 (Pt) 3, p. 705 – 16. (2004).

READ, M. S.; SHERMER, R. W.; BRINKOUS, K. M. Venom coagglutinin: an activator of platelet aggregation dependent on von Willebrand factor. *Proc.Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **75**, 4514-4518. (1978).

SANO-MARTINS, I. S.; FAN, H. W.; CASTRO, S. C.; TOMY, S. C.; FRANÇA, F. O.; JORGE, M. T.; KAMIGUTI, A. S.; WARREL, D. A.; THEAKSTON, R. D.; Reliability of the simple 20 minute whole blood clotting test (WBCT20) as an indicator of low plasma fibrinogen concentration in patients envenomed by *Bothrops* snakes. *Toxicon.* **32** (9), 1045-50. (1994).

SANTORO, M. L. & SANO-MARTINS, I. S. Different clotting mechanism of *Bothrops jararaca* venom on human and rabbit plasmas. *Toxicon.* **31**, 733-42. (1993).

SPENCER, P. J.; Alterações bioquímicas e imunológicas do veneno de *Bothrops jararacussu* irradiado com ^{60}Co . Dissertação (Mestrado). Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – IPEN. São Paulo. (1995).

STOKER, K. F. in: *Medical Use of Snake Venom Proteins* (Stoker, K. F. Ed). CRC Press, Boston. 97 – 160. (1990).

SUO,Z.; CITRON, B. A.; FESTOFF, B. W.; Thrombin: a potential proinflammatory mediator in neurotrauma and neurodegenerative disorders. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy*. **3**, 105-14. (2004).

ZINGALI, R. B.; JANDROT-PERRUS, M.; GUILLIN, M.; BON, C. Bothrojaracin, a new thrombin inhibitor isolated from *Bothrops jararaca* venom: characterization and mechanism of thrombin inhibition. *Biochemistry* **32**, 10794-10802. (1993).