

**MARIA INÁCIA ESTEVÃO COSTA**

**PROPRIEDADES ANTICOAGULANTES DE DUAS  
METALOPROTEINASES, MUTALISINA I E MUTALISINA II,  
ISOLADAS DO VENENO DA SERPENTE  
*LACHESIS MUTA MUTA***

**BELO HORIZONTE**

**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**

**1997**

**MARIA INÁCIA ESTEVÃO COSTA**

**PROPRIEDADES ANTICOAGULANTES DE DUAS  
METALOPROTEINASES, MUTALISINA I E MUTALISINA II,  
ISOLADAS DO VENENO DA SERPENTE**

*Lachesis muta muta*

*Dissertação apresentada ao Departamento de Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Bioquímica.*

**BELO HORIZONTE**

**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**

**1997**



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
Instituto de Ciências Biológicas  
Curso de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia

ATA DA DEFESA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE MARIA INÁCIA ESTEVÃO  
COSTA REGISTRO 265

Aos vinte e dois dias do mês de maio de 1997, às 10:30 horas, reuniu-se no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais a Comissão Examinadora da dissertação, indicada pelo Colegiado do Curso em 18 de fevereiro de 1997, para julgar em exame final, o trabalho intitulado "PROPRIEDADES ANTI COAGULANTES DE DUAS METALO PROTEINASES, MUTALISINA I E MUTALISINA II, ISOLADAS DO VENENO DA SERPENTE Lachesis muta muta" requisito final para a obtenção do grau de Mestre em Bioquímica e Imunologia. Abriu a sessão o Presidente da Comissão Professor Carlos Ribeiro Diniz, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra a candidata para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores com a respectiva defesa da candidata. Logo após a Comissão reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações: - Profª Jacqueline Isaura Alvarez Leite da UFMG, aprovada; - Prof. Leonides Rezende Junior da UFMG, aprovada; - Prof. Carlos Ribeiro Diniz da UFMG, aprovada. Pelas indicações a candidata foi considerada APROVADA. O resultado final foi comunicado publicamente a candidata pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar o Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ATA, que se assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora Belo Horizonte, 22 de maio de 1997.

Profª JACQUELINE ISAURA ALVAREZ LEITE

Prof. LEONIDES REZENDE JUNIOR

Prof. CARLOS RIBEIRO DINIZ-orientador

BELO HORIZONTE - MG  
UFMG-1997

*À meus pais e irmãos*

***“As serpentes sabem tudo sobre hemostase ...”***

Pentapharm Ltda

## AGRADECIMENTOS

---

*Agradeço...*

*Ao Professor Carlos Ribeiro Diniz pela orientação e apoio para o desenvolvimento deste trabalho. Seu entusiasmo é contagiante...*

*Ao Doutor Eládio O. Flores Sánchez pela orientação segura desde minha iniciação na pesquisa científica. Obrigada pela paciência, pelo incentivo e pela amizade.*

*Ao Professor Arinos Magalhães, pela disposição em ensinar e ainda por ter lido, criticado e feito sugestões muito oportunas durante o desenvolvimento do trabalho. Seu apoio será sempre lembrado. Obrigada...*

*Aos pesquisadores e funcionários do Centro de Pesquisa e Desenvolvimento da Fundação Ezequiel Dias, especialmente à Doutora Consuelo Latorre Fortes-Dias, Doutora Thais Viana de Freitas e Doutor Carlos D. Chávez-Olórtegui por sempre fazerem todo o possível para facilitar nosso trabalho.*

*Ao Doutor Francis S. Markland, do Department of Biochemistry & Molecular Biology - School of Medicine, University of Southern California, por ter me recebido tão gentilmente em seu laboratório e permitido que parte dos experimentos fossem realizados com agilidade.*

*À Professora Maria das Graças Carvalho, do Laboratório de Hematologia, Escola de Farmácia (UFMG), pela indispensável ajuda com os experimentos de agregação plaquetária.*

*À Doutora Mónica Patrícia Revelo Peñafiel da Escola de Medicina (UFMG) por ter gentilmente corrigido o trabalho.*

*Ao Doutor Michael Richardson, por ter lido, crítica e atentamente, o manuscrito.*

*Ao Dário José de Souza pela amizade e ajuda nos ensaios biológicos.*

*À Alice Rodrigues da Silva por sua amizade e eficiência.*

*Aos colegas estudantes do Laboratório de Pesquisa por fazerem com que o trabalho seja sempre tão agradável. Obrigada a todos pela colaboração, bom humor, paciência e carinho.*

MARIA INÁCIA ESTEVÃO COSTA

PROPRIEDADES ANTICOAGULANTES DE DUAS  
METALOPROTEINASES, MUTALISINA I E MUTALISINA II,  
ISOLADAS DO VENENO DA SERPENTE *Lachesis muta muta*

Este trabalho foi realizado no Centro de Pesquisa e Desenvolvimento da  
Fundação Ezequiel Dias sob a orientação dos pesquisadores:

*Professor Dr. Carlos Ribeiro Diniz, Professor do Departamento de  
Bioquímica e Imunologia do ICB, UFMG*

*Dr. Eládio Oswaldo Flores Sanchez, pesquisador da Fundação Ezequiel  
Dias*

BELO HORIZONTE  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

1997

MARIA INÁCIA ESTEVÃO COSTA

PROPRIEDADES ANTICOAGULANTES DE DUAS  
METALOPROTEINASES, MUTALISINA I E MUTALISINA II,  
ISOLADAS DO VENENO DA SERPENTE *Lachesis muta muta*

Este trabalho recebeu apoio financeiro das seguintes instituições:

*Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior  
(CAPES)*

*Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais  
(FAPEMIG)*

*Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)*

*Fundação Ezequiel Dias (FUNED)*

BELO HORIZONTE

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

1997

# SUMÁRIO

---

	<i>página</i>
<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>17</b>
1.1 As serpentes e seus venenos	17
1.2 Mecanismo de indução da hemorragia	18
1.3 Estrutura e classificação das toxinas hemorrágicas	19
1.4 Efeito das metalisinas I e II sobre proteínas componentes do sistema de coagulação e fibrinólise	20
<b>2. OBJETIVOS DO TRABALHO</b>	<b>31</b>
2.1 Objetivos gerais	31
2.2 Objetivos específicos	31
<b>3. MATERIAIS</b>	<b>32</b>
3.1 Veneno	32
3.2 Substratos	32
3.3 Enzimas	32
3.4 Inibidores	33
3.5 Antisoros	<b>33</b>
3.6 Substâncias padrões	33
3.7 Outros reagentes	33
<b>4. METODOLOGIA</b>	<b>34</b>
4.1 Purificação das metaloproteinases	34
4.2 Dosagem de proteína	34
4.3 Eletroforese em gel de poliacrilamida	34
4.4 Imunodifusão	36
4.5 Imunoeletroforese	36
4.6 Atividade hemorrágica	37
4.7 Atividade proteolítica	37
4.7.1 <i>Atividade sobre caseína</i>	37
4.7.2 <i>Atividade sobre dimetilcaseína</i>	38
4.7.3 <i>Atividade sobre azocaseína</i>	38
4.7.4 <i>Atividade sobre “hide powder azure”</i>	38
4.8 Atividade fibrinogenolítica	39

4.9	Atividade fibrinolítica	39
4.10	Isolamento dos fragmentos de fibrinogênio após incubação do substrato com a mutalisina II (LHF-II)	40
4.11	Efeito das mutalisinas I e II (LHF-I e LHF-II) sobre o plasminogênio	41
4.12	Efeito da mutalisina II (LHF-II) sobre proteína C	41
4.13	Efeito da mutalisina II (LHF-II) sobre plaquetas	42
5	<b>RESULTADOS</b>	43
5.1	Purificação das toxinas hemorrágicas do veneno de <i>L. m. muta</i>	43
5.2	Massa molecular	45
5.3	Efeito de inibidores sobre a atividade hemorrágica da mutalisina II (LHF-II)	48
5.4	Atividade fibrinogenolítica das mutalisinas I e II (LHF-I e LHF-II)	50
5.5	Atividade fibrinolítica das mutalisinas I e II (LHF-I e LHF-II)	54
5.5.1	<i>Ensaio em placa de fibrina</i>	54
5.5.2	<i>Análise por SDS-PAGE da hidrólise de fibrina pelas mutalisinas I e II</i>	54
5.6	Isolamento dos fragmentos de fibrinogênio	58
5.7	Efeito das mutalisinas I e II (LHF-I e LHF-II) sobre o plasminogênio	61
5.8	Efeito da mutalisina II sobre a proteína C	63
5.9	Efeito da mutalisina II (LHF-II) sobre a agregação plaquetária induzida pelo colágeno ou ADP	67
6	<b>DISCUSSÃO</b>	68
6.1	Propriedades bioquímicas das mutalisinas	68
6.2	Atividade fibrinogenolítica das mutalisinas I e II	69
6.3	Atividade fibrinolítica das mutalisinas I e II	70
6.4	Isolamento dos fragmentos do fibrinogênio após incubação com a mutalisina II	71
6.5	Efeito dos fatores hemorrágicos sobre o plasminogênio	72
6.6	Efeito da mutalisina II sobre a proteína C	73
6.7	Efeito da mutalisina II (LHF-II) sobre a agregação plaquetária induzida pelo colágeno ou ADP	74
7	<b>CONCLUSÕES</b>	77
8	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	79

## *LISTA DE ABREVIATURAS*

---

ADAMs	A Disintegrin-like And Metalloproteinase
ADP	Adenosina difosfato
BAPNA	Cloridrato de N-benzoil (DL ou L)-arginil-pNitroanilida)
Bis-acrilamida	N', N'-Metileno-bisacrilamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
HPLC	Cromatografia líquida de alta resolução
IC <sub>50</sub>	Concentração que inibe 50% da agregação plaquetária
kDa	Kilo Dalton
LHF-I	Lachesis hemorrhagic factor I
LHF-II	Lachesis hemorrhagic factor II
Mr	Massa molecular
PMSF	Fluoreto de fenilmetilsulfonila
pNa	p-nitroanilida
Proteína Ca	Proteína C ativada
SBTI	Inibidor de tripsina de feijão de soja
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS
SVMPs	Snake Venom Metalloproteinases
TCA	Ácido tricloroacético
TLCK	N $\alpha$ -p-Tosyl L-Lysine Ethyl Ester
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletilenodiamina
TNBS	Ácido Trinitrobenzenosulfônico
Tris	Tris(hidroximetil)aminometano
WHO	Organização Mundial de Saúde

## *LISTA DE TABELAS*

---

		<i>Página</i>
TABELA I	Propriedades das metaloproteinases (mutalisina I e II) isoladas do veneno de <i>Lachesis muta muta</i>	25
TABELA II	Efeito de alguns inibidores sobre a atividade hemorrágica da mutalisina-I (LHF-I)	49
TABELA III	Atividade fibrinogenolítica das mutalisinas I e II (LHF-I e LHF-II)	51
TABELA IV	Efeito das metaloproteinases LHF-I, LHF-II, veneno bruto de <i>L. m. muta</i> e streptokinase como potenciais ativadores de plasminogênio	63
TABELA V	Efeito da mutalisina II sobre a Proteína C	66

## LISTA DE FIGURAS

---

	<i>Página</i>
FIGURA 1	A serpente <i>Lachesis muta muta</i> 26
FIGURA 2	Classificação das metaloproteinases de venenos de serpentes 27
FIGURA 3	Mecanismo de ação dos fatores de venenos de serpentes que afetam o sistema de coagulação 44
FIGURA 4	Cromatografia do veneno bruto de <i>L. m. muta</i> em coluna de Sephacryl S-200 46
FIGURA 5	SDS-PAGE das mutalisinas I e II (LHF-I e LHF-II) purificadas do veneno de <i>L.m. muta</i> 52
FIGURA 6	Hidrólise do fibrinogênio pela mutalisina I (LHF-I) 53
FIGURA 7	Hidrólise do fibrinogênio pela mutalisina II (LHF-II) 55
FIGURA 8	Atividade fibrinolítica das mutalisinas I e II (LHF-I e LHF-II) e veneno de <i>L. m. muta</i> medida em placa de fibrina 56
FIGURA 9	Hidrólise da fibrina pela mutalisina I (LHF-I) 57
FIGURA 10	Hidrólise da fibrina pela mutalisina II (LHF-II) 59
FIGURA 11	HPLC fase reversa do fibrinogênio controle e depois de incubado com a mutalisina II por 20 minutos 60
FIGURA 12	Hidrólise parcial do plasminogênio pela mutalisina II (LHF-II) 62

- FIGURA 13 Efeito das mutalisinas I e II (LHF-I e LHF-II) e 64  
streptokinase como potenciais ativadores do  
plasminogênio
- FIGURA 14 Efeito da mutalisina II (LHF-II) sobre a agregação 67  
plaquetária induzida pelo colágeno ou ADP em plasma  
humano rico em plaquetas

## RESUMO

---

Dois fatores hemorrágicos, mutalisina I e II (LHF-I e LHF-II), foram isolados do veneno de *Lachesis muta muta* por processos cromatográficos convencionais de filtração molecular e troca iônica, correspondendo a 12 e 1%, respectivamente, da atividade hemorrágica do veneno. Estes componentes foram caracterizados como metaloendoproteinasas contendo zinco e cálcio. LHF-I (100 KDa, dímero) e LHF-II (22,5 KDa, cadeia polipeptídica simples) hidrolisam o fibrinogênio com especificidade  $A\alpha > B\beta$ , gerando produtos solúveis e fibrinogênio incoagulável pela trombina. A atividade fibrinogenolítica específica foi estimada em 25,5 e 13,0 mg de fibrinogênio/min/mg de enzima para LHF-II e LHF-I, respectivamente. *In vitro*, as mutalisinas dissolvem coágulos de fibrina bovina e humana por proteólise direta. A análise por SDS-PAGE da hidrólise de fibrina pelas duas metaloproteinasas mostra que o fator LHF-II (0,22  $\mu$ M) digere completamente as cadeias  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ . Em contraste, o fator LHF-I (0,56  $\mu$ M) hidrolisa seletivamente a cadeia  $\alpha$  da fibrina sem afetar as cadeias  $\beta$  e  $\gamma$ . As mutalisinas I e II pertencem ao grupo de fibrinogenases que produzem hemorragia sem formação de coágulo. Diferentemente dos agentes usados na terapia trombolítica, tais como a streptokinase, LHF-I e LHF-II não ativam o plasminogênio. A mutalisina II não ativa a proteína C plasmática e não inibe a agregação plaquetária induzida pelo colágeno ou ADP. As metaloproteinasas hemorrágicas, além de ação direta sobre as paredes dos capilares devem afetar outros componentes do sistema hemostático, cuja evolução pode levar à hemorragia fatal e aos eventos tromboembólicos observados nos acidentes causados por serpentes .

## SUMMARY

---

Two hemorrhagic factors, mutalysin I and II (LHF-I and LHF-II) were isolated from bushmaster snake (*Lachesis muta muta*) venom by gel filtration and ion exchange chromatography. The purified proteins represent 12 and 1% respectively of the hemorrhagic activity in the whole venom. The mutalysins were characterized as metalloendopeptidases and contain zinc and calcium. LHF-I (100 kDa, two subunits) and LHF-II (22,4 kDa, single chain) hydrolyze the  $A\alpha > B\beta$  of fibrinogen without clot formation. The specific fibrinolytic activity was estimated as 25.5 and 13 mg of fibrinogen/min/mg protein for LHF-II and LHF-I respectively. *In vitro*, the mutalysins showed direct fibrinolytic activity. Analysis by SDS-PAGE of fibrin hydrolysis by both metalloenzymes showed that LHF-II (0.22  $\mu$ M) digested completely the  $\alpha$ ,  $\beta$  and  $\gamma$  chains. On the other hand, LHF-I (0.56  $\mu$ M) hydrolyzes selectively the  $\alpha$  chain of fibrin, leaving the  $\beta$  and  $\gamma$  chains unaffected. The mutalysins I and II are fibrinogenases which induce hemorrhage without clot formation. In contrast with the plasminogen activator - based thrombolytic agents such as streptokinase, LHF-I and LHF-II do not activate plasminogen. Mutalysin II has no effect on protein C activation and does not inhibit platelet aggregation in human PRP stimulated by ADP or collagen. In addition to hemorrhagic effect by direct proteolysis on capillary walls, the hemorrhagic toxins can digest other protein components of the haemostatic system and also activate endogenous proteinases.

## 1.1 As serpentes e seus venenos

Os venenos de serpentes das famílias Viperidae e Crotalidae caracterizam-se por desencadearem choque, coagulação intravascular, necrose tecidual e hemorragia local e sistêmica no homem, em animais de experimentação e em animais domésticos vítimas de acidentes ofídicos (Seegers e Ouyang, 1979; Iwanaga e Suzuki, 1979). A morte da vítima, quando ocorre, é resultado de efeitos combinados dos diversos componentes do veneno. A peçonha da maioria das serpentes exercem efeitos fisiológicos e farmacológicos em tecidos excitáveis, no sistema cardiovascular, na permeabilidade vascular, disfunção renal e alterações na hemostase. De acordo com Teng e Huang (1991), as atividades biológicas dos venenos de serpentes podem ser divididas em componentes que aceleram os processos hemostáticos e aqueles que inibem estes processos. Entre os componentes que aceleram a hemostasia incluem-se os fatores que induzem agregação de plaquetas, ativadores do fator X, ativadores da protrombina e as enzimas coagulantes do fibrinogênio (semelhantes à trombina). Entre os componentes que inibem a hemostasia incluem-se as enzimas fibrinogenolíticas, os inibidores da ativação da protrombina e fator X e os inibidores da agregação plaquetária (Niewiarowski e cols., 1994).

Nos países da América do Norte o envenenamento pelas serpentes Viperidae dos gêneros *Agkistrodon*, *Sistrurus* e *Crotalus* e, na América Central e do Sul, *Lachesis* e *Bothrops*, tem como característica mais notável a hemorragia generalizada (Bjarnason e Tu, 1978; Assakura e cols., 1985; Sanchez e cols., 1987, 1991a, 1992; Mandelbaum e Assakura, 1988; Ran e cols., 1988). Observa-se na peçonha destas serpentes altas concentrações de enzimas proteolíticas. Algumas delas atuam diretamente na indução de hemorragia.

A potência hemorrágica dos venenos e de suas toxinas isoladas é usualmente estimada pela determinação da dose hemorrágica mínima (DHM). A DHM é definida como a menor concentração de proteína capaz de produzir uma lesão hemorrágica de 10 mm de diâmetro em 24 horas após injeção intradérmica ou subcutânea na pele dorsal de camundongos, ratos ou coelhos, de acordo com o método desenvolvido por Kondo e cols. em 1960.

Em geral, a peçonha das serpentes Viperidae contem um ou vários componentes que induzem hemorragia por ação direta nas paredes dos capilares sanguíneos (Ohsaka, 1976,1979; Ownby e Geren, 1987; Tu, 1988, 1991 ). Estes componentes recebem diferentes nomes pelos pesquisadores que os purificaram: toxinas hemorrágicas, fatores hemorrágicos, princípios hemorrágicos, proteases hemorrágicas ou simplesmente hemorraginas.

## **1.2 A serpente *Lachesis muta muta***

A serpente *Lachesis muta* (Linnaeus, 1766) da família Viperidae, sub-família Crotalinae, é a maior serpente venenosa das Américas. No Brasil é conhecida por surucucu, surucucu pico-de jaca e surucutinga. O gênero *Lachesis* é peculiar por conter uma única espécie, *L. muta*. Dentro da espécie são descritas quatro sub-espécies: *L. m. melanocephala*, restrita à Costa Rica (Solorzano e Cerdas, 1986); *L. m. stenophris* encontra-se nas florestas úmidas da Costa Rica e do Panamá; *L. m. rhombeata* vive na Mata Atlântica brasileira, desde Alagoas até o Rio de Janeiro e, em Minas Gerais, nas matas dos rios Doce e Mucuri. *L. muta muta* ocupa a maior extensão territorial, vivendo nas florestas equatoriais do Brasil (Amazônia), Colômbia, Guianas, Peru e Bolívia (Cunha e Nascimento, 1975, 1982; Meneses, 1974; Hoge e Romano, 1978; Carrillo, 1983; De La Vega e cols., 1989).

*L. muta muta*, mesmo sendo responsável por um pequeno número de acidentes ofídicos no Brasil (Dourado e cols., 1988), é a serpente peçonhenta mais temida pelos habitantes da região amazônica pela gravidade dos acidentes e pelo seu tamanho. A surucucu pode ultrapassar 2 m, conseqüentemente possuindo maior volume de veneno injetável. Estudos

realizados na Fundação Ezequiel Dias (FUNED) por Sanchez e cols., (1992), envolvendo serpentes mantidas em cativeiro, revelaram que pode-se extrair mais de 300 mg de veneno, em peso seco, por serpente. Este fato, aliado à alta atividade hemorrágica específica da peçonha, fazem da *L. m. muta* a serpente mais eficiente para induzir intoxicação de origem hemorrágica.

O veneno da *L. m. muta* apresenta efeitos proteolíticos (coagulante, hemorrágico, necrosante, liberador de cininas, indutor de edema) e também neurotóxicos (Brasil e Vellard, 1928; Vellard, 1948; Deutsch e Diniz, 1955; Magalhães e cols., 1973, 1981; Gutierrez e Chaves, 1980; Silva e cols., 1985; Da Silva e cols., 1989; Silveira e cols., 1989; Yarleque e cols., 1989; Zavaleta e cols., 1989; Sanchez e cols., 1987, 1991a, b, 1992; 1995a, b; Lima-Ferreira, 1990; Diniz e Oliveira, 1992).

Baseado na quantificação do efeito hemorrágico do veneno da *L. m. muta*, Sanchez e cols. (1987, 1991a) purificaram ao estado homogêneo duas proteínas responsáveis pela indução de hemorragia em mamíferos os quais foram designados como fatores hemorrágicos (FH), destacando-se com letras o nome do gênero e em números romanos a ordem de eluição na filtração molecular em gel, LHF-I e LHF-II (Lachesis hemorrhagic factor I e II). De maneira semelhante às outras toxinas hemorrágicas de venenos Viperideos descritas na literatura, os fatores LHF-I e LHF-II foram caracterizados como metaloproteinases (Sanchez e cols., 1987, 1991a, 1995b; Bjarnason e Fox, 1994, 1995). Algumas propriedades das metaloproteinases hemorrágicas de *L. m. muta* são apresentadas na tabela I.

### **1.3 Mecanismo de indução da hemorragia**

O mecanismo de indução da hemorragia envolve lesão das fibras de colágeno e alteração das proteínas da matriz extracelular dos capilares, resultando na desorganização da parede dos mesmos e extravasamento do plasma (originando edema) e das hemácias para os tecidos adjacentes. Ownby e cols. (1990), observaram que células endoteliais de camundongos quando tratadas com proteínas hemorrágicas sofrem inchamento causando compressão do

citoplasma e conseqüente ruptura das membranas, o que pode levar ao extravasamento do sangue. É importante salientar que o efeito direto das proteínas hemorrágicas é frequentemente exacerbado pela ação sinérgica de outros componentes do veneno ou pelas múltiplas atividades de uma mesma enzima, entre as quais merece destacar a ativação da fibrinólise (ação fibrinogénásica), inibição da função das plaquetas (ação de desintegrinas e de toxinas hemorrágicas) ou trombocitopenia (por ativação das plaquetas). Devemos também destacar os efeitos indiretos que estimulam o sistema fibrinolítico por ativação do plasminogénio tissular das células endoteliais lesadas por proteinases hemorrágicas assim como a ativação de proteinases endógenas (Hutton e Warrell, 1993; Bjarnason e Fox, 1994). Com um baixo nível de envenenamento, estes efeitos podem ficar restritos ao sítio da picada, mas efeitos sistêmicos potencialmente letais como hipotensão e falência circulatória devido à perda de fluido para o compartimento extravascular podem ocorrer. Se o envenenamento for grave também pode ocorrer hemorragia gengival, gastrointestinal ou hemorragia cerebral (Ownby e Geren, 1987; Tu, 1991).

#### **1.4. Estrutura e Classificação das Toxinas Hemorrágicas**

A massa molecular das metaloproteinases (hemorrágicas ou não hemorrágicas) varia de 20 a 100 kDa. Todas estas proteínas apresentam região invariável de consenso **HEXXHXXGXXH** onde três resíduos de histidina coordenam-se ao zinco no sítio catalítico (Sanchez e cols., 1991b; Bode e cols., 1993; Bjarnason e Fox, 1994, 1995; Stocker e cols., 1995). Com base em recentes estudos estruturais, as Metaloproteinases de Venenos de Serpentes (MPsVS), são agrupadas de acordo com o número de domínios presentes na estrutura da proteína nascente. Quatro principais classes denominadas P-I a P-IV (Proteínas classe I a IV) são apresentadas na figura 1 (Kini e Evans, 1992; Paine e cols., 1992; Hite e cols., 1992, 1994; Baker e cols., 1995; Bjarnason e Fox, 1994, 1995). Estas proteínas são sintetizadas como zimogénios os quais são rapidamente processados à forma ativa nas glândulas veneníferas. Esta informação é sustentada pela identificação de pré- e pro-domínios nas

metaloproteinases dos venenos viperídeos descritos nos últimos anos (Hite e cols., 1994).

Na classe P-I estão agrupadas as proteínas hemorrágicas de baixa massa molecular ( $M_r \sim 23$  kDa), constituídas de 200 a 204 resíduos de aminoácidos, que correspondem ao domínio de metaloproteinase na forma madura da proteína. A região de ligação ao zinco, que é estritamente conservado nas MPsVS encontra-se neste domínio. O fator LHF-II, de 22,5 kDa,  $pI$  6,6 e formado de 200 resíduos de aminoácidos em cadeia polipeptídica simples, é membro desta classe de metaloendopeptidases (Sanchez e cols., 1991b). Outros exemplos de metaloproteinases da classe P-I, cuja sequência completa de aminoácidos foi elucidada recentemente são encontrados nos venenos de *Trimeresurus flavoviridis* (Miyata e cols., 1989; Takeya e cols., 1989, 1990), *Crotalus atrox* (Shannon e cols., 1989; Baker e cols., 1995; Hite e cols., 1994), *Agkistrodon contortrix contortrix* (Randolph e cols., 1992) e *T. mucrosquamatus* (Tsai e cols., 1994).

A estrutura tridimensional da adamalisina II, isolada do veneno de *C. adamanteus*, que representa o protótipo das MPsVS (Gomis-Ruth e cols., 1993), e da atrolisina *c* (Ht-c) do veneno de *C. atrox* (Zhang e cols., 1994) mostram claramente que estas enzimas apresentam forma elipsoidal com o sítio catalítico separando o domínio maior superior do domínio menor inferior. No sítio catalítico do LHF-II, o átomo de zinco é coordenado pelas histidinas 140, 144, 150 e uma molécula de água em forma tetraédrica, contendo, além disso, o glu 141 que atua como base catalítica durante a proteólise. É importante ressaltar que tanto as adamalisinas quanto as astacinas (enzimas colagenolíticas do trato digestivo de lagosta), as serralisinas (metaloproteinases da bactéria *Serratia*) e as matrixinas (metaloproteinases da matriz e colagenases de mamíferos) apresentam um resíduo metionina estritamente conservado, formando uma alça ("Met-turn") que constitui a base hidrofóbica para a interação com o substrato. Baseado neste fato, as quatro famílias de metaloproteinases mencionadas são agrupadas dentro de uma grande superfamília denominada **metzincins** (Bode e cols., 1993; Stocker e cols., 1995).

A classe P-II apresenta um domínio adicional no C-terminal do domínio de proteinase, o domínio semelhante à desintegrina (“disintegrin-like”). A função biológica deste domínio parece ser homóloga à dos peptídeos desintegrinas amplamente distribuídos nos venenos de serpentes Viperidae. As desintegrinas formam uma família de peptídeos de baixa Mr que inibem as funções de adesão celular de uma variedade de integrinas (ex., fibrinogênio) nas superfícies celulares (Dennis e cols., 1990; Scarborough e cols., 1991, 1993a; Williams, 1992; Trikha e cols., 1994; Calvete, 1995). O efeito destes peptídeos deve-se à presença da sequência Arg-Gly-Asp (RGD) ou Lys-Gly-Asp (KGD) responsáveis pela interação com as integrinas. A toxina hemorrágica e (atrolisina e, 26 kDa), isolada do veneno de *C. atrox*, é um exemplo de proteína da classe P-II. Pelo fato das metaloproteinases sofrerem processamento proteolítico, a forma madura da atrolisina e (Ht-e) perde o domínio semelhante à desintegrina (Hite e cols., 1994).

A classe P-III apresenta o domínio rico em cisteína (“high Cysteine”) em adição aos domínios metaloproteinase e semelhante à desintegrina. Três membros desta classe com sequência completa de aminoácidos e/ou cDNA inclui: Ht-a (atrolisina a, 60 kDa) do veneno de *C. atrox*; HR1B (60 kDa) do veneno de *T. flavoviridis*; jararagina (52 kDa) de *B. jararaca* e catrocolastatina (50 kDa) de *C. atrox* (Takeya e cols., 1990; Paine e cols., 1992; Hite e cols., 1994; Zhou e cols., 1995). A forma madura destas proteinases é mais potente na indução de hemorragia em mamíferos do que as proteínas de baixa Mr (classes P-I e P-II).

Finalmente, a classe P-IV apresenta no C-terminal do domínio rico em cisteína, o domínio de ligação à lectina (“lectin-like”). Até o presente, dois membros desta classe foram identificados, RVV-X (russelisina) do veneno de *Vipera russelli* (Takeya e cols., 1992; Gowda e cols., 1994) e mucrotoxina A, do veneno de *T. mucrosquamatus* (Kishida e cols., 1985). A RVV-X é uma metaloproteinase não hemorrágica de 93,4 kDa, formada por três subunidades de 57,6 , 19,4 e 16,4 kDa ( $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ , respectivamente). Esta enzima é o ativador do fator X do sistema de coagulação sanguínea. Embora os dados moleculares não tenham sido totalmente esclarecidos, pode-se especular que a RVV-X é

traduzida como um precursor de seis domínios (pre-, pro-, proteinase, semelhante à desintegrina, rico em cisteína e de ligação à lectina) de uma molécula grande que é proteoliticamente clivada para produzir a estrutura de três cadeias.

A mucrotoxina A é uma toxina hemorrágica de 94 kDa. Os dados preliminares da sequência de aminoácidos indicam que se trata de uma glicoproteína em mosaico, com o domínio C-lectina homólogo à RVV-X (Bjarnason e Fox, 1995). Os estudos estruturais sugerem que o forte efeito hemorrágico das toxinas classe III e IV seria causado pelo efeito cooperativo dos domínios de proteinase e dos domínios semelhantes à desintegrina das moléculas. A região desintegrina deve ser importante na adesão das metaloproteinases dos venenos às moléculas alvo, provavelmente em integrinas localizadas no endotélio vascular (Takeya e cols., 1993; Niewiarowski e cols., 1994).

Bjarnason e Fox em duas interessantes revisões (1994, 1995), salientaram a necessidade de novos dados estruturais, bem como de outros exemplos de metaloproteinases da classe P-IV. Os recentes dados da literatura apontam o fator LHF-I (100 kDa, duas subunidades), isolado do veneno de *Lachesis muta muta*, como um bom candidato da classe P-IV (Sanchez e cols., 1987, 1995b; Blobel e White, 1992; Bjarnason e Fox 1994, 1995).

Baseado nos dados estruturais, uma variedade de atividades funcionais, tais como hemorragia, anti-coagulação, pro-coagulação e causadoras de edema, são atribuídas às MPsVS (Retzios e Markland, 1988; Markland, 1991; Blobel e White, 1992; Bjarnason e Fox, 1994). Ao domínio carboxi-terminal das classes P-II, P-III e P-IV, é atribuída a função de modular a atividade total da proteína. Por exemplo, o domínio semelhante à desintegrina deve desempenhar importante função na orientação da enzima para um sítio particular das plaquetas ou das células endoteliais, onde a proteinase deve clivar substratos tais como integrinas, proteínas da coagulação, da matriz ou outras proteínas endógenas (Blobel e White, 1992; Usami e cols., 1994; Rawlings e Barrett, 1995; Zhou, 1995; Bjarnason e Fox, 1994, 1995; Sanchez e cols., 1995b). Na classe P-IV, onde é encontrado o domínio de ligação à lectina, este domínio

deve desempenhar uma função semelhante ao domínio da desintegrina localizando a enzima aos substratos específicos para a proteólise.

É importante salientar a descoberta da família de proteínas homólogas às zinco- metaloendopeptidases das MPsVS em uma variedade de organismos que incluem espermatozoides de cobra e outras células de mamíferos, répteis e invertebrados (Wolfsberg e cols., 1993, 1995; Wolfsberg e White, 1996). Wolfsberg e cols. (1993) denominaram **ADAMs** ao gene desta família de metaloproteínases que contém um domínio semelhante à desintegrina (**A Disintegrin-like And Metalloproteinase**). Simultaneamente, Bjarnason e Fox (1994) sugeriram o nome **Reprolysins** (subfamília) para ambos os grupos de metaloproteínases, considerando a sua origem, répteis, bem como sua relação com as proteínas reprodutivas de mamíferos. Esta denominação é mais conveniente e é baseada em dados moleculares, na sequência conhecida de 14 metaloproteínases e nas estruturas tridimensionais da adamalisina II, isolada do veneno de *C. adamanteus* e da atrolisina c, de *C. atrox* (Gomis-Ruth e cols., 1993; Zhang e cols., 1994; Stocker, 1995). Recentemente o Comitê de Nomenclatura da International Union of Biochemistry and Molecular Biology (IUBMB) (Eur. J. Biochem., 1994, 1995, 1996) revisou os nomes triviais e designou os números EC para 17 MPsVS. Neste contexto, o veneno de *L. m. muta* apresenta pelo menos duas classes de reprotisinas, que foram denominadas **mutalisina I** (LHF-I, 100 kDa, cuja sequência de aminoácidos ainda não é conhecida) e **mutalisina II** (LHF-II, 22,5 kDa, cuja sequência de aminoácidos foi determinada) (Sanchez, 1997). Por este motivo, nesta dissertação nos referiremos às metaloproteínases LHF-I e LHF-II como mutalisina I e mutalisina II, respectivamente.

TABELA I

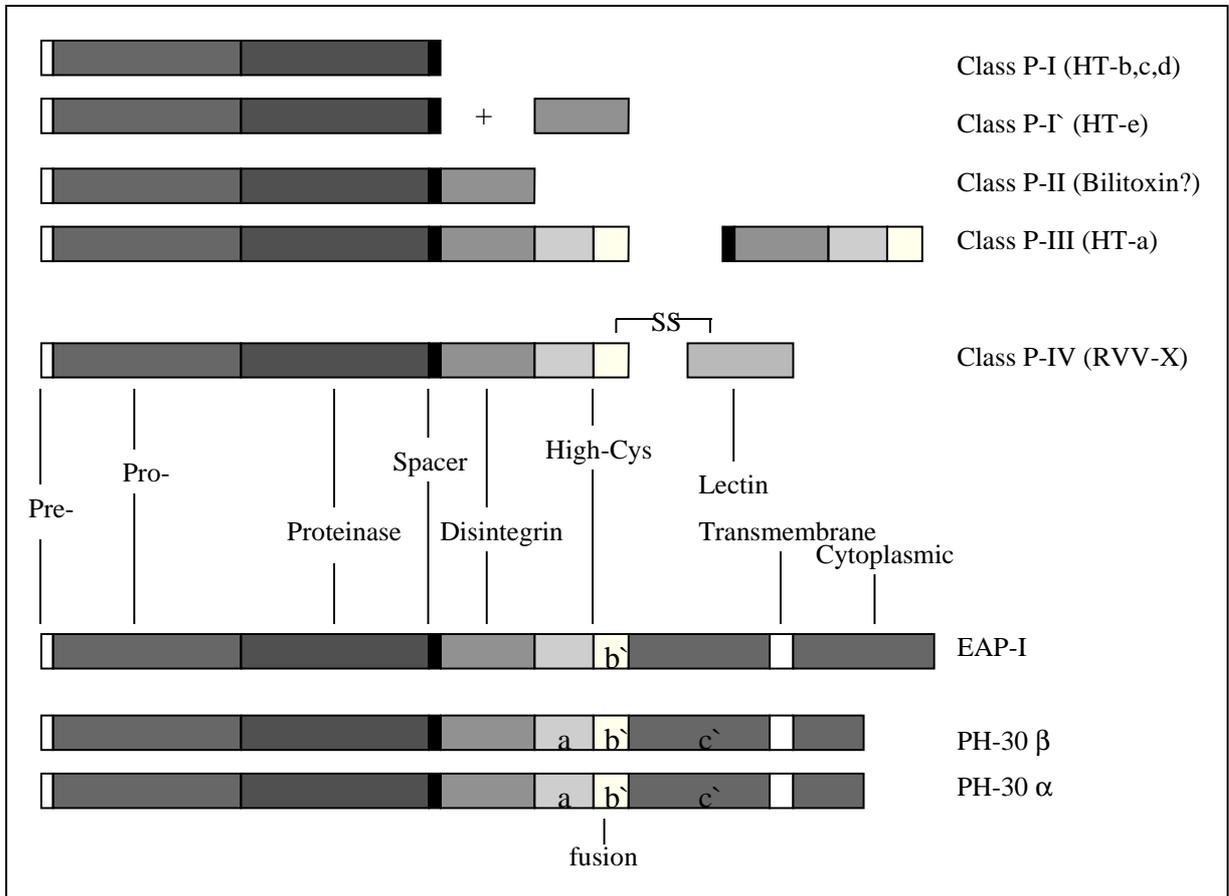
**Propriedades das metaloproteinases (mutalisina I e II)  
isoladas do veneno de *Lachesis muta muta***

Propriedade		Mutalisina I	Mutalisina II
Nome comum		LHF-I	LHF-II
Mr (kDa)		100 (2 subunidades)	22,5 (cadeia simples)
Resíduos de aminoácidos		ND	200
pI		4,7	6,6
Presença de carboidrato		+	-
Presença de metais			
(mol/molécula)	Ca <sup>2+</sup>	1,2	2,0
	Zn <sup>2+</sup>	0,7	1,0
pH ótimo		8,0	8,5
Inibidores		EDTA, EGTA, cisteína β-mercaptoetanol Ac policlonal anti-LHF-I	EDTA, EGTA, cisteína Ac monoclonal anti-veneno de <i>L. m. muta</i>
Atividades:			
caseinolítica (Units/mg)*		0,09	2,48
hemorrágica (Units/mg)**		2.000	62,0
fibrinogenolítica		Aα > Bβ	Aα > Bβ
fibrinolítica		α	α > β
cliva cadeia β da insulina na posição:		Ala <sub>14</sub> - Leu <sub>15</sub>	Ala <sub>14</sub> - Leu <sub>15</sub> His <sub>5</sub> - Leu <sub>6</sub> His <sub>10</sub> - Leu <sub>11</sub> Phe <sub>24</sub> - Phe <sub>25</sub>

\*Uma unidade é definida como A 280/min.

\*\*Uma unidade é definida como a dose hemorrágica mínima (DHM).

ND: não determinado.



**Figura 1 - Classificação das metaloproteinases de venenos de serpentes (Hite e cols., 1994).**

## 1.5. Efeito das mutalinas I e II sobre proteínas componentes do sistema de coagulação e fibrinólise

Proteínas de venenos de serpentes com atividades pró-coagulantes ou anticoagulantes têm recebido especial atenção nas últimas décadas, pelo fato de que muitas delas representam ferramentas valiosas para pesquisas na área da hemostasia e trombose; assim, alguns componentes dos venenos são utilizados em testes laboratoriais, para diagnóstico ou como agentes terapêuticos (Markland 1988; Stocker, 1990; Teng e Huang, 1991; Hutton e Warrell, 1993).

Os mecanismos de ação de alguns dos componentes de venenos de serpentes que afetam os sistemas da coagulação sanguínea e da fibrinólise estão apresentados na figura 2.

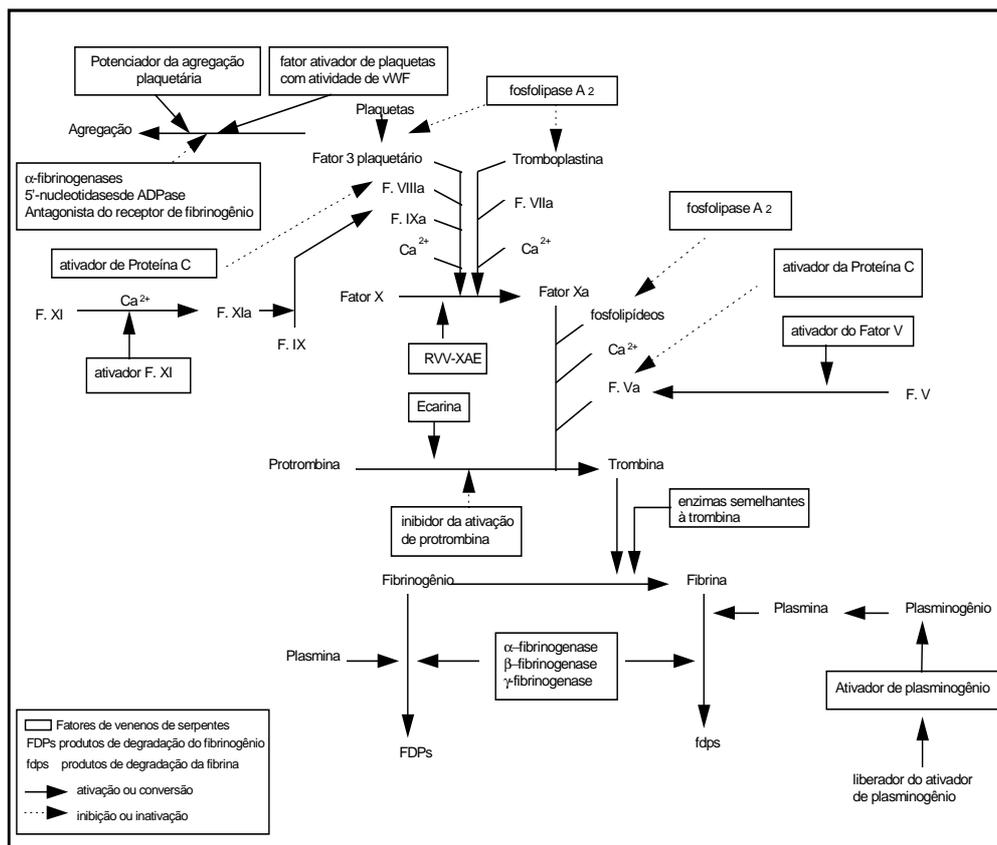


Figura 2 - Mecanismo de ação dos fatores de serpentes que afetam o sistema de coagulação (Ouyang e cols., 1992).

Em 1700 Fontana foi o primeiro a observar que quando ocorria morte de um animal devido à picada por serpente, o sangue permanecia incoagulável. Mais tarde, Mitchell (1860) e Reichert (1886) em estudos mais amplos envolvendo venenos de serpentes *Crotalus* norte-americanos, observaram que o sangue coagulava quando o animal morria rapidamente. No entanto, quando a morte era lenta, o sangue tornava-se incoagulável (em Markland, 1991). A partir dessas observações e de numerosos estudos descritos na literatura, sabemos hoje que esses efeitos são provavelmente causados pela ação combinada das enzimas coagulantes (thrombin-like) e fibrino(geno)líticas (Markland, 1991; Ouyang e cols., 1992).

As enzimas coagulantes do fibrinogênio, cujo efeito deve-se à liberação dos fibrinopeptídeos A e/ou B, são os componentes do tipo ativadores da coagulação mais comuns nos venenos de serpentes Viperidae. Alguns exemplos destas enzimas utilizadas como agentes defibrinogênicos são: arvina, isolada do veneno de *C. rhodostoma* (registrada como Ancrod pela Armour Pharmaceuticals), bothropsobina (reptilase) do veneno de *B. atrox*, bothroxobina isolada do veneno de *B. moojeni* (registrada como defibrase pela Pentapharm Ltda) e venzyme do veneno de *A. contortrix* (Shainoff e Welches, 1988; Stocker e Meier, 1988; Stocker, 1990; Hutton e Warrell, 1993).

Do veneno de *L. m. muta* (espécie brasileira) foi isolada a enzima coagulante do fibrinogênio que libera fibrinopeptídeo A (Silveira e cols., 1989). Da espécie peruana, Yarleque e cols. (1989) isolaram uma enzima, provavelmente a mesma isolada por Silveira e cols., que libera fibrinopeptídeos A e B. A enzima coagulante do veneno de *L. m. rhombeata*, denominada clotase por Magalhães e cols. (1981), foi testada como agente defibrinogênico em cães.

As enzimas fibrino(geno)líticas ou fibrinogênases são agrupadas operacionalmente como enzimas que degradam preferencialmente a cadeia  $\alpha$  ou  $\beta$  do fibrinogênio e/ou fibrina, respectivamente, gerando produtos que tornam o fibrinogênio incoagulável pela trombina. Baseado nestas propriedades e na ampla especificidade proteolítica, estas enzimas são catalogadas como anticoagulantes (Marsh, 1994). As proteases fibrino(geno)líticas são endoproteínases de ação direta e não requerem outros fatores para sua

atividade. Elas não liberam fibrinopeptídeos A ou B e não induzem a formação de fibrina. Além disto, elas são diferentes da plasmina (Markland, 1991; Ouyang e cols., 1992; Teng e Huang, 1992; Hutton e Warrell, 1993). Dados recentes da literatura têm demonstrado que as proteinases hemorrágicas degradam proteínas componentes da matriz extracelular, fibrinogênio e outras integrinas (Bjarnason e cols., 1988; Baramova e cols., 1989; Bjarnason e Fox, 1994,1995). Assim, em algumas espécies, a atividade hemorrágica dos venenos parece estar associada com a atividade fibrino(geno)lítica (Retzios e Markland, 1988; Takeya e cols., 1993; Sanchez e cols., 1991a, 1995b).

As enzimas com especificidade para a cadeia  $\alpha$  do fibrinogênio e/ou fibrina são denominadas  $\alpha$ -fibrinogenases. Elas são zinco-metaloendopeptidases (Mr: 20 a 34 kDa), completamente desprovidas de atividade arginil esterase. Em vários estudos tem-se demonstrado sua inibição por  $\alpha_2$ -macroglobulina sérica. No entanto, elas não são afetadas pelos inibidores de serino-proteinases do plasma (Pandya e Budzynski, 1984; Markland, 1988). Estas proteínas são encontradas em serpentes Viperidae dos gêneros *Agkistrodon*, *Bothrops*, *Crotalus*, *Trimeresurus* e *Lachesis* e representam constituintes comuns dos venenos destas serpentes. Finalmente, outras toxinas hemorrágicas com Mr de 57 a 100 kDa dos venenos de *A. acutus*, *C. atrox*, *C. h. horridus*, *C. r. ruber*, *T. flavoviridis*, *T. mucrosquamatus*, *T. gramineus* e *L. m. muta* foram descritas com atividade  $\alpha$ -fibrinogenásica (Yagihashi e cols., 1986; Nikai e cols., 1984; Civello e cols., 1983; Mori e cols., 1984; Bjarnason e Fox, 1994; Sanchez e cols., 1995b).

O segundo grupo de enzimas fibrino(geno)líticas são aquelas com especificidade para a cadeia  $\beta$  do fibrinogênio e/ou fibrina. Em contraste com as  $\alpha$ -fibrinogenases, estas são serino-proteinases com atividade arginil esterase e são inibidas pelo PMSF ou DFP. No entanto, estas enzimas são diferentes das enzimas coagulantes que liberam fibrinopeptídeos A ou B (Markland, 1991; Ouyang, Teng e Huang, 1992; Hutton e Warrell, 1993).

Somente a toxina hemorrágica *f* do veneno de *C. atrox* foi até agora descrita como específica para a cadeia  $\gamma$  do fibrinogênio (Nikai e cols., 1984).

As  $\alpha$ -fibrinogenases têm despertado o interesse dos pesquisadores da área de química de proteínas para estudo da relação estrutural e evolutiva com outras enzimas proteolíticas. Algumas destas proteínas têm sido usadas para esclarecer os mecanismos estruturais envolvidos na polimerização da fibrina e na remoção do fibrinogênio do sangue em condições *in vivo* e *in vitro*. De acordo com estudos experimentais *in vivo*, a atividade fibrinolítica direta e sua resistência aos inibidores das serino-proteinases plasmáticas lhes conferem vantagens teóricas para serem utilizadas como agentes terapêuticos na dissolução de coágulos em condições patológicas.

Duas enzimas fibri(noge)nolíticas (Mr ~ 23 kDa, classe I), atroxase do veneno de *C. atrox* (Willis e Tu, 1988) e fibrolase de *A. c. contortrix* têm demonstrado serem eficientes agentes trombolíticos em modelos experimentais *in vivo* (Markland e cols., 1994). No entanto, a terapia trombolítica com rt-PA ou streptokinase, está associada com retrombose em um número significativo de casos. Esses resultados representam os pacientes que receberam concomitantemente aspirina e/ou heparina (Plow e cols., 1987; Rote e cols., 1993; Collen e cols., 1994; Lijnen e Collen, 1994).

Na busca de agentes trombolíticos mais eficientes, alguns pesquisadores têm estudado a possibilidade de construir uma nova geração de compostos orientados tanto à dissolução dos coágulos (trombolíticos) quanto à inibição da agregação plaquetária (antitrombóticos). Assim, mediante o uso de “cross-linkers” bifuncionais, recentemente a enzima fibrinolítica fibrolase foi ligada covalentemente a um peptídeo sintético contendo a sequência RGD, que tem demonstrado potente efeito antitrombótico *in vivo* e *in vitro*. O conjugado obtido por este método reteve aproximadamente 90% da atividade fibrinolítica da enzima nativa, incorporando um potente efeito antitrombótico com inibição da agregação de plaquetas (IC<sub>50</sub>) da ordem de nM (Sanchez e cols., 1997).

Estes antecedentes, mais os dados moleculares das reprotinas, nos motivaram ao estudo dos efeitos das mutalinas sobre alguns fatores e etapas chave do sistema de coagulação sanguínea e fibrinólise.

## OBJETIVOS.2

---

### 2.1 Objetivos gerais

Estudar os efeitos das mutalinas I e II (LHF-I e LHF-II), isoladas do veneno da serpente *Lachesis muta muta*, sobre proteínas que atuam em algumas etapas dos sistemas de coagulação e fibrinólise.

### 2.2 Objetivos específicos

- Examinar a degradação do fibrinogênio e fibrina pelas mutalinas I e II, identificando as cadeias hidrolisadas.
- Esclarecer se além do efeito fibrinolítico direto, induzido pelas toxinas hemorrágicas, haveria também um mecanismo indireto, através da ativação do plasminogênio.
- Estudar o efeito das mutalinas sobre o fator anticoagulante do plasma, a proteína C.
- Estudar o efeito da mutalina II na inibição da agregação plaquetária induzida pelos agonistas colágeno e ADP.

### 3.1. Veneno

O veneno bruto de *Lachesis muta muta* foi obtido de serpentes capturadas na região de Manaus (AM) e mantidas no Serpentário da Fundação Ezequiel Dias, Belo Horizonte. As amostras de veneno foram extraídas seguindo as recomendações da Organização Mundial de Saúde (WHO,1981). O veneno, coletado por compressão das glândulas veneníferas após anestesia parcial das serpentes, em caixas especiais, pelo abaixamento da temperatura entre 5 - 10 °C, em atmosfera de CO<sub>2</sub> obtida pela sublimação de gelo seco, foi liofilizado e guardado a -20 °C até seu uso.

### 3.2. Substratos

Caseína foi obtida da Merk Darmstadt, Alemanha. DL-BAPNA.HCl; dimetilcaseína; “hide powder azure”; fibrinogênio bovino (95% de proteína coagulável); plasminogênio humano e o peptídeo cromogênico N-p-Tosyl-Gly-Lys-pNa foram adquiridos da Sigma Chemical Co., EUA; H-D-Val-Leu-Lys-pNa (S-2251) foi adquirido da Kabi Vitrum (Suécia).

### 3.3. Enzimas

Plasmina (EC. 3.4.2.1.7) liofilizada, de plasma bovino, 2- 4 unidades/mg proteína; trombina (EC. 3.4.2.1.5) de plasma bovino, 50-100 NIH/mg proteína e Streptokinase de *Streptococcus β-hemolíticus*, foram adquiridos da Sigma Chemical Co., EUA.

### **3.4. Inibidores**

Fluoreto de Fenilmetilsulfonilfluoreto (PMSF); Inibidor de Tripsina do Feijão de Soja (SBTI) tipo II-S, 1 mg inibe 1,5 a 2,5 mg de tripsina; Clorohidrato de N-p-Tosil-Lisina Clorometilcetona (TLCK); Iodoacetamina; Etilenodiaminotetracetato dissódico (EDTA), produtos obtidos da Sigma Chemical Co., EUA. O-fenantrolina e  $\beta$ -mercaptoetanol, produtos da Merck Darmstadt, Alemanha.

### **3.5. Antisoros**

Soro antilaquéutico, Instituto Butantan, São Paulo, Brasil; IgG anti-LHF-I, foram purificadas a partir de soro de coelho imunizado com o fator LHF-I de *L. m. muta*.

### **3.6. Substâncias padrões**

Fosforilase b, albumina sérica bovina, ovalbumina, anidrase carbônica, inibidor de tripsina, lactoalbumina, foram da Pharmacia Fine Chemicals, EUA.

Albumina, ovalbumina,  $\beta$ -galactosidase, gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, anidrase carbônica, tripsinogênio, inibidor de tripsina, lactoalbumina, da Sigma Chemical Co., EUA.

### **3.7. Outros reagentes**

Acrilamida, N,N'-metilenobisacrilamida, N,N,N',N'-tetrametil 1,2-diaminometano (TEMED), persulfato de amônio, produtos da Bio-Rad Laboratories, Richmond, EUA. Coomassie Brilliant Blue R-250 e agarose tipo I foram da Sigma Chemical Co., EUA. Negro de amido, da Merck Darmstadt, Alemanha.

Sephacryl S-200, Sephacryl S-300, Sephadex G-50, DEAE-Sephacel, CM-Sephacryl CL-6B e CNBr-Sephacryl 4B ativada, produtos da Pharmacia Uppsala, Suécia.

Os demais reagentes empregados foram de boa procedência e de pureza analítica.

### **4.1. Purificação das metaloproteinases**

#### ***Preparação de colunas para cromatografia***

O gel de Sephadex G-50 utilizado na purificação do fator hemorrágico LHF-II foi preparado de acordo com as especificações do fabricante. DEAE-Sephacel, CM-Sepharose CL-6B, Sephacryl S-200 e S-300 foram fornecidos prontos para uso.

### **4.2. Dosagem de proteína**

Todas as etapas em que se fez necessária a dosagem de proteínas foi utilizado o método de Lowry e cols. (1951), utilizando-se soro-albumina bovina como padrão ou pela medida espectrofotométrica da absorbância a 280 nm em cuba de 1 cm<sup>3</sup>.

### **4.3. Eletroforese em gel de poliacrilamida**

As eletroforeses em placa eram realizadas na presença de SDS segundo o método de Laemmli (1970), utilizando a aparelhagem e tampões especificados pela Mini Protean II, Dual Slabgel, Bio-Rad Laboratories, Richmond, EUA.

#### ***Gel de separação***

A partir de uma solução de acrilamida:bisacrilamida 36,5 : 1 em água deionizada eram preparados os géis de separação a 10 ou 12% respectivamente, contendo 13,3% de glicerol P/V, 0,033% de persulfato de amônia P/V, 0,33% TEMED V/V, 0,1% SDS P/V e Tris-HCl 0,375 M, pH 8,8.

### *Gel de concentração*

Foram preparados a 4% contendo as mesmas proporções dos reagentes acima mencionados, porém sem glicerol. Este gel era polimerizado sobre o gel de separação durante 30 minutos. Para a polimerização dos géis foram utilizadas placas de vidro de 11 cm de comprimento X 8 cm de largura. A espessura do gel foi de 0,5 mm.

### *Tampão das cubas*

Tris-HCl 0,025 M, glicina 0,05 M, SDS 0,1%, pH 8,6.

### *Preparação das amostras*

As amostra eram solubilizadas no tampão Tris-HCl 0,05 M, pH 6,8 contendo SDS 4% (P/V), 12% glicerol (P/V), 0,02% azul de bromofenol e 1%  $\beta$ -mecaptoetanol (V/V). Esta solução era levada ao banho-maria fervendo por cinco minutos, deixando resfriar a temperatura ambiente e aplicados de 10 a 20  $\mu$ l por escaninho.

### *Tempo de eletroforese*

Aproximadamente 40 minutos, a 200 V desligando-se a corrente quando a banda do indicador azul de bromofenol estivesse a 1 cm da extremidade inferior do gel.

### *Coloração*

As proteínas eram coradas por imersão numa solução de Coomassie Blue R-250 a 0,25% em metanol: ácido acético: água 5:1:5 por 30 minutos em agitação. A descoloração era realizada em solução de etanol:ácido acético:água 1:2:20. Quando necessário eram acrescentados 50  $\mu$ l de acetato de etila para descoloração mais rápida.

#### **4.4. Imunodifusão**

Imunodifusão foi feita de acordo com o método de Ouchterlony e Nielson (1973). Lâminas de microscopia (2,5 X 7,5) eram cobertas com 3,5 ml de gel de agarose (Sigma) a 1% em tampão veronal 0,04 M, pH 8,6. Após a solidificação à temperatura ambiente, foram feitos orifícios nos géis (1 mm de diâmetro) onde foram aplicadas as amostras e os anti-soros em disposição adequada à imunodifusão. As lâminas de gel com as amostras eram colocadas em câmaras umedecidas com água a 4 °C durante 24 horas. Terminada a difusão, as lâminas eram lavadas com solução salina contendo azida sódica 0,02% por 4 dias a 4 °C, solução que era renovada uma vez por dia. Este tratamento foi seguido com lavagem em água destilada durante 4 a 6 horas à temperatura ambiente. As lâminas secas em estufa a 40 °C por 24 horas eram coradas por imersão em solução de ácido acético 7% contendo negro de amido 10% durante 1 minuto. A descoloração era feita em solução de etanol: ácido acético: água 1:2:20 (v/v), seguido de secagem sob ventilação à temperatura ambiente.

#### **4.5. Imunoeletroforese**

Imunoeletroforese era realizada usando o mesmo gel como descrito para a imunodifusão. Neste caso, no meio do gel foram feitos dois orifícios de 1 mm de diâmetro, um a cada lado de uma fenda central de 2 mm de largura por 65 mm de comprimento. As amostras eram aplicadas nos orifícios e submetidas a eletroforese, em cubas apropriadas, contendo tampão veronal 0,08 M, pH 8,6 nos reservatórios dos eletrodos. Foi aplicado uma corrente de 5 mA/lâmina durante uma hora, determinado pela posição do indicador azul de bromofenol aplicado ao lado da amostra.

Após a eletroforese, era removido o gel da canaleta central e logo preenchido com 80 µl de anti-soro. A imunodifusão e os procedimentos relativos a lavagem, coloração e descoloração das lâminas foram os mesmos descritos nos procedimentos anteriores.

## **4.6. Atividades biológicas**

### **4.6.1. Atividade hemorrágica**

A atividade hemorrágica era determinada pelo método de Kondo e cols. (1960), utilizando nos ensaios de rotina, camundongos machos (18 - 20g) do Biotério da Fundação Ezequiel Dias, Belo Horizonte. Para fins quantitativos eram usados coelhos de 2 a 2,5 Kg ou ratos machos Wistar (250 a 300 g) como descrito por Theakston e Reid (1983). Os animais previamente depilados no dorso eram injetados via subcutânea (camundongos) ou intradérmica (coelho e ratos) com doses variáveis de veneno ou frações de veneno em 0,1 ml de solução salina (NaCl 0,85%). Após 24 horas os animais eram anestesiados com éter etílico e sacrificados, as peles eram removidas e o diâmetro das lesões hemorrágicas eram medidas na superfície interna. A menor concentração de proteína que induz uma lesão hemorrágica de 10 mm de diâmetro era definida como uma dose hemorrágica mínima (DHM). A atividade específica era definida como DMH/mg de proteína.

### **4.7. Atividade proteolítica**

Era medida utilizando os seguintes substratos:

#### **4.7.1. Atividade sobre caseína**

Atividade sobre caseína era estimada pelo método de Kunitz (1946). A 1 ml de caseína 1% em tampão Tris-HCl 50 mM pH 8,0 eram adicionados solução de veneno ou frações em 1 ml do tampão. Após 30 minutos de incubação a 37 °C, a reação era interrompida pela adição de 2 ml de ácido tricloroacético (TCA) 5%. Os produtos da digestão eram separados por centrifugação (15 minutos a 3.000 rpm) e feita a leitura dos sobrenadantes a 280 nm. A atividade caseinolítica era calculada por meio da seguinte fórmula: unidade/mg =  $A_{280}/\text{min}/\text{mg}$  de proteína.

#### **4.7.2. Atividade sobre dimetilcaseína**

O método de Lin e cols. (1969) foi usado para a determinação da atividade sobre dimetilcaseína. A 1 ml de dimetilcaseína 0,1% em tampão fosfato 50 mM pH 7,86 eram adicionadas concentrações adequadas de amostra em 1 ml do mesmo tampão, incubadas a 37 °C por 30 minutos. A reação era interrompida por imersão das amostras em banho de água fervente por 3 minutos. Em seguida, 1 ml de solução de TNBS 0,1% e 1 ml de bicarbonato de sódio 4% pH 8,4 eram adicionadas às amostras, seguidos por incubação durante 30 minutos. 1 ml de solução de SDS 10% e 0,5 ml de HCl eram adicionadas a cada amostra. A seguir, fazia-se a leitura a  $A_{340 \text{ nm}}$  da mistura, zerando o aparelho com o controle que tinha todos os componentes exceto enzima. Uma unidade de atividade proteolítica foi definida como a  $A_{340 \text{ nm}} / \text{min}$ . A atividade específica era expressa como unidades por mg de proteína.

#### **4.7.3. Atividade sobre azocaseína**

O método empregado para a determinação da atividade sobre azocaseína foi o de Ahmed e cols. (1990). A 1 ml de solução de azocaseína (Sigma), 50 mg/ml em tampão  $\text{NaHCO}_3$  0,5%, pH 8,0, eram adicionadas concentrações apropriadas de veneno ou enzima. Após 30 minutos de incubação a 37 °C, a reação era interrompida pela adição de 0,5 ml de ácido perclórico 7%. Os produtos da hidrólise eram separados por centrifugação e feita a leitura dos sobrenadantes a 390 nm. A atividade específica era calculada por meio da seguinte fórmula:  $\text{Unidade/mg} = A_{390} / \text{min/mg de proteína}$ .

#### **4.7.4. Atividade sobre “hide powder azure”**

Era determinado segundo o método de Rinderknecht e cols. (1968). Este substrato é o complexo de proteínas insolúveis marcadas covalentemente com Remazobriiliant blue, que é solubilizado pela clivagem proteolítica, permitindo, desta maneira, que a reação seja monitorada espectrofotometricamente a 595 nm. Neste ensaio, 10 mg de substrato em 2 ml de tampão Tris-HCl 50 mM pH 8,0 eram incubados com concentrações adequadas de enzima a 37 °C por 10 a

30 minutos. A reação era interrompida por imersão das amostras em banho de água fervente durante 5 minutos, seguida de centrifugação a 6000 rpm por 15 minutos. A quantidade de substrato solubilizado no sobrenadante era estimada pela absorbância a 595 nm. Uma unidade de atividade proteolítica era definida como a  $A_{595}$  /min. A atividade específica era expressa como unidades/mg de proteína.

#### **4.8. Atividade fibrinogenolítica**

Atividade fibrinogenolítica era medida como descrita por Ouyang e Huang (1976). Nestes ensaios, 1 ml de solução de fibrinogênio bovino (2 mg/ml), e concentrações conhecidas dos fatores hemorrágicos em 1 ml de tampão Tris-HCl 5 mM, NaCl 10 mM, pH 7,4 eram pré-incubados separadamente a 37 °C durante 3 minutos. Partes iguais da solução de fibrinogênio e dos fatores hemorrágicos eram misturadas e incubadas a 37 °C. Em intervalos variados de tempo (0, 5, 15, 30, 60, 120 minutos) 0,2 ml de mistura eram retirados e ensaiados para a determinação de fibrinogênio coagulável remanescente. Nos mesmos intervalos de tempo, 0,1 ml da mistura de incubação eram retirados e adicionados a 0,1 ml de solução desnaturante (uréia 8 M, SDS 4% e  $\beta$ -mercaptoetanol 4%). Depois da redução e desnaturação durante a noite à temperatura ambiente, as amostras eram submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS a 10% ou 12%. A atividade fibrinogenolítica específica era calculada dividindo-se a velocidade de hidrólise do fibrinogênio (mg/min) pela quantidade das enzimas no meio de reação.

#### **4.9. Atividade fibrinolítica**

Atividade fibrinolítica era determinada pelo método de Astrup e Mulertz (1952). 10 ml de solução de fibrinogênio bovino (2 mg/ml, 89% de proteína coagulável) em tampão Tris-HCl 20 mM, NaCl 0,85% pH 7,4 eram adicionados em placas Petri (100 X 15 mm). A solução de fibrinogênio era coagulada pela adição de 200  $\mu$ l de trombina (Sigma, 100 unidades/ml). Nestas condições o fibrinogênio

coagulava em 2 minutos. Depois de 30 minutos, concentrações variáveis das amostras (veneno ou fatores purificados) eram colocados na superfície do gel (10 a 20  $\mu$ l), com intervalos de 1,5 cm de distância e incubados à temperatura ambiente. A vários intervalos de tempo eram medidas os halos de lise, após interrupção da reação com TCA 5%. A atividade era expressa como o halo de lise ( $\text{mm}^2$ )/mg de proteína.

Para coagulação do plasma, 3,5 ml de plasma humano citratado era colocado em placas Petri 100 X 15 mm e coagulado pela adição de 0,35 ml de  $\text{CaCl}_2$  5%. Os ensaios eram realizados como descritos para a coagulação do fibrinogênio bovino. Plasmina era usada como controle.

A hidrólise foi demonstrada por SDS-PAGE de acordo com a descrição de Willis e Tu (1981). Trombina (5  $\mu$ l, 1000U/ml) eram adicionadas à solução de fibrinogênio (1,5 mg/ml) em Tris-HCl 20 mM pH 7,4 contendo NaCl 0,154 M à temperatura ambiente por 1 hora para a formação de coágulos de fibrina. Concentrações apropriadas dos fatores hemorrágicos (LHF-I, 56  $\mu$ g; LHF-II 4 $\mu$ g) em 0,1 ml eram adicionados aos coágulos e incubados a 37 °C por vários intervalos de tempo. Depois de cada tempo de incubação eram adicionados 0,150 ml de solução desnaturante (uréia, 8 M; SDS, 10%;  $\beta$ -mercaptoetanol, 4%). A mistura era deixada a temperatura ambiente durante a noite e analisada por SDS-PAGE a 12%.

#### **4.10. Isolamento dos fragmentos de fibrinogênio após incubação do substrato com a mutalisina II (LHF-II)**

Fibrinogênio (50 mg) foi dissolvido em 6 ml de tampão Tris-HCl 0,1 M, contendo SBTI 50 mM, pH 8,0. A esta solução foram adicionados 12  $\mu$ l de LHF-II (2,7 mg/ml). Nestas condições, a proporção molar de fibrinogênio : enzima era 103:1. Alíquotas da solução (2ml), foram incubadas a 37 °C por 0, 10 ou 20 minutos, sendo parada a reação com 150  $\mu$ l de EDTA (125 mM). A cada alíquota foi adicionada uréia 8 M. Carboxilação redutiva foi realizada pela adição de dithiotreitrol (DTT) em uma proporção 10 vezes maior que a do

fibrinogênio. Nitrogênio gasoso foi passado na solução por 5 minutos antes da incubação à temperatura ambiente por 1 hora. Iodoacetamida (relação molar Iodoacetamida : fibrinogênio, 10:1) foi adicionada sob nitrogênio gasoso e alquilação foi permitida ocorrer no escuro à temperatura ambiente, por 1 hora. Os fragmentos de fibrinogênio foram então separados por HPLC fase-reversa, em coluna Vydac C<sub>4</sub> (4,1 X 250 mm). A eluição foi monitorada a 215 nm e os fragmentos foram identificados por SDS-PAGE 12% utilizando alíquotas das frações.

#### **4.11. Efeito das mutalisinas I e II (LHF-I e LHF-II) sobre o plasminogênio**

Para verificar se ocorria ativação do plasminogênio pelos fatores hemorrágicos e/ou veneno bruto, foram utilizados substratos cromogênicos específicos para plasmina: H-D-Val-Leu-Lys-pNa, S 2251 (1,8 mM) e N-p-Tosyl-Gly-Pro-Lys-pNa (1,7 mM) utilizando plasmina (Sigma) como controle. Nas soluções de plasminogênio humano (115 µg) em tampão Tris-HCl 20 mM, pH 7,4 contendo NaCl 0,154 M eram adicionadas concentrações apropriadas de enzimas. Streptokinase (90 µg), fatores hemorrágicos (LHF-I, 10 µg; LHF-II, 50 µg) ou veneno bruto (100 µg) num volume final de 1 ml. As soluções eram incubadas a 37 °C por vários intervalos de tempo. A reação era interrompida pela adição de ácido acético 30% e feita a leitura da absorbância a 405 nm.

#### **4.12. Efeito da mutalisina II (LHF-II) sobre proteína C**

Para medir ativação da proteína C pelo fator hemorrágico LHF-II, foi utilizado o kit "Accucolor™ Protein C" (Sigma Diagnostics), como se segue:

Em uma solução de plasma humano de referência em tampão Tris-HCl 0,04 M, pH 7,4 contendo NaCl 0,154 M, eram adicionadas concentrações adequadas de enzima Protac ou LHF-II num volume final de 500 µl. Esta solução era incubada por 10 minutos a 37 °C. Em seguida, eram adicionados 200 µl de substrato cromogênico específico e a solução era novamente

incubada por 10 minutos a 37 °C. A reação era interrompida pela adição de 200 µl de ácido acético 30%. A leitura da absorbância era feita a 405 nm.

#### **4.13. Efeito da mutalisina II (LHF-II) Sobre Plaquetas**

Experimentos de agregação plaquetária foram realizados utilizando-se plasma humano rico em plaquetas (PRP) de acordo com o seguinte esquema (Tripathi e cols., 1994): sangue humano (18 ml) de doadores saudáveis que não haviam recebido qualquer medicação à base de aspirina ou similares por pelo menos duas semanas, era colhido em 2 ml de citrato de sódio 0,1 M e centrifugado (150 x g) por 10 minutos a 22 °C. O sobrenadante (PRP) era removido e o sangue remanescente era centrifugado a 8.000 x g por 10 minutos para a obtenção do plasma pobre em plaquetas (PPP). Um agregômetro de 4 canais (Helena Laboratories) ou o agregômetro Zenite foram usados nos experimentos. Inibição da agregação induzida por ADP (Calbiochem) ou colágeno (Sigma, 2 mg/ml), era monitorada a 37°C pela adição de concentrações adequadas da mutalisina II (3,47 µM, concentração final), 1 minuto antes da adição do agonista (ADP, 10 a 20 µM; colágeno, 50 µM). Como controle de inibição foi usado um nonapeptídeo contendo a sequência RGD (IC<sub>50</sub>=70 nM) (Sánchez e cols., 1997).

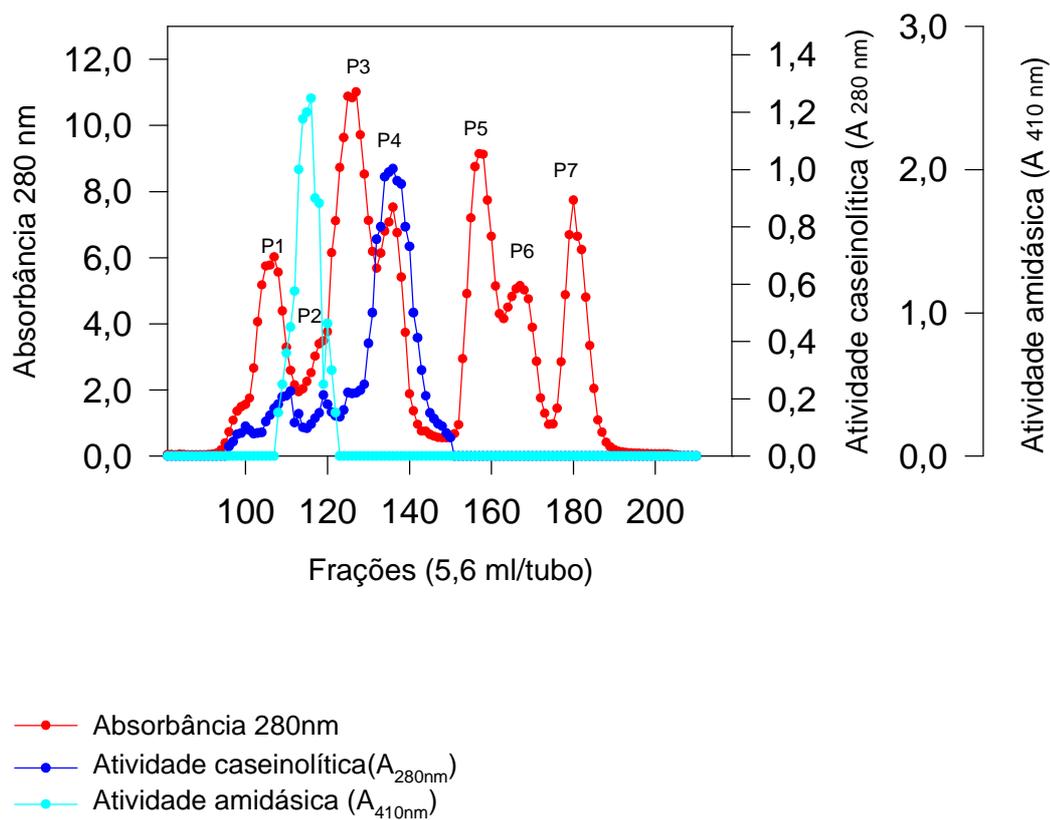
### 5.1. Purificação das toxinas hemorrágicas do veneno de *L. m. muta*

Os fatores hemorrágicos LHF-I e LHF-II foram isolados em forma homogênea a partir do veneno de *L. m. muta* por processos cromatográficos convencionais de filtração molecular e troca iônica, como descrito por Sánchez e cols. (1987, 1991a).

A filtração em Sephacryl S-200 de 2,0 g de veneno bruto, contendo 1664 mg de proteína total, produziu 7 picos de proteínas que foram denominados de P1 a P7, de acordo com a ordem decrescente de eluição molecular (Figura 3 ). As atividades proteolítica sobre a caseína e hemorrágica foram detectadas nos picos P1 e P4. A atividade coagulante, medida pela hidrólise do DL-BAPNA, localiza-se no pico P2.

A mutalisina I (LHF-I) foi isolada a partir do pico P1 por cromatografia de troca iônica em DEAE-Sephacel, seguido de filtração e refiltração em Sephacryl S-300. Foram obtidos 4,2 mg do fator I, o que representa aproximadamente 0,3% do componente no veneno bruto. A preparação apresentou-se homogênea na eletroforese em poliacrilamida com SDS, imunodifusão e imunoeletroforese.

Por processos similares a mutalisina II (LHF-II), foi isolada após cromatografia do pico P4 em CM-Sepharose CL-6B, cromatografia e recromatografia em Sephadex G-50. Foram obtidos 25 mg de proteína ativa (rendimento de 23%), o que representa aproximadamente 1,6% da proteína no veneno bruto. Esta preparação mostrou-se homogênea pelos critérios de pureza mencionados acima.



**Figura 3 - Cromatografia do veneno bruto de *L. m. muta* em coluna de Sephacryl S-200.** 2,0 g de veneno bruto (1664 mg de proteína) foram dissolvidos em 16 ml de tampão acetato de amônio 50 mM pH 7,3, contendo NaCl 0,3 M. A fração solúvel, depois de centrifugada a 6.000 g/15 minutos, foi aplicada em duas colunas em série (2,5 X 100 cm cada) de Sephacryl S-200, equilibradas e eluídas com o mesmo tampão a 4°C. Foram coletadas frações de 5,6 ml com fluxo de 13,4 ml/hora.

## 5.2. Massa molecular

As massas moleculares das mutalisinas I e II (LHF-I e LHF-II) foram determinadas por SDS-PAGE. As figuras 4.1 e 4.2 mostram as mobilidades eletroforéticas dos padrões e das proteínas purificadas, LHF-I e LHF-II, respectivamente. A massa molecular do fator LHF-I determinado em SDS-PAGE, 12% corresponde aproximadamente a 100.000. Quando a preparação de proteína foi desnaturada e reduzida por tratamento com  $\beta$ -mercaptoetanol revelou uma banda de aproximadamente 45 kDa. Como demonstrado anteriormente, o fator hemorrágico I é uma glicoproteína que consiste de duas subunidades com Mr. total de 100 kDa. Este valor é concordante com a Mr do pico P1 da coluna de Sephacryl S-200 estimados em 100 kDa pelo volume de eluição (dados não mostrados). A Mr do fator II, determinada em condições similares, foi 22.300.



**Figura 4.1. SDS-PAGE da mutalisina I (LHF-I) purificada do veneno de *L. m. muta*.**

A, veneno bruto de *L. m. muta*, condições não redutoras (30 µg); B, mutalisina I purificada, condições não redutoras (10 µg); C, mutalisina I purificada, condições redutoras (10 µg); D, marcadores: albumina bovina, ovoalbumina, gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, anidrase carbônica e tripsinogênio bovino. Coloração pelo coomassie blue.



**Figura - 4.2 - SDS-PAGE da mutalisina II (LHF-II) purificada do veneno de *L. m. muta*.**

A, veneno bruto de *L. m. muta*, condições não redutoras (40 µg); B, mutalisina II purificada, condições não redutoras (10 µg). Coloração pelo coomassie blue.

### **5.3. Efeito de inibidores sobre a atividade hemorrágica da mutalisina I (LHF-I)**

O efeito de alguns inibidores de proteinases sobre a atividade hemorrágica do fator de elevada massa molecular LHF-I é apresentado na tabela II. Nesses ensaios a preparação do fator (0,6 µg/0,1 ml) foi tratada com cada reagente em solução salina a 37 °C durante uma hora e logo depois foi testado o efeito hemorrágico em coelho. O EDTA 2 mM inibiu completamente a atividade hemorrágica da preparação, como mais uma evidência da natureza metaloproteica do LHF-I. Os inibidores PMSF, TLCK e SBTI nas concentrações indicadas não afetaram a atividade hemorrágica, porém o β-mercaptoetanol (10 mM) inibiu completamente o efeito hemorrágico da metaloenzima. Verificou-se também, que o soro antilaquético (1:1) e IgG anti-LHF-I (0,09 mg) neutralizaram eficientemente o efeito hemorrágico equivalente a 3 DHM da mutalisina I.

Resultados similares foram obtidos quando a mutalisina II (LHF-II) foi testada contra os reagentes mencionados (Sánchez e cols., 1991a).

**TABELA II**  
**Efeito de alguns inibidores sobre a atividade**  
**hemorrágica da mutalisina I (LHF-I)**

Inibidor	Concentração (mM)	Atividade Relativa (%)
Controle (LHF-I)	-	100
PMSF	2,5	95 ± 2
TLCK	10	100 ± 2
SBTI	0,5 mg/ml	100 ± 2
Benzamidina	10	100 ± 2
EDTA	2	0
β-mercaptoetanol	10	0
Antiveneno	1:1	0
IgG-anti-LHF-I	0,09 mg	0

Mistura do fator hemorrágico I (LHF-I) e inibidores nas concentrações acima, em solução, salina foram incubados a 37 °C por 60 minutos. Alíquotas de 0,1 ml contendo 0,6 µg de proteína foram injetados via intradérmica no dorso do coelho, pelo método de Kondo e cols. (1960). O antiveneno é o soro polivalente contra o veneno de *L. m. muta* (FUNED). Os valores representam a % do controle e são apresentados como a média ± S.E. (n=4).

#### 5.4. Atividade fibrinogenolítica das mutalisinas I e II (LHF-I e LHF-II)

Ambas as metaloproteinases apresentaram atividade fibrinogenolítica *in vitro*. Quando uma solução de fibrinogênio bovino (2 mg/ml) foi incubada a 37 °C com a mutalisina I, o substrato foi hidrolisado na cadeia A $\alpha$  aos 15 minutos. Em tempos prolongados de incubação (120 minutos), foi observada uma leve hidrólise da cadeia B $\beta$ . Porém a cadeia  $\gamma$  não foi afetada pela metaloenzima. A figura 5 mostra os resultados em SDS-PAGE dos hidrolisados a vários intervalos de tempo. Concomitante com a hidrólise da cadeia A $\alpha$  aos 15 minutos, observou-se o aparecimento dos produtos de hidrólise de elevada Mr, aproximadamente 49 e 48 kDa.

A atividade fibrinogenolítica específica foi estimada em 13 mg de fibrinogênio/min/mg de proteína (TABELA III).

A mutalisina II comportou-se de maneira semelhante frente ao mesmo substrato (Figura 6), hidrolisando rapidamente a cadeia A $\alpha$  e posteriormente a cadeia B $\beta$ , permanecendo inalterada a cadeia  $\gamma$ .

A atividade fibrinogenolítica específica para a mutalisina II foi de 25,5 mg de fibrinogênio/min/mg de proteína (TABELA III).

**TABELA III**

**Atividade fibrinogenolítica e fibrinolítica  
das mutalisinas I e II (LHF-I e LHF-II)**

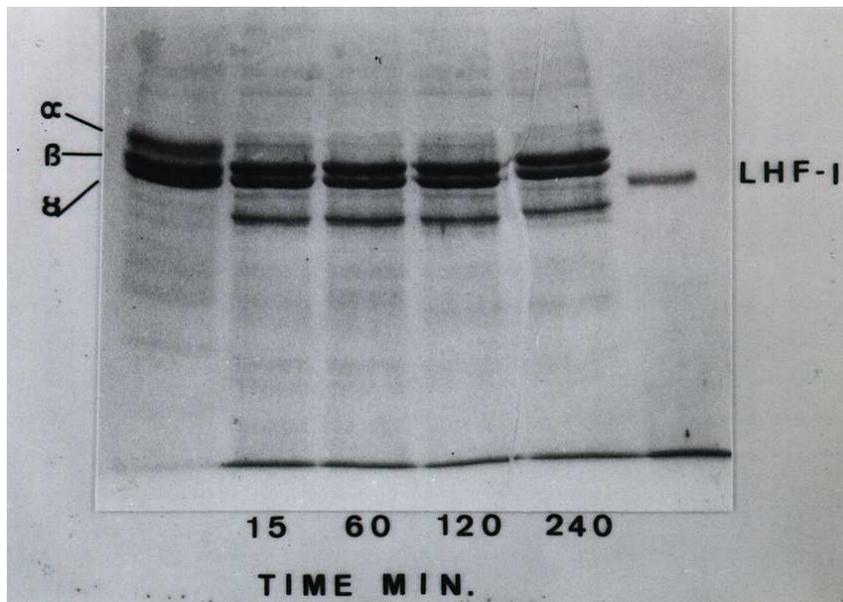
Amostra	Fibrinogenolítica (unidades/mg)*	Fibrinolítica (unidades/mg)**	
		Fibrina bovina	Fibrina humana
Veneno bruto	-	1,3	2,3
mutalisina I	13,0	1,2	1,7
mutalisina II	25,5	1,8	2,6

\* uma unidade é definida como a quantidade de enzima capaz de hidrolisar o fibrinogênio com uma velocidade de 1 mg/min.

A atividade específica (Unidades/mg) é calculada dividindo-se a velocidade de hidrólise do fibrinogênio (mg/min) pela quantidade de enzima no meio de reação.

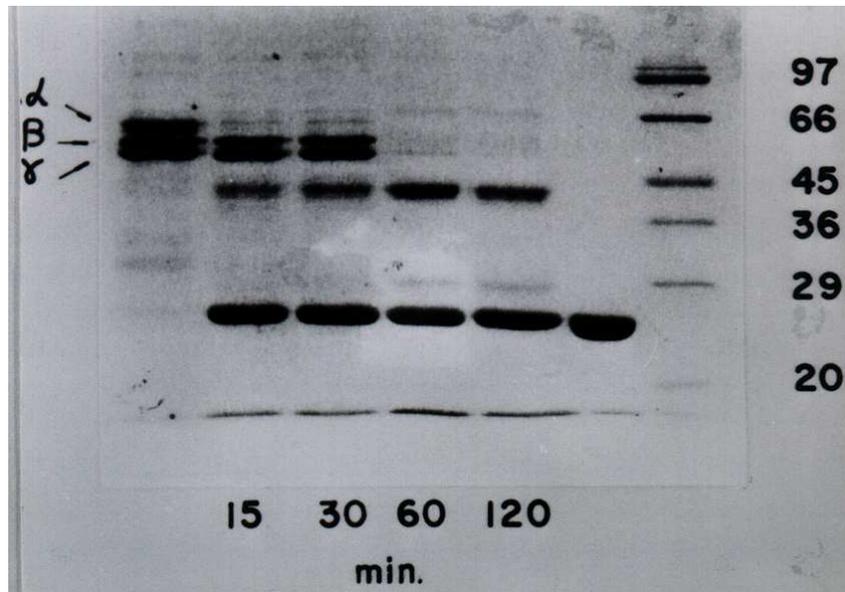
\*\* uma unidade é definida como o halo de lise (mm<sup>2</sup>) produzido por 1,0 µg de enzima.

Os valores representam a média de 2 experimentos realizados em duplicata.



**Figura 5- Hidrólise do fibrinogênio pela mutalisina I (LHF-I).**

Solução de fibrinogênio bovino (2 mg/ml) foi incubado com 56  $\mu$ g do fator LHF-I em tampão Tris HCl 20 mM, pH 7,4 contendo NaCl 154 mM a 37 °C (relação fibrinogênio: mutalisina I, 10 : 1). Alíquotas de 0,1 ml foram removidas da mistura de incubação e preparadas para a eletroforese, como descrito em métodos (item 4.8). Da esquerda para a direita: padrão de fibrinogênio mostrando as cadeias A $\alpha$ , B $\beta$  e  $\gamma$ , respectivamente; tempos de incubação (min) e padrões de Mr.



**Figura 6 - Hidrólise do fibrinogênio pela mutalisina II (LHF-II).**

Solução de fibrinogênio bovino (2 mg/ml) foi incubado com 4  $\mu$ g do fator LFH-II em tampão Tris HCl 20 mM pH 7,4 contendo NaCl 154 mM a 37 °C (relação fibrinogênio: mutalisina II, 29 : 1). Aliquotas de 0,1 ml foram removidas da mistura de incubação e preparadas para a eletroforese, como descrito em métodos (ítem 4.8). Da esquerda para a direita: Padrão de fibrinogênio mostrando as cadeias  $A\alpha$ ,  $B\beta$  e  $\gamma$ , respectivamente, tempos de incubação (min) e padrões de Mr.

## **5.5. Atividade fibrinolítica das mutalisinas I e II (LHF-I e LHF-II)**

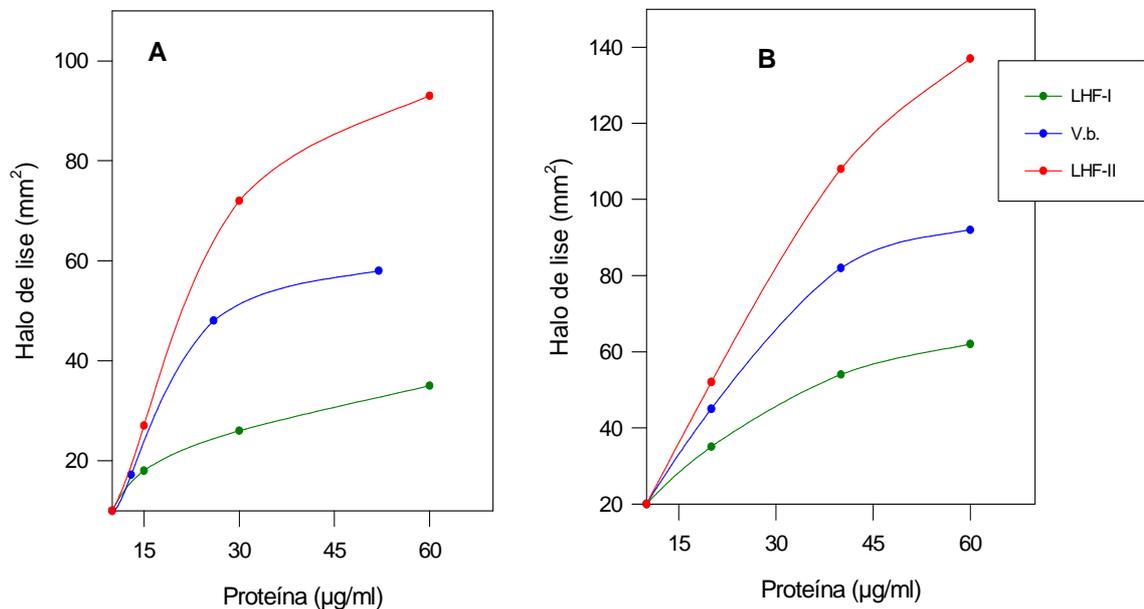
### **5.5.1. Ensaio em placa de fibrina**

Os componentes purificados assim como o veneno bruto mostraram atividade fibrinolítica *in vitro*. As figuras 7A e 7B mostram os resultados da digestão da fibrina bovina e humana, respectivamente, por ambas as metaloproteinasas.

As atividades do fator LHF-I : 1,2 unidades/mg de proteína sobre a fibrina bovina, e 1,7 unidades/mg sobre a fibrina humana, mostram que essa preparação é aproximadamente 1,5 e 1,5 U/mg, respectivamente, mais baixa que a mutalisina II isolada do mesmo veneno (tabela III).

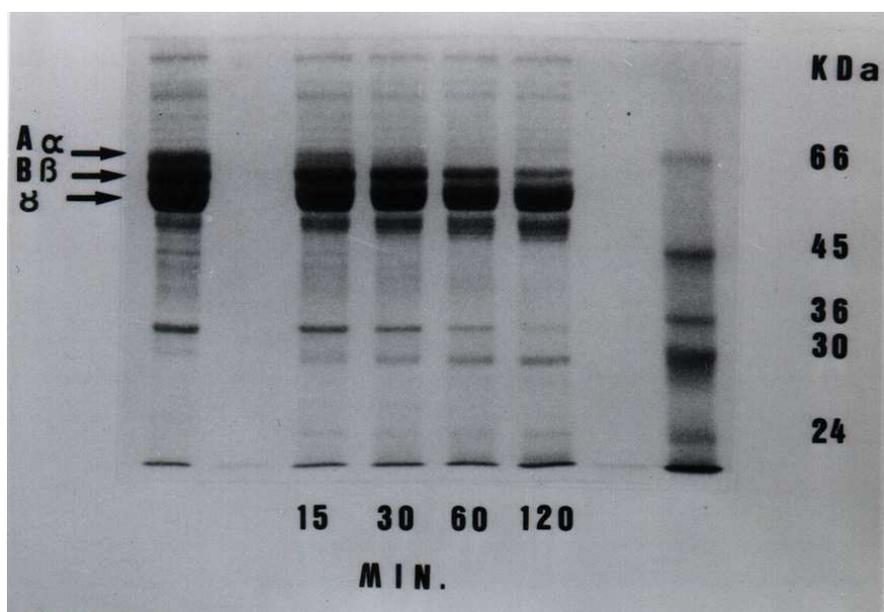
### **5.5.2. Análise por SDS-PAGE da hidrólise de fibrina pelas mutalisinas I e II**

Nas condições de ensaio o fator LHF-I (56 µg, 0,56 µM) hidrolisou seletivamente a cadeia  $\alpha$ , observando-se a presença de um principal produto de hidrólise de ~ 44 kDa em até 240 minutos de incubação (figura 8). Diferentemente, o fator LHF-II (4 µg, 0,2 µM) hidrolisou completamente a cadeia  $\alpha$  em 45 minutos e, em tempos prolongados (120 min), foram igualmente hidrolisadas as cadeias  $\beta$  e  $\gamma$  com aparecimento de dois principais produtos de 44 kDa e 43 kDa, respectivamente (figura 9).



**Figura 7- Atividade fibrinolítica das mutalisinas I e II (LHF-I e LHF- II) e veneno de *L. m. muta* medida em placa de fibrina.**

**A) fibrina bovina:** 10 ml de solução de fibrinogênio bovino (2mg/ml) em tampão Tris-HCl 20 mM, CaCl 0,85% pH 7,4 foram adicionados em placas Petri (100 X 15mm). A solução foi coagulada pela adição de 200 µl de trombina. Depois de 30 minutos, concentrações variáveis das amostras (veneno ou enzimas purificadas) foram colocadas na superfície do gel com intervalos de 1,5 cm de distância e incubados à temperatura ambiente. A vários intervalos de tempo foram medidos os halos de lise, após interrupção da reação com TCA 5%. A atividade é expressa como o halo de lise (mm<sup>2</sup>/mg) de proteína. **B) fibrina humana:** 3,5 ml de plasma humano citratado foi coagulado pela adição de 3,5 ml de CaCl<sub>2</sub> 5%. Os ensaios foram realizados como descrito para o fibrinogênio. Os pontos representam a média de dois experimentos em duplicata. Os detalhes são descritos em métodos (ítem 4.9).



**Figura 8- Hidrólise da fibrina pela mutalisina I (LHF-I) em condições redutoras.**

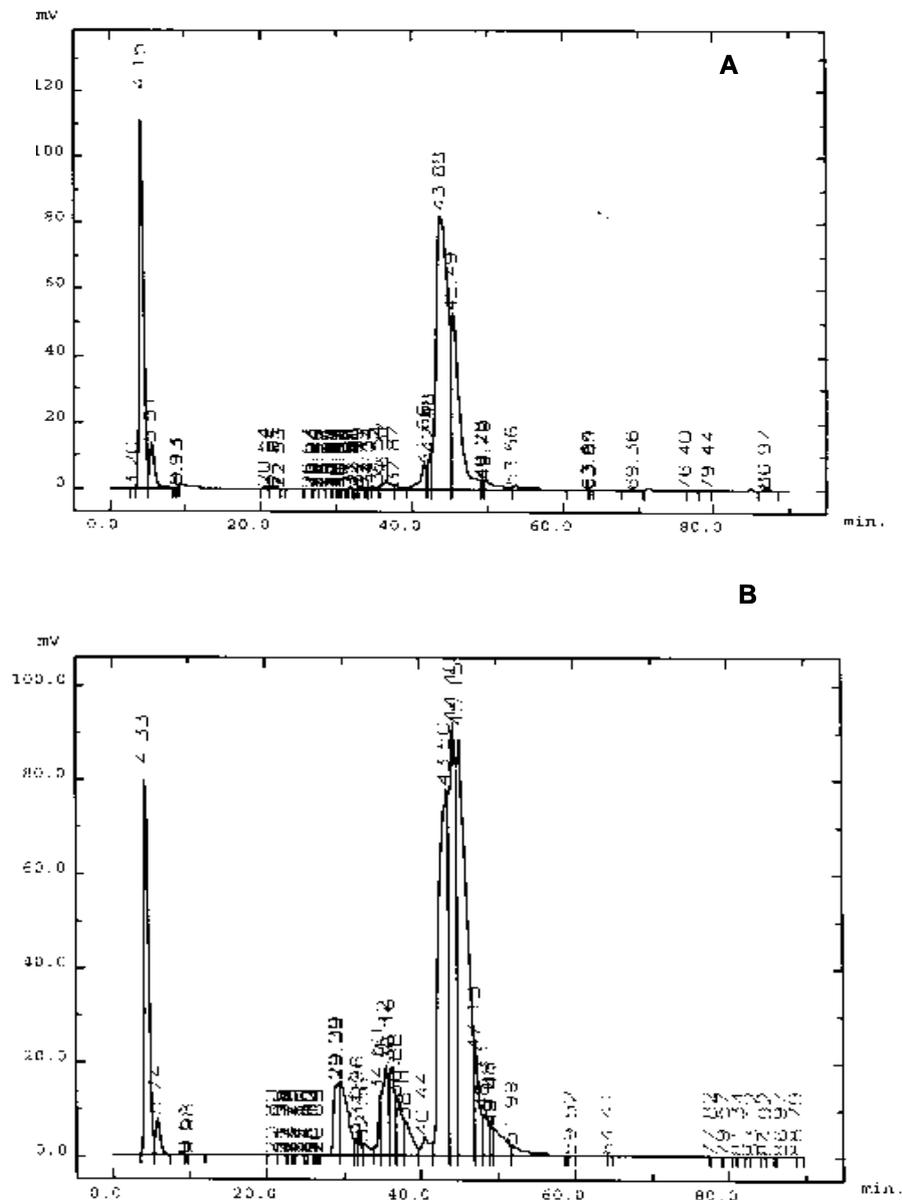
Fibrina bovina (2 mg/ml) em tampão Tris-HCl 20 mM, pH 7,4 contendo NaCl 154 mM foi incubada com 56,0 µg de fator hemorrágico LHF-I nos intervalos de tempo indicados. Alíquotas de 50 µl da mistura foram removidas e preparadas para a eletroforese, como descrito em métodos (item 4.9). Da esquerda para a direita: padrão de fibrina mostrando as cadeias  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ , respectivamente; tempos de incubação (min) e mutalisina I (LHF-I).



**Figura 9- Hidrólise da fibrina pela mutalisina II (LHF-II) em condições redutoras.** Fibrina bovina (2 mg/ml) em tampão Tris-HCl 20mM, pH 7,4 contendo NaCl 154 mM foi incubada com 4  $\mu$ g do fator hemorrágico LHF-II nos intervalos de tempos indicados. Alíquotas de 50  $\mu$ l da mistura foram removidas e preparadas para a eletroforese, como descrito em métodos (item 4.9). Da esquerda para a direita: Padrão de fibrina mostrando as cadeias  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ , respectivamente, tempos de incubação (min), mutalisina II (LHF-II) e padrões de Mr.

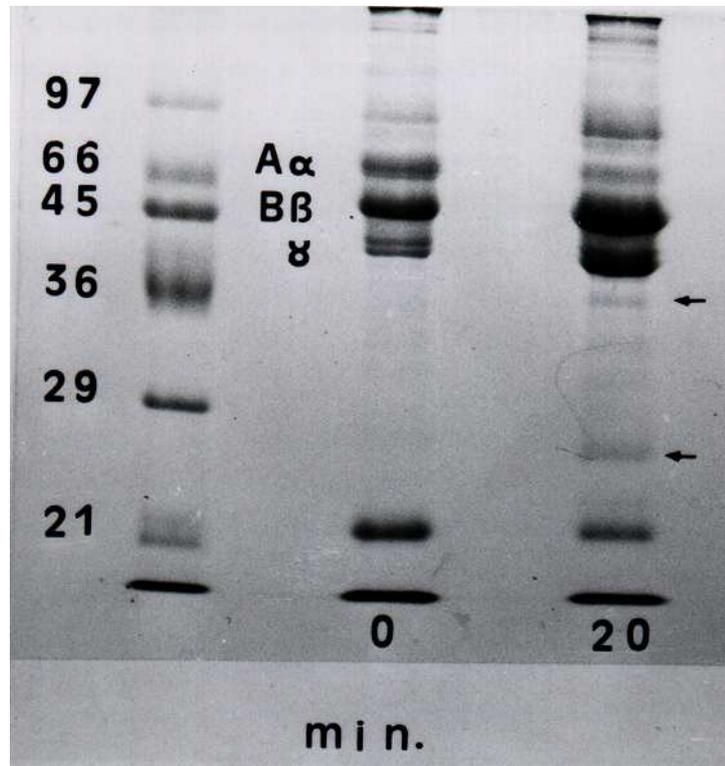
## **5.6. Isolamento dos fragmentos de fibrinogênio após incubação com a mutalisina II (LHF-II)**

Os fragmentos do fibrinogênio obtidos após incubação com a mutalisina II por 20 minutos (relação molar fibrinogênio : enzima, 103 : 1) foram separados por HPLC fase reversa. O perfil cromatográfico mostrado na figura 10 (A e B) indica que a ação hidrolítica é dirigida principalmente para a cadeia A $\alpha$ , originando 2 principais produtos com tempos de retenção 29,39 e 36,46 minutos.



**Figura 10 (A e B). HPLC fase reversa do fibrinogênio controle (A) e depois de incubado com a mutalisinga II por 20 minutos (B).**

Fibrinogênio (50 mg) foi dissolvido em 6 ml de tampão Tris-HCl 0,1 M, contendo SBTI 50 mM, pH 8,0. A esta solução foram adicionados 12 µl de LHF-II (2,7 mg/ml). Alíquotas da solução (2ml), foram incubadas a 37 °C por 0, 10 ou 20 minutos, sendo parada a reação com 150 µl de EDTA (125 mM). A cada alíquota foi adicionada uréia 8 M. Os fragmentos de fibrinogênio foram então separados em coluna Vydac C<sub>4</sub> (4,1 X 250 mm). A eluição foi monitorada a 215 nm. Os detalhes são descrito em métodos (item 4.10).

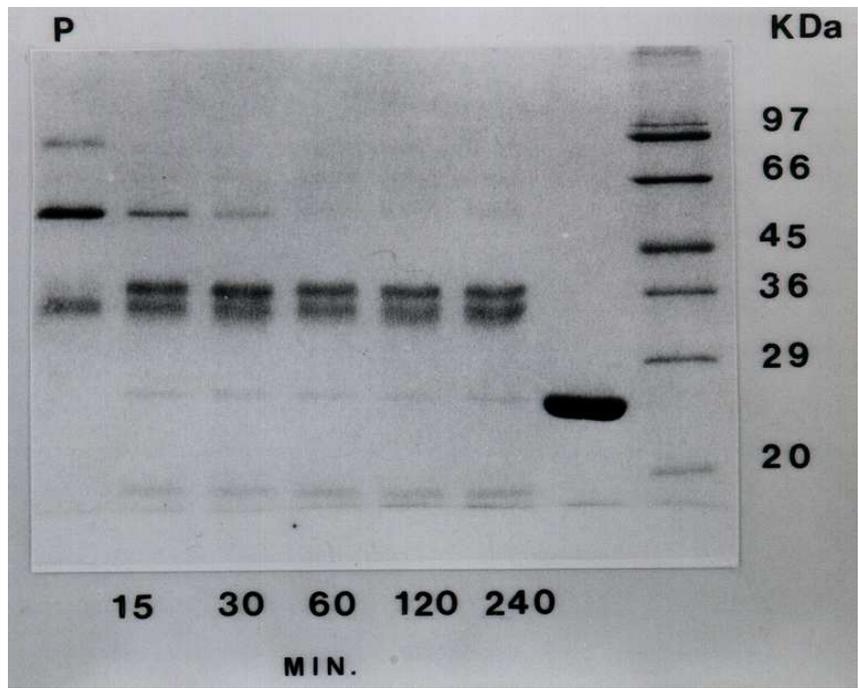


**FIGURA 11 - Hidrólise parcial do fibrinogênio pela mutalisina II (LHF-II)**

SDS-PAGE 12% em condições redutoras do fibrinogênio incubado com a enzima LHF-II, 12  $\mu$ l (2,7 mg/ml), a 37 °C por 20 minutos. Da esquerda para a direita: padrões de Mr, padrão de fibrinogênio mostrando as cadeias A $\alpha$ , B $\beta$  e  $\gamma$ , respectivamente, e alíquota do incubado. A banda com Mr de 21 kDa corresponde ao SBTI, usado na solução de ensaio para inibir possíveis serino-proteinases contaminantes no meio de incubação. As setas indicam os dois principais produtos da hidrólise.

### 5.7. Efeito das mutalisinas I e II (LHF-I e LHF-II) sobre o plasminogênio

Para verificar se o plasminogênio era ativado pelos fatores hemorrágicos e/ou veneno bruto de *L. m. muta*, foi utilizado método enzimático sobre os substratos cromogênicos específicos para plasmina, H-D-Val-Leu-Lys-pNa, S-2251 (1,8 mM) e N-P-Tosyl-Gly-Pro-Lys-pNa (1,7 mM). Os resultados apresentados na tabela IV e figura 12, quando comparados com os valores obtidos pela enzima ativadora de plasminogênio, streptokinase, sugerem que a hidrólise da fibrina pelas metaloproteinases I e II não requerem a ativação do plasminogênio. Como é mostrado na figura 13, a streptokinase (90 µg) é um potente ativador do plasminogênio. Isto é evidenciado pelo alto nível de hidrólise do substrato N-P Tosyl-Gly-Pro-Lys-pNa nos primeiros minutos de incubação. A atividade mais alta foi alcançada aos 9 minutos e permaneceu ativa durante o período de incubação (240 minutos).



**Figura 12- Hidrólise do plasminogênio pela mutalisina II (LHF- II).**

Plasminogênio humano (115 µg) foi incubado com LHF-II (4 µg) a 37 °C. Alíquotas do incubado (50 µl) foram removidas aos 15, 30, 60, 120 e 240 minutos e analisadas por SDS-PAGE 12% em condições redutoras, como descrito em métodos (item 4.11). Da esquerda para a direita: plasminogênio controle (P) mostrando três formas de Glu-plasminogênio de 93, 64 e 34 kDa, respectivamente; tempos de incubação (minutos); mutalisina II (LHF-II) e marcadores de peso molecular.

**TABELA IV**

**Efeito das metaloproteinasas LHF-I, LHF-II, veneno bruto de *L. m. muta* e streptokinase como potenciais ativadores de plasminogênio**

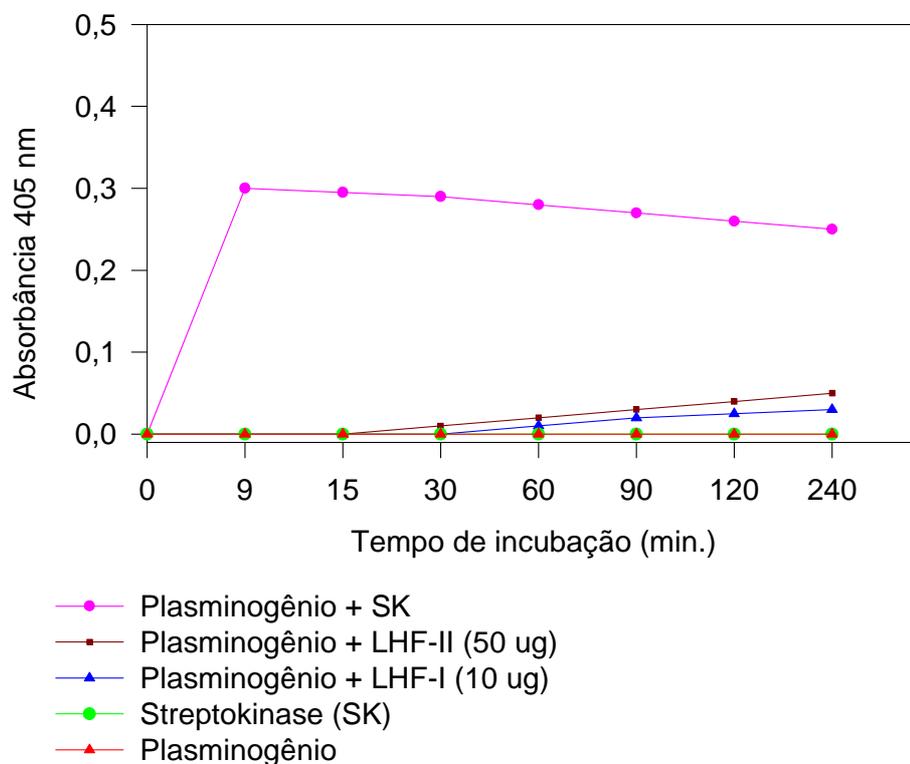
Enzimas		Substrato*	A <sub>405 nm</sub> **
Plasmina	0,15 U	S-2251	0,458
		S-2	0,247
Plasminogênio	115 µg +SK 90 µg	S 2251	0,475
		S-2	0,298
Plasminogênio	115 µg + VB 100µg	S-2	0,158
Plasminogênio	115 µg + VB 100µg + EDTA 2,5 mM***	S-2	1.530
Plasminogênio	115 µg + VB 100µg + PMSF 10 mM***	S-2	0
Plasminogênio	115 µg + LHF-I 10 µg	S-2251	0
		S-2	0
Plasminogênio	115 µg + LHF-II 50 µg	S-2251	0
		S-2	0

\* substratos: H-D Val-Leu-Lys-pNa (S-2251, 1,8 mM)

N-p-Tosyl-Gly-Pro-Lys-pNa (S-2, 1,7 mM)

\*\* Os resultados representam a média de dois ensaios realizados em triplicata.

\*\*\* O veneno permaneceu na presença de EDTA ou PMSF, nas concentrações indicadas, por 30 minutos a 37 °C



**Figura 13- Efeito das mutalinas I e II (LHF-I e LHF-II) e streptokinase como potenciais ativadores do plasminogênio.**

Plasminogênio humano (115  $\mu\text{g}$ ) com os fatores LHF-I (10  $\mu\text{g}$ ), LHF-II (50  $\mu\text{g}$ ) ou streptokinase (90  $\mu\text{g}$ ) em Tris-HCl 20 mM, pH 7,4 contendo NaCl 154 mM em 1 ml (volume final), foram incubados a 37 °C a vários intervalos de tempo. Alíquotas do incubado (50  $\mu\text{l}$ ) foram retiradas e testadas sobre o substrato cromogênico N-P-Tosyl-Gly-Pro-Lys-pNa como descrito em métodos (item 4.11). Controle das metaloproteinasas, streptokinase e plasminogênio foram também ensaiados para a atividade semelhante à plasmina.

## 5.8. Efeito da mutalisina II sobre a Proteína C

O método de ensaio enzimático sobre substrato cromogênico é baseado na determinação da atividade amidolítica da proteína C ativada (proteína Ca) plasmática. Como controle foi usada a enzima ativadora "Protac", isolada do veneno de *Agkistrodon contortrix contortrix*. O aumento na absorbância a 405 nm indica liberação hidrolítica da p-nitroanilina, catalisada pela proteína Ca. Os resultados apresentados na tabela V indicam que a enzima de *Lachesis* não ativa a proteína C.

**TABELA V****Efeito da mutalisina II sobre a Proteína C**

Reagentes	Mistura							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Tampão	+	+	+	+	+	+	+	+
Plasma humano de referência	-	+	+	-	-	-	+	+
Substrato *	-	-	+	+	-	-	+	+
Protac	-	-	-	-	+	-	+	-
Mutalisina II	-	-	-	-	-	+	-	+
A 405 <sub>nm</sub> **	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,305	0,00

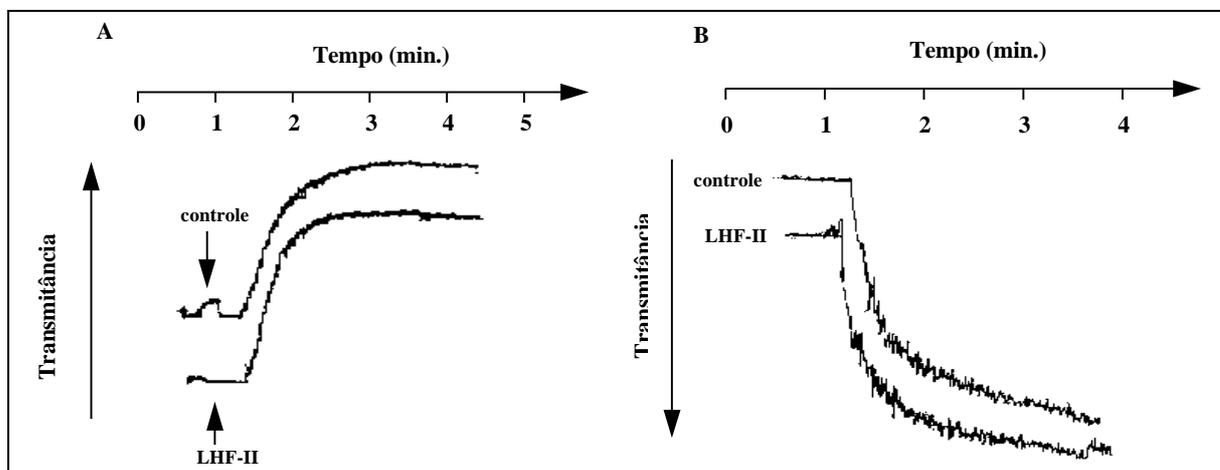
Uma solução de plasma humano de referência em tampão Tris-HCL 0,04 M, pH 7,4 contendo NaCl 0,154 M e concentrações adequadas da enzima Protac ou LHF-II, num volume final de 500 µl, foi incubada por 10 minutos a 37 °C. Em seguida, foram adicionados 200 µl de substrato cromogênico específico e a solução foi novamente incubada por 10 minutos a 37 ° C. Outros detalhes são descritos em métodos (item 4.12).

\* Substrato: H-D-Lys-Pro-Arg-pNa (5,5 mM).

\*\*O resultado é a média de duas determinações em duplicata.

### 5.9. Efeito da mutalisina II (LHF-II) sobre a agregação plaquetária induzida pelo colágeno ou ADP

A mutalisina II, em concentrações crescentes (até 3,47  $\mu\text{M}$ , concentração final), não inibe a agregação plaquetária em PRP humano induzido pelo colágeno. Resultados similares foram obtidos quando o ADP foi usado como agonista, figura 13 (A e B).



**Figura 14 - Efeito da mutalisina II (LHF-II) sobre a agregação plaquetária induzida pelo colágeno ou ADP em plasma humano rico em plaquetas (PRP).**

PRP (450  $\mu\text{l}$ ) foi incubado com LHF-II (3,47  $\mu\text{M}$ , volume final), por 1 minuto a 37  $^{\circ}\text{C}$  antes da adição de (A), colágeno, 50  $\mu\text{M}$ , (utilizando o agregômero Zenite) ou ADP (10 a 20  $\mu\text{M}$ ) utilizando o agregômero de Helena Laboratories (B). Inibição da agregação era monitorada pela adição de concentrações adequadas da mutalisina II antes da adição do agonista. Como controle de inibição foi usado um nonapeptídeo contendo a sequência RGD ( $\text{IC}_{50}=70 \text{ nM}$ ) (Sánchez e cols., 1997, dados não mostrados).

### 6.1. Propriedades bioquímicas das mutalisinas

Do veneno de *L. m. muta* foram purificadas até o estado homogêneo, as metaloproteinases mutalisina I e mutalisina II, de acordo com os procedimentos descritos por Sanchez e cols.(1987, 1991a). A maioria das metaloproteinases de venenos de serpentes, incluindo as reprotisinas de *Lachesis*, hidrolisam principalmente a ligação peptídica X-Leu da cadeia  $\beta$ -oxidada da insulina. Estas observações reforçam o conceito de que estas proteínas hidrolisam vários substratos naturais e/ou sintéticos com especificidade para o resíduo hidrofóbico em P<sub>1</sub>' (Takeya e cols., 1993; Bjarnason e Fox, 1994; Sanchez e cols., 1995a). Assim, a mutalisina I (LHF-I) é caracterizada por apresentar forte atividade hemorrágica (2.000U/mg, veneno bruto 62 U/mg) e especificidade restrita para o substrato. Estas propriedades geralmente são compartilhadas pelas reprotisinas da classe IV (Mr 80-100kDa) (Takeya e cols., 1993).

A mutalisina II, ao contrário, apresenta baixo efeito hemorrágico (62 U/mg) e elevada atividade proteolítica sobre a cadeia  $\beta$ -oxidada da insulina (4,266 U/mg, veneno bruto 1.660 U/mg) (Sanchez e cols., 1995a).

Igualmente às outras reprotisinas descritas na literatura, as mutalisinas são zinco-endopeptidases e suas atividades biológicas são irreversivelmente inibidas por agentes quelantes como o EDTA. Além disso, os íons cálcio parecem estabilizar as toxinas hemorrágicas em solução aquosa. Um dos sítios de ligação ao cálcio foi identificado na estrutura cristalina da adamalisina II e da atrolisina c (Gomis-Rüth e cols., 1993; Zhang e cols., 1994).

## 6.2. Atividade fibrinogenolítica das mutalisinas I e II

Os efeitos das mutalisinas I e II sobre o fibrinogênio foram conduzidos em ensaios de hidrólise em função do tempo. As figuras 5 e 6 mostram que o fibrinogênio, em condições redutoras, é separado em suas cadeias  $A\alpha$ ,  $B\beta$ , e  $\gamma$ , respectivamente.

Nas condições experimentais a mutalisina I hidrolisou a cadeia  $A\alpha$  e mais lentamente a cadeia  $B\beta$ , enquanto a cadeia  $\gamma$  mostrou-se resistente à hidrólise em até 120 minutos de incubação (figura 5).

De maneira semelhante à mutalisina I, a mutalisina II hidrolisou rapidamente a cadeia  $A\alpha$  e lentamente a cadeia  $B\beta$ , permanecendo a cadeia  $\gamma$  inalterada durante todo o período de incubação, 120 minutos (figura 6).

Por ser uma metaloproteinase, a hidrólise do fibrinogênio foi completamente abolida quando uma preparação da enzima foi previamente tratada com EDTA (2 mM) por 30 minutos à temperatura ambiente (dados não mostrados). Pelo fato de não liberarem fibrinopeptídeos A e/ou B e gerarem fragmentos diferentes, tornando o fibrinogênio incoagulável pela trombina, as mutalisinas são classificadas como anticoagulantes (Hutton e Warrell, 1993; Marsh, 1994). Os produtos de hidrólise do fibrinogênio, liberados por ambas as reprotinas, mostram pelo menos um fragmento de aproximadamente 48 kDa (figuras 5 e 6). A liberação deste fragmento, comum a ambas as mutalisinas, e o mecanismo de ação semelhante, indicam que as duas mutalisinas são estruturalmente relacionadas.

Outras metaloproteinases com atividade fibrinogenolítica  $A\alpha > B\beta$  foram descritas nos venenos de *C. h. horridus* (Civello e cols., 1983), *T. gramineus* (Huang e cols., 1984), *A. acutus* (Yagihashi e cols., 1986), *C. r. ruber* (Mori e cols., 1987), *C. rhodostoma* (Bando e cols., 1991), *C. b. basiliscus* (Retzios e Markland, 1992) e *A. h. brevicaudatus* (Fujimura e cols., 1995). Os efeitos fibrino(geno)líticos são relacionados com a potente ação tóxica dos venenos hemorrágicos (Lee e Lee, 1979).

### 6.3. Atividade fibrinolítica das mutalisinas I e II

A degradação da fibrina foi realizada utilizando as mesmas técnicas empregadas para investigar o efeito das mutalisinas sobre o fibrinogênio. A análise por SDS-PAGE da fibrina padrão e após diferentes tempos de incubação (na presença do redutor  $\beta$ -mercaptoetanol) com ambas as enzimas, revelou que a mutalisina II (0,2  $\mu$ M), nas condições de ensaio, hidrolisou completamente a cadeia  $A\alpha$  entre os 15 e 30 minutos (figura 9). Simultaneamente com o desaparecimento da cadeia  $\alpha$  foi observado o aparecimento de um principal produto de aproximadamente  $M_r$  43 kDa, e de outros fragmentos menores que não são retidos no gel (12%). Após 60 minutos de incubação as cadeias  $\alpha$  e  $\gamma$  também foram completamente hidrolisadas pela enzima, além da digestão parcial do fragmento de 43 kDa. Os resultados sugerem que a enzima hidrolisou várias ligações peptídicas da fibrina. O efeito é correlacionado com a ampla especificidade pelo substrato que caracteriza as metaloenzimas  $\alpha$ -fibrino(geno)líticas dos venenos de serpentes da classe I (reprolisinas classe I).

O padrão de hidrólise da fibrina pela mutalisina I (0,56  $\mu$ M) revelou que a cadeia  $\alpha$  é o principal alvo da atividade por esta reprolisina. Diferentemente da mutalisina II, já aos 15 minutos e até 240 minutos de incubação, houve hidrólise total da cadeia  $\alpha$ , sem aparente digestão das cadeias  $\beta$  e  $\gamma$ , figura 8. O principal produto de hidrólise, um polipeptídeo de aproximadamente 43 kDa (comum a ambas as reprolisinas) mostrou-se intacto durante todo tempo de incubação com a enzima. A intensidade da banda de proteína não se alterou no intervalo de tempo de incubação. O padrão geral de hidrólise da fibrina pela mutalisina I, indica a especificidade muito restrita da clivagem de ligação peptídica por esta enzima hemorrágica, coerentemente com a hidrólise muito lenta de substratos sintéticos como o AbZ-Pro-Leu-Gly-Leu-Leu-Gly-Arg-EDDnp e a cadeia  $\beta$  da insulina (Sanchez, 1995a).

#### 6.4. Isolamento dos fragmentos do fibrinogênio após incubação com a mutalisina II

Para a determinação do sítio inicial de hidrólise do fibrinogênio, o substrato foi incubado com a enzima por 20 minutos. Este tempo mostrou ser ótimo para a acumulação dos primeiros produtos de hidrólise. Depois de interrompida a reação com EDTA, os fragmentos foram separados por HPLC fase reversa em coluna Vydac C<sub>4</sub>. Os protocolos e o HPLC usados neste estudo foram os mesmos usados por Retzios e Markland (1988) para a identificação da ligação peptídica hidrolisada pela fibrolase, enzima isolada do veneno de *A. c. contortrix* (metaloproteinase homóloga da mutalisina II, Mr 23 kDa). A superposição do cromatograma obtido para a mutalisina II ao da fibrolase, mostrou que os dois são idênticos, obtendo-se a separação de dois principais fragmentos com tempos de retenção 29,39 e 36,46 minutos (figura 10). Retzios e Markland (1988) analisaram a sequência de aminoácidos dos fragmentos gerados pela digestão do fibrinogênio pela fibrolase e identificaram a ligação Lys<sub>413</sub> e Leu<sub>414</sub> na cadeia A $\alpha$  como o sítio primário de hidrólise. Tendo como base estes estudos, podemos especular que a mutalisina II também hidrolise primeiramente a ligação Lys-Leu na cadeia A $\alpha$  do fibrinogênio. No entanto, esta afirmação só poderá ser confirmada pela sequência de aminoácidos dos fragmentos. Em adição, Lin e cols. (1986) reportaram que a ligação Lys<sub>413</sub> - Leu<sub>414</sub> não é afetada pela plasmina. Por outro lado, o peptídeo fluorogênico AbZ-Met-Lys-Arg-Leu-Pro-EDDnp foi hidrolisado pelas mutalisinas I e II na ligação Arg-Leu (Sanchez e cols., dados não publicados). Estas observações, junto com outros estudos (Sanchez e cols., 1995a), mostram que a especificidade das mutalisinas é dirigida ao resíduo de leucina em P'<sub>1</sub>. É importante ressaltar que estes dados, quando comparados com os da literatura especializada, demonstram claramente que as metaloenzimas degradam diretamente a fibrina/fibrinogênio e não requerem qualquer intermediário para a reação (Retzios e Markland, 1988, 1992; Stocker, 1990; Hutton e Warrell, 1993).

## 6.5. Efeito dos fatores hemorrágicos sobre o plasminogênio

Foram realizados estudos *in vitro* para excluir a ação fibrinolítica direta das metaloproteinases LHF-I e LHF-II de possível efeito indireto (promovendo ativação do plasminogênio), através da medida da atividade amidolítica sobre os substratos cromogênicos específicos para plasmina, H-D-Val-Leu-Lys-pNa e N-P-Tosyl-Gly-Lys-pNa. Quando alíquotas dos incubados do plasminogênio+streptokinase foram ensaiadas sobre os peptídeos cromogênicos, as leituras de A 405 nm foram da mesma ordem daquelas obtidas com o controle plasmina (tabela IV e figura 13). Os fatores hemorrágicos não hidrolisaram estes substratos, excluindo assim, o possível efeito fibrinolítico indireto. Resultados semelhantes foram recentemente descritos para a metaloproteinase fibrolase, isolada do veneno de *A. c. contortrix* (Ahmed e cols., 1990). Entretanto, o veneno bruto incubado com o plasminogênio mostrou efeito significativo na hidrólise dos substratos cromogênicos comportando-se de maneira semelhante às enzimas que promovem ativação do plasminogênio, como a streptokinase e a urokinase (Ichinose e cols., 1984). Quando uma solução de veneno bruto foi incubada com o plasminogênio, seguido de análise por SDS-PAGE (condições redutoras), foi observado o aparecimento de uma banda de aproximadamente 25 kDa, que corresponde à cadeia leve da plasmina (dados não mostrados). O plasminogênio humano (Sigma) analisado por SDS-PAGE em condições redutoras (figura 12), mostra uma cadeia polipeptídica simples de aproximadamente 93 kDa. Esta forma contém um resíduo de ácido glutâmico no amino-terminal e é denominado Glu-plasminogênio (Glu-Plg). Na mesma preparação do controle (P), observa-se outras duas formas de Glu-Plg com massas de aproximadamente 64 e 34 kDa, respectivamente (Ichinose e cols., 1984; Robinson e Browne, 1991; Zbikowska e Krajewski, 1991). Quando a preparação de plasminogênio foi incubada com a mutalisina II (relação plasminogênio : mutalisina II, 2:1) a vários intervalos de tempo, a banda de 93 kDa foi digerida rapidamente (15 minutos) e em tempos prolongados de incubação foi observado também a hidrólise da banda de 64 kDa. No entanto, a banda de 34 kDa se mostrou resistente à hidrólise pela reprotolisina de *Lachesis*.

O aumento da absorvância a 405 nm (aproximadamente 10 vezes) pelo veneno bruto previamente tratado com EDTA (2,5 mM), comparado com a preparação de veneno não tratado, sugere que alguma serino-proteinase seja responsável pela ativação do plasminogênio (tabela IV). De fato, a hidrólise dos substratos cromogênicos foi completamente abolida quando o veneno bruto foi previamente tratado com PMSF (10mM). Estes resultados são justificados pela bem caracterizada propriedade de serino-proteinase do ativador de plasminogênio, muito sensível à inibição pelo PMSF e outros inibidores de serino-proteinases do plasma (Morris e cols., 1981; Beebe e Aronson, 1986). O envenenamento em humanos e outros mamíferos por serpentes peçonhentas Viperidae, é caracterizado pela inibição da coagulação sanguínea devido à atividade de enzimas fibrino(geno)líticas. Como a enzima coagulante do fibrinogênio obtida do veneno de *L. m. muta* (gentilmente cedida pelo Prof. Arinos Magalhães), constitui uma das serino-proteinases presentes neste veneno, realizamos teste de ativação do plasminogênio utilizando o peptídeo N-p-Tosyl-Gly-Pro-Lys-pNa como substrato de plasmina. Os resultados mostraram que esta enzima não ativa o plasminogênio indicando que alguma outra serino-proteinase do veneno seria responsável por esta atividade. Klocking e cols. (1987), reportaram que a enzima coagulante do veneno de *B. moojeni*, batroxobina, libera o ativador do plasminogênio (t-PA) em modelos experimentais *in vivo*. Recentemente, Zhang e cols. (1995) isolaram e caracterizaram o ativador do plasminogênio do veneno de *Trimeresurus stejnegeri*.

#### **6.6. Efeito da mutalisina II sobre a proteína C**

A proteína C ativada (P Ca), uma serino-proteinase dependente de vitamina K, exibe sua atividade anticoagulante através da degradação proteolítica dos fatores Va e

VIIIa, participando, desta maneira, na regulação do processo hemostático (Klein e Walker, 1986; Kisiel e cols., 1987; Hutton e Warrell, 1993).

Estudos para investigar se os efeitos anticoagulantes da enzima fibrinogenolítica mutalisina II, poderia ocorrer também por envolvimento da proteína C, foram conduzidos por método enzimático através da medida da

atividade amidolítica sobre substrato cromogênico específico. Os resultados apresentados na tabela V indicam que a mutalisina II não ativa a proteína C nas condições experimentais utilizadas. O controle Protac (Sigma), isolado do veneno de *A. c. contortrix*, hidrolisa rapidamente o substrato para a proteína C ativada ( $A_{405\text{ nm}} = 0,305$ ). Este componente do veneno é muito específico e exerce sua atividade independentemente da trombomodulina e da trombina, características que fazem de Protac um reagente de laboratório muito utilizado para ensaio de proteína C (Klein Walker, 1986; Kisiel e Walker, 1987; Stocker e cols., 1988; Hutton e Warrel, 1993).

Aparentemente as enzimas fibrinogenolíticas de venenos Viperidae, com Mr aproximada de 23 kDa (reprolisinas classe I), não ativam a proteína C. Assim, Retzios e Markland (1988) demonstraram que a fibrolase, enzima fibrinolítica isolada do veneno de *A. c. contortrix* não mostrou efeito na ação da proteína C em inibir a coagulação *in vitro*, ficando esclarecido que as proteinases fibrolase e Protac, presentes no mesmo veneno, exercem seus efeitos anticoagulantes por mecanismos diferentes.

#### **6.7. Efeito da mutalisina II (LHF-II) sobre a agregação plaquetária induzida pelo colágeno ou ADP**

Os venenos de serpentes, em especial os da família Viperidae, apresentam diversos componentes que afetam a coagulação sanguínea e a função plaquetária por mecanismos bioquímicos diferentes. Entre estes componentes são de especial importância os antagonistas dos receptores do fibrinogênio. Estes antagonistas são peptídeos que contêm a sequência RGD e são coletivamente denominados desintegrinas. Eles interferem na interação do fibrinogênio com a glicoproteína IIb/IIIa (GPIIb/IIIa) na superfície das plaquetas. Seu mecanismo de ação faz das desintegrinas atraentes instrumentos de pesquisa no estudo dos processos hemostáticos, sendo que alguns destes peptídeos (naturais ou sintéticos) são potenciais agentes antitrombóticos (Teng e Huang, 1991; Hutton e Warrell, 1993; Niewiarowski e cols., 1994; Blockmans e cols., 1995; Pueyo e cols., 1996).

As plaquetas desempenham um papel essencial nas primeiras fases do processo hemostático. O receptor das plaquetas, GPIIb/IIIa, é ativado por

diversos agonistas e pelo “binding” ao fibrinogênio (através de sua sequência específica, RGD) (Nicholson e cols., 1994). O “binding” do fibrinogênio à glicoproteína GPIIb/IIIa, requerido para a ativação das plaquetas, é o processo final comum dos eventos que conduzem à formação do trombo.

Foram realizados estudos orientados ao esclarecimento da relação estrutura-função da mutalisina LHF-II sobre as plaquetas. Em nossos ensaios, a mutalisina II, em concentrações crescentes (até 3,47  $\mu$ M, concentração final), não inibe a agregação plaquetária em plasma rico em plaquetas (PRP) humano induzida pelo ADP. Resultados semelhantes foram obtidos quando o colágeno foi usado como agonista, figura 13 (A e B).

Tem sido reportado que as enzimas  $\alpha$ -fibrinogénicas de alguns venenos de serpentes inibem a agregação, induzidas pelo ADP, de plaquetas lavadas de coelho. Este efeito inibitório mostrou ser dependente da concentração de enzimas e do tempo de incubação com a solução de plaquetas, indicando o envolvimento da atividade enzimática. Além disso, os agentes químicos que inibem a atividade fibrinogénica também aboliram o efeito antiplaquetário (Ouyang e Huang, 1977; Teng e Huang, 1991). Essas observações sugerem que os resultados obtidos com a mutalisina II sejam consequência do curto tempo de incubação (1 minuto antes da adição do agonista) da enzima com a solução de PRP, assim como também pela degradação parcial do fibrinogênio. Estes resultados também são explicados pela ausência do domínio semelhante à desintegrina na estrutura deste grupo de metaloproteinases.

Resultados similares foram recentemente verificados para a enzima homóloga, fibrolase, do veneno fibrolase de *A. c. contortrix* (Sanchez e cols., 1997). Devemos ressaltar aqui, a importância das cadeias  $A\alpha$  e  $\gamma$  da molécula do fibrinogênio na interação deste com seus receptores nas plaquetas (Niewiarowski e cols., 1977, 1994; Pueyo e cols., 1996).

Muitas  $\alpha$ -fibrinogénases de venenos de serpentes, especialmente as reprotisinas classe III e IV, são fortemente hemorrágicas (ver estrutura na figura 1). O potencial hemorrágico destas metaloproteinases tem sido atribuído aos domínios semelhante à desintegrina e rico em cisteína, os quais desempenham efeito sinérgico, orientando a enzima aos substratos e, desta forma,

incrementando a concentração local das proteinases (Kini e Evans, 1992; Hutton e Warrell, 1993; Bjarnason e Fox, 1994, 1995; Zhou e cols., 1995). A metaloproteinase jararagina-C isolada do veneno de *B. jararaca*, revelou forte efeito inibitório na agregação de plaquetas induzidas por ADP e colágeno. O efeito foi explicado pela presença dos domínios semelhante à desintegrina e rico em cisteína na estrutura da proteína (Usami e cols., 1994). Smith e cols. (1991) identificaram proteínas de 50 kDa nos venenos de *B. atrox*, *B. jararaca*, *A. halys blomhoffii* e *C. basiliscus* que mostraram forte efeito inibitório na agregação de plaquetas induzida pelo colágeno, mas não por ADP e outros agonistas.

Estudos semelhantes foram recentemente publicados para a catrocolastatina (metaloproteinase de 50 kDa) do veneno de *C. atrox*. Esta enzima inibe completamente a agregação plaquetária induzida pelo colágeno, porém não bloqueia o efeito induzido por ADP (Zhou e cols., 1995). Neste contexto, a determinação da estrutura primária da mutalissina I (proteína multimodulada de 100 kDa), projeto de pesquisa da Fundação Ezequiel Dias, deverá fornecer informações importantes ao esclarecimento da relação estrutura-função das reprotolisinas do veneno de *Lachesis*.

Os estudos relacionados com a lesão endotelial, assim como os variados quadros patológicos envolvendo a participação das plaquetas, têm despertado o interesse de numerosos pesquisadores na procura de uma nova geração de drogas antitrombóticas e relacionadas.

## CONCLUSÕES.7

---

7.1 As metaloproteinases, mutalisina I e II (LHF-I e LHF-II), isoladas do veneno de *Lachesis muta muta*, hidrolisam fibrinogênio gerando produtos incoaguláveis e dissolvem fibrina por ação direta, sem ativar plasminogênio.

7.2 As endoproteinases hemorrágicas são diferentes da enzima semelhante à trombina presente no veneno.

7.3 O veneno bruto, além destes dois grupos de proteinases, contém serino-proteinases, que ativam o plasminogênio com atividade semelhante à streptokinase.

7.4 A mutalisina II (LHF-II) não exerce atividade sobre a agregação plaquetária induzida pelo colágeno ou ADP.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.8

---

- AHMED, N. K.; TENNANT, K. D.; MARKLAND, F. S. e LACZ, J. P. (1990) Biochemical characteristics of fibrolase, a fibrinolytic protease from snake venom. *Haemostasis* **20**, 147-154.
- ASSAKURA. M.; REICHL; ASPERTI, M. C. e MANDELBAUM, F. R. (1985) Isolation of the major proteolytic enzyme from the venom of the snake *Bothrops moojeni* (caissaca). *Toxicon* **23**, 691-906.
- ASTRUP, T. e MULERTZ, S. (1952) The plate method for estimating fibrinolytic activity. *Arch. Biochem. Biophys.* **40**, 346-351.
- BAKER, B. J.; WONGVIBULSIN, S.; NYBORG, J.& TU, A.T. (1995) Nucleotide sequence encoding the snake venom fibrinolytic enzyme atroxase obtained from a *Crotalus atrox* venom gland cDNA library. *Arch. Biochem. Biophys.* **317**, 357-364.
- BANDO, E.; NIKAI, T. & SUGIHARA, H. (1991). Hemorrhagic protease from the venom of *Calloselasma rhodostoma*. *The Journal Biochem.* **23**, 1193-1199.
- BARAMOVA, E. N.; SHANNON, J. D.; BJARNASON, J. B. & FOX, J. W. (1989) Degradation of extracellular matrix proteins by hemorrhagic metalloproteinases. *Arch. Biochem. Biophys.* **275**, 63-71.
- BEEBE, D. P. & ARONSON, D. L. (1986) Turnover of human tissue plasminogen activator (t-PA) in rabbits. *Thrombosis Research* **43**, 663-674.
- BJARNASON, J. B.; HAMILTON, D. & FOX, W. j. (1988) Studies on the mechanism of hemorrhage production by five proteolytic hemorrhagic toxins from *Crotalus atrox* venom. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* **369**, 121-129.
- BJARNASON, J.B. & TU, A. T. (1978) Hemorrhagic toxins from western diamondback rattlesnake (*Crotalus atrox*) venom: isolation and characterization of five toxins and the role of zinc in hemorrhagic toxin e. *Biochemistry* **17**, 3395-3404

- BJARNASON, J. B & FOX, J. W. (1994) Hemorrhagic metalloproteinases from snake venoms. *Pharmac. Ther.* **62**, 325-372.
- BJARNASON, J. B & FOX, J. W. (1995) Snake venom metalloendopeptidases: reprolysins. *Methods in Enzimology* **248**, 345-387.
- BLOBEL, C. P. & WHITE, J. M. (1992) Structure, function and evolutionary relationship of proteins containing a disintegrin domain. *Curr. Opin. Cell Biol.* **4**, 760-765
- BLOCKMANS, D.; DECKMYN, H. & VERMYLEN, J. (1995) Platelet activation. *Blood Reviews* **9**, 143-156.
- BODE, W.; GOMIS-RUTH, F. & STOCKER, W. (1993) Astacins, serralysins, snake venom and matrix metalloproteinases exhibit identical zinc-binding environments (HEXXHXXGXXH and Met-turn) and topologies and should be grouped into a common family, the 'metzincins'. *FEBS Lett.* **331**, 134-140.
- BRASIL, V. & VELLARD, E. P (1928) Contribuição ao estudo da coagulação e da proteólise. *Brasil Médico* **40**, 239-243.
- CALVETE, J. J. (1995) On the structure and function of platelet integrin  $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ , the fibrinogen receptor (43863A). *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **208**, 346-360.
- CARRILLO, N. E. (1983) Contribucion al conocimiento de las serpientes venenosas del Perú de las familias Viperidae, Elapidae e Hydrophidae. *Publicaciones del Museo de historia nat. Prado. Série A*, **30** 1-55. universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima.
- CIVELLO, D. J.; DUONG; H. I. & GEREN; C. R. (1983) Isolation and characterization of a hemorrhagic proteinase from timber rattlesnake venom. *Biochemistry* **22**, 749-755.
- COLLEN, D.; LU, H. R.; STASSEN, J.; VREYS, I.; YASUDA, T.; BUNTING, S. & GOLD, H. (1994) Antithrombotic effects and bleeding and time prolongation with synthetic platelet GPIIb/IIIa inhibitors in animal models of platelet-mediated thrombosis. *Thromb. Haemost.* **71**, 95-102.

- CUNHA, O. R. & NASCIMENTO, F. P. (1975) As serpentes peçonhentas do gênero *Bothrops* (jararaca) e *Lachesis* (surucucu) da região leste do Pará (Ophidia, Viperidae). *Bol. Mus. Par. Emilio Goeldi, Nova ser. Zool.* **83**, 1-42.
- CUNHA, O. R. & NASCIMENTO, F. P. (1982) As espécies de *Micrurus*, *Bothrops*, *Lachesis* e *Crotalus* do sul do Pará e oeste do Maranhão, incluindo áreas de cerrado deste Estado (Ophidia Elapidae e Viperidae). *Bol. Mus. Par. Emilio Goeldi, Nova Zool.* **112**, 1-58
- DA SILVA, N. J.; AIRD, S. D.; SEEBART, C. & KAISER, I. I. (1989) A girotxin analog from the venom of the bushmaster (*Lachesis muta muta*). *Toxicon* **27**, 763-771.
- DE LA VEGA, E., ZAVALETA, A., CARRILO, N. & TRELLES, I. (1989) Accidentes producidos por animales ponzonosos: serpientes venenosas del Perú. In: *Anales del Seminario Nacional del Zoonosis Y Enfermedades de Transmision Alimentaria*. pg. 1678-188. Lima, Ministério de Salud.
- DENNIS, M. S.; HENZEL, W. J.; PITTI, R. M.; LIPARI, M. T.; NAPIER, M. A.; DEISHER, T. A.; BUNTING, S. & LAZARUS, R. A. (1990) Platelet glycoprotein Ib-IIIa protein antagonists from snake venoms: evidence for a family of platelet-aggregation inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 2471-2475.
- DEUTSCH, H. F. & DINIZ, C.R. (1955) Some Proteolytic activities of snake venoms. *J. Biol. Chem.* **216**, 17-26
- DINIZ, M. V. & OLIVEIRA, E. B. (1992) Purification and properties of a kininogenin from the venom of *Lachesis muta* (Bushmaster). *Toxicon* **3**, 247-258.
- DOURADO, H. V.; BUHENHEIM, P. F.; SOUZA, I. S.; ROCHA, A. J. F & SANTOS, S. (1988) Ofidismo no Amazonas. *Resumo do XXIV Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. Manaus-AM, P 119.
- FINNEY, D. J. (1971) Probit analysis 3rd Edn. *Cambridge University Press*. Cambridge.
- FUJIMURA, S.; RIKIMARU, T.; BABA, S.; HORI, J.; HAO, X.; TERADA, S. & KIMOTO, E. (1995) Purification and characterization of a non-hemorrhagic metalloprotease

- from *Agkistrodon halys brevicaudatus* venom. *Biochem. Biophys. Acta* **1243**, 94-100.
- GOMIS-RUTH, F.; KRESS, L. F. & BODE, W. (1993) First structure of a snake venom metalloproteinase: a prototype for matrix metalloproteinases/collagenases. *EMBO Journal*, **12**. 4151-4157.
- GOWDA, D. C.; JACKSON, C. M.; HENSLEY, P. & DAVIDSON, E. A. (1994) Factor X-activating glycoprotein of russell's viper venom. *J.Biol. Chem.* **269**, 10644-10650.
- GUTIERREZ, J. M. & CHAVES, F. (1980) Efectos proteolitico, hemorragico y mionecrotico de los venenos de serpientes costarricenses de los generos *Bothops*, *Crotalus* y *Lachesis*. *Toxicon* **18**, 315-321.
- HITE, L. A.; SHANNON, J. D.; BJARNASON, J. B. & FOX, J. W. (1992) Sequence of a cDNA clone encoding the zinc metalloproteinase hemorrhagic toxin e from *Crotalus atrox*: evidence for signal, zymogen, and disintegrin-like structures. *Biochemistry* **31**, 6203-6211.
- HITE, L. A.; JIA, L.; BJARNASON, J. B. & FOX, J. W. (1994) cDNA sequences for four snake venom metalloproteinase: structure, classification, and their relationship to mammalian reproductive proteins. *Arch. Biochem. Biophys.* **308**, 182-191.
- HOGUE, A. R. & ROMANO-HOGUE, S. I. (1978) Sinopse das serpentes peçonhentas do Brasil. *Mem. Inst. Butanta* 42/43, 179-309.
- HUANG, T.F., CHANG, J.H. & OUYANG, C. (1984) Characterization of hemorrhagic principles from *Trimeresurus gramineus* snake venom. *Toxicon* **22**, 45-52.
- HUTTON, R. A. & WARRELL, D. A. (1993) Action of snake venom components on the haemostatic system. *Haemost. Thromb.* **7**, 176-189.
- ICHINOSE, A.; KISIEL, W. & FUJIKAWA, K. (1984) Proteolytic activation of tissue plasminogen activator by plasma and tissue enzymes. *FEBS. Lett.* **175**, 412-418.
- IWANAGA, S. & SUZUKI, T. (1979) Enzymes in snake venoms. *Handbook Exp. Pharm.* **52**, 61-158.

- KINI, R. M. & EVANS, H. J. (1992) Structural domains in venom proteins: evidence that metalloproteinases and nonenzymatic platelet aggregation inhibitors (disintegrins) from snake venoms are derived by proteolysis from a common precursor. *Toxicon* **30**, 265-293.
- KISHIDA, M.; NIKAI, T.; KOHMURA, S. & SUGIHARA, H. (1985) Characterization of mucrotoxin A from venom of *Trimeresurus mucrosquamatus* (the chinese habu snake). *Toxicon* **23**, 637-645.
- KISIEL, W.; KONDO, S.; SMITH, K. J. ; McMULLEN, B. A. & SMITH, L. F. (1987) Characterization of a protein C activator from *Agkistrodon contortrix contortrix* venom. *J. Biol. Chem.* **262**, 12607-12613.
- KLEIN, J. D. & WALKER, F. J. (1986) Purification of a protein C activator from the venom of the southern copperhead snake (*Agkistrodon contortrix contortrix*). *Biochemistry* **25**, 4175-4179.
- KLOCKING, H. P.; HOFFMANN, A & MARKWARDT, F. (1987) Release of plasminogen activator by batroxobin. *Haemostasis* **17**, 235-237.
- KONDO, H.; KONDO, S. I.; KEGAWA, H.; MURATA, R. & OSHAKA, A. (1960) Studies on the quantitative method for determination of hemorrhagic activity of Habu snake venom. *Jph. J. Med. Sci. Biol.* **13**,43-51.
- KUNITZ, M. (1946) Crystalline soybean trypsin inhibitor II general properties. *J. Gen. Physiol.* **30**, 291-310.
- LAEMMLI, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- LEE, C. Y. & LEE, S. Y. (1979) Cardiovascular effects of snake venoms. *In*: Lee, C. Y. Ed., *Snake Venoms, Handbook of Experimental Pharmacology*. Berlin: Springer-Verlag 52, 547-590.
- LIJNEN, H. R. & COLLEN, D. (1994) Development of new fibrinolytic agents. *In*: *Haemost. Thromb.* (Arthur L. Bloom, C. D. Forbes, D. P. Thomas and E. G. D. Tuddenham eds.) **1**, Third Ed. Churchill Livingstone. Edinburg, London, Madrid, Melbourne, New York and Tokio.

- LIMA-FERREIRA, L. C. (1990) Estudo experimental das alterações histopatológicas locais e sistêmicas, e da coagulação induzida pelo veneno da *Lachesis muta muta* em coelhos e cães. Tese de Doutorado apresentada ao Departamento de Medicina Legal e Anatomia Patológica da Universidade Federal de Minas Gerais.
- LIN, Y., MEANS, G. E & FEENY, R. E. (1969) The action of proteolytic enzymes on N,N-Dimethyl proteins. *J. biol. Chem.* **224**, 778-793.
- LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L. & RANDALE, R. J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275.
- MAGALHÃES, A.; OLIVEIRA, G. J. & DINIZ, C. R. (1973) Proteases de serpentes brasileiras I. Separação da enzima coagulante (clotase) de veneno de *Lachesis muta noctivaga*. *Cien. Cult.* **25**, 872.
- MAGALHÃES, A.; OLIVEIRA, G. J. & DINIZ, C. R. (1981) Purification and partial characterization of a thrombin-like enzyme from the venom of the bushmaster snake *Lachesis muta noctivaga*. *Toxicon* **19**, 279-294.
- MANDELBAUM, F. R.; & ASSAKURA, M. T. (1988) Antigenic relationship of hemorrhagic factors and proteases isolated from the venom of three species of *Bothrops* snakes. *Toxicon* **26**, 379-385.
- MARKLAND, F. S. (1988) Fibrin(oge)nolytic enzymes from snake venoms. *In: Hemostases and animal venoms* (Pirkle, H. Markland, F.S. Eds.) Marcel Dekker, New York pp 149-172.
- MARKLAND, F.S. (1991) Inventory of  $\alpha$ - and  $\beta$ -fibrinogenases from snake venoms *Thromb. Haemost.* **65**, 438-443.
- MARKLAND, F.S.; FRIEDRICH, G. S.; PEWITT, S. R & LUCCHESI, B. R. (1994) Thrombolytic effects of recombinant fibrolase or APSAC in a canine model of carotid artery thrombosis. *Circulation* **90**, 01-08.
- MARSH, N. (1994) Inventory of haemorrhagic factors from snake venoms. *Thromb. Haemost.* **71**, 793-797.

- MENESES, O. G. (1974) Ofidios y ofidismo en el Perú II. Aspectos ecologicos de la fauna ofidica ponzoñosa. *Rev. Inst. Zoonosis e Investigacion Pecuária* **2**, 79-84
- MIYATA, T.; TAKEYA, H.; OZEKI, Y.; ARAKAWA, M.; TOKUNAGA, S & OMORI-SATO, T. (1989) Primary structure of hemorrhagic protein, HR2a, isolated from the venom of *Trimeresurus flavoviridis*. *J. Biochem.* **105**, 847-853.
- MORI, N., NIKAI, T. & SUGIHARA, H.; TU, A. T. (1987) Biochemical characterization of hemorrhagic toxins with fibrinogenase activity isolated from *Crotalus ruber ruber* venom. *Arch. Biochem. Biophys.* **273**, 108-121.
- MORI, N., NIKAI, T. & SUGIHARA, H. (1984) Purification of a proteinase (AC5=proteinase) and characterization of hemorrhagic toxins from the venom of the hundred pace snake (*Agkistrodon acutus*). *Toxicon* **22**, 451-461.
- MORRIS, J. P.; BLATT, S.; POWELL, J. R.; STRICKLAND, D. K. & CASTELLINO, F. J. (1981) Role of lysine binding regions in the kinetic properties of human plasmin. *Biochemistry* **20**, 4811-4815.
- NICHOLSON, N. S.; PANZER-KNODLE, S. G.; KING, L. W.; TAITE, B. B.; KELLER, B. T.; TJOENG, F.S.; ENGELEMAN, V. W.; GIOGIO, T. D. & FEIGEN, L. P. (1994) A potent and specific inhibitor of platelet aggregation. *Thromb. Res.* **74**, 523-535.
- NIEWIAROWSKI, S.; KIRBY, E. P. & STOCKER, K. (1977) Thrombocytin: a novel platelet activating enzyme from *Bothrops atrox* venom. *Thromb. Res.* **10**, 863-869.
- NIEWIAROWSKI, S.; McLANE, M. A.; KLOCZEWIAK, M. & STEWART, G. (1994) Disintegrins and other naturally occurring antagonists of platelet fibrinogen receptors. *Semin. Haematol.* **31**, 289-300.
- NIKAI, T.; MORI, N.; KISHIDA, M.; KISHIDA, M.; SIGIHARA, H. & TU, A. T. (1984) Isolation and biochemical characterization of hemorrhagic toxin *f* from the venom of *Crotalus atrox* (western diamondback rattlesnake). *Arch. Biochem. Biophys.* **231**, 309-319.
- NOMENCLATURE COMMITTEE OF THE INTERNATIONAL UNION OF BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY (NC-IUBMB). ENZYME

NOMENCLATURE RECOMMENDATIONS 1992 - Supplement: Corrections and Additions. *Eur. J. Biochem.* **223**; 1-5; (1995) **232**, 1-6; (1996) **237**, 1-5.

OHSAKA, A. (1976) An approach to the physiological mechanisms involved in hemorrhage. Snake venom hemorrhagic principles as a useful analytical tool. Em: *Animal, Plant and Microbial Toxins I* 123-136. (Ohsaka, A., Hayashi, K., Sawai, Y. Eds). New York.

OHSAKA, A. (1979) Hemorrhagic, necrotizing and edema forming effects of snake venoms. *In: Snake venoms Handbook of Experimental Pharmacology* **52**, 480-546.

OUCHTERLONY, O. & NILSON, L. A. (1973) Immunodiffusion and immunoelectrophoresis. *In: Handbook of Experimental Immunology* (Weir D.M. Ed) 2nd. Edn. Vol. 1. Chapter 19. Blackwell Scientific Publisher, Oxford.

OUYANG, C. & HUANG, T.F. (1977) The properties of the purified fibrinolytic principle of *Agkistrodom acutus* venom. *Toxicon* **15**, 161-167.

OUYANG, C.; TENG, C. M & HUANG, T.F. (1992) Characterization of snake venom components acting on blood coagulation and platelet function. *Toxicon* **30**, 945-965.

OWNBY, C. L. & GEREN, C. R. (1987) Pathogenesis of hemorrhage induced by hemorrhagic proteinase IV from timber rattlesnake (*Crotalus horridus horridus*) venom. *Toxicon* **25**, 517-526

OWNBY, C. L.; NIKA, T.; IMAI, K & SUGIHARA, H. (1990) Pathogenesis of hemorrhage induced by bilitoxin, a hemorrhagic toxin isolated from the venom of the common cantil (*Agkistrodon bilineatus bilineatus*). *Toxicon* **28**, 837-846.

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.

PANDYA, B. V. & BUZYNSKI, A. Z. (1984) Anticoagulant proteases from western diamondback rattlesnake (*Crotalus atrox*) venom. *Biochemistry* **23**, 460-467.

- PLOW, E. F.; MARGUERIE, G. & GINSBERG, M. (1987) Fibrinogen receptors, and the peptides that inhibit these interactions. *Biochem. Pharmacol.* **36**, 4035-4040.
- PUEYO, C.; BADIMON, J. J.; ROYO, T.; FEIGEN, L. P & BADIMON, L. (1996) A mimetic of the RGDF-Peptide [arginine-glycine-aspartic acid-phenylalanine] blocks aggregation and flow-induced platelet deposition on severely injured stenotic arterial wall. Effects on different animal models and in humans. *Thromb. Res.* **81**, 101-112.
- RAN, Y.; ZHENG, S & TU, A. T. (1988) Biochemical characterization of two hemorrhagic proteases from the venom of *Lachesis muta* (bushmaster). *Chem. Res. Toxicol.* **1**, 337-342.
- RANDOLPH, A.; CHAMBERLAIN, S. H.; CHU, H. L.; RETZIOS, A. D.; MARKLAND, F. S. & MASIARZ, F. R. (1992) Amino acid sequence of fibrolase, a direct-acting fibrinolytic enzyme from *Agkistrodon contortrix contortrix* venom. *Protein Sci.* **1**, 590-600.
- RAWLINGS, N. D. & BARRETT, A. J. (1995) Evolutionary families of metalloproteinases. In *Methods in Enzymology - Proteolytic Enzymes*. **248**, Part E (Alan J. Barrett, ed.) Academic Press, pp 183-228.
- RETZIOS, A. D. & MARKLAND, F. S. (1988) A direct-acting fibrinolytic enzyme from the venom of *Agkistrodon contortrix contortrix*: affects on various components of the human blood coagulation and fibrinolysis systems. *Thromb. Res.* **52**, 541-552.
- RETZIOS, A. D & MARKLAND, F. S. (1992) Purification, characterization, and fibrinogen cleavage sites of three fibrinolytic enzymes from the venom of *Crotalus basiliscus basiliscus*. *Biochemistry* **31**, 4547-4557.
- RINDERKNECHT, H.; GEOKAS, M. C.; SILVERMAN, P & HAVERBACK, B. J. (1968) A new ultrasensitive method for the determination of proteolytic activity. *Clin. Chim. Acta* **21**, 197-203.
- ROBINSON, J. H. & BROWNE, M. J. (1991) Redesigning t-PA for improved thrombolytic therapy. *TIBTECH* **9**, 86-90.

- ROBINSON, J. H.; BROWNE, M. J.; CAREY, J. E.; CHAMBERLAIN, P. D.; CHAPMAN, C. G.; CRONK, D. W.; DODD, I.; ENTWISLE, C.; ESMAIL, A. F.; KALINDJIAN, S. B.; LAWRENCE, G. M. P.; McMURDO, L.; MITCHELL, D.; SMITH, R. A. G.; WILSON, S. (1992) A recombinant, chimeric enzyme with a novel mechanism of action leading to greater potency and selectivity than tissue-type plasminogen activator. *Circulation* **86**, 548-552.
- ROTE, W. E.; WERNS, S. W.; DAVIS, J. H.; FEIGEN, L. P.; KILGORE, K. S. & LUCCHESI, B. R. (1993) Platelet GPIIb/IIIa receptor inhibition by SC-49992 prevents thrombosis and rethrombosis in the canine carotid artery. *Cardiov. Res.* **27**, 500-507.
- SANCHEZ, E.F.; MAGALHÃES, A. & DINIZ, C.R. (1987) Purification of a hemorrhagic factor (LHF-I) from the venom of the bushmaster snake (*Lachesis muta muta*). *Toxicon* **25**, 611-619.
- SANCHEZ, E. F.; MAGALHÃES, A.; MANDELBAUM, F. R & DINIZ, C.R. (1991a) Purification and characterization of the hemorrhagic factor II from the venom of the bushmaster snake (*Lachesis muta muta*). *Biochim. Biophys. Acta* **1074**, 347-354.
- SANCHEZ, E. F.; DINIZ, C. R & RICHARDSON, M. (1991b) The complete amino acid sequence of the hemorrhagic factor II a metalloproteinase isolated from the venom of the bushmaster snake (*Lachesis muta muta*). *FEBS Lett.* **282**, 178-182.
- SANCHEZ, E. F.; FREITAS, T. V.; FERREIRA-ALVES, D. L.; VELARDE; D. T.; DINIZ, M. R.; CORDEIRO, M.; AGOSTINI-COTTA, G & DINIZ; C.R. (1992) Biological activities of venoms from South American Snakes. *Toxicon* **30**, 95-102.
- SANCHEZ, E. F.; OLIVEIRA, C.M.; JULIANO, L.; PRADO, E.S & DINIZ, C. R. (1995a) Proteolytic specificity of two hemorrhagic factors LHF-I and LHF-II, isolated from the venom of the bushmaster snake (*Lachesis muta muta*). *Toxicon* **33**, 1061-1069.
- SANCHEZ, E. F.; COSTA, M. I. E.; CHAVEZ-OLORTEGUI, C.; ASSAKURA, M. T.; MANDELBAUM, F. R & DINIZ, C. R. (1995b) Characterization of a hemorrhagic factor, LHF-I, isolated from the bushmaster snake (*Lachesis muta muta*) venom. *Toxicon* **33**, 1653-1667.

- SANCHEZ, E. F.; BUSH, L. A. & MARKLAND, F. S. (1997) Chimeric hybrid of fibrolase: a potentially more effective thrombolytic agent. Submetido à publicação.
- SANCHEZ, E. F. (1997) Mutalysins: the metalloproteinases isolated from bushmaster snake venom. *In: Handbook of Proteolytic Enzymes*. (Barret, A. J.; Woessner, F.; Rawlings, N.; N. eds.) Academic Press, London. No prelo.
- SCARBOROUGH, R. M.; ROSE, J. W.; HSU, M. A.; PHILLIPS, D. R.; FRIED, V. A.; CAMPBELL, A. M; NANNIZZI, L.; & CHARO, I. F. (1991) A GPIIb-IIIa-specific integrin antagonist from the venom of *Sistrurus m. barbouri*. *J. Biol. Chem.* **266**, 9359-9362.
- SCARBOROUGH, R. M.; ROSE, J. W.; NAUGHTON, M. A.; PHILLIPS, D. R.; NANNIZZI, L.; ARFSTEN, A.; CAMPBELL, A. M & CHARO, I. F. (1993a) Characterization of the integrin specificities of disintegrins isolated from american pit vipers venoms. *J. Biol. Chem.* **268**, 1058-1065.
- SCARBOROUGH, R. M.; NAUGHTON, M. A.; TENG, W.; PHILLIPS, D. R.; ROSE, J. W.; NANNIZZI, L.; ARFSTEN, A.; CAMPBELL, A. M & CHARO, I. F. (1993b) Design of potent and specific integrin antagonists-peptide antagonists with high specificity for glycoprotein IIb-IIIa . *J.Biol. Chem.* **268**, 1066-1073.
- SEEGERS, W. H. & OUYANG, C. (1979) Snake venoms and blood coagulation. *Handbook Exp. Pharm.* **52**,684-750.
- SHAINOFF, J. R. & WELCHES, W. R. (1988) Studies of the preferential release of fibrinopeptide B by copperhead procoagulant enzyme. *In: Haemostasis and animal venoms*. (Pirkle, H.; Markland, F. S., eds.). New York: Marcel Dekker.
- SHANNON, J.D.; BARAMOVA, E.N. ; BJARNASON, J.B. & FOX, J. W. (1989) Amino Acid sequence of a *Crotalus atrox* venom metalloproteinase which cleaves type IV collagen and gelatin. *J. Biol. Chem.* **264**, 11575 - 11583,
- SILVA, L. M.; DINIZ, C. R. & MAGALHÃES, A. (1985) Purification and partial characterization of an arginine ester hydrolase from the venom of the bushmaster snake, *Lachesis muta noctivaga*. *Toxicon* **23**,707-718.

- SILVEIRA, A. M. V.; MAGALHÃES, A.; DINIZ, C. R & DE OLIVEIRA, E. B. (1989) Purification and properties of the thrombin-like enzyme from the venom of *Lachesis muta muta*. *Int. J. Biochem.* **21**, 863-871.
- SMITH, J. B. & DANGELMAIER (1990) Determination of platelet adhesion to collagen and the associated formation of phosphatidic acid and calcium mobilization. *Analytical Biochemistry* **187**, 173-178.
- SMITH, J. B.; DANGELMAIER, C. & SELAK, M. (1991) Identification of 50 kDa snake proteins which specifically inhibit platelet adhesion to collagen. *FEBS Lett.* **283**, 307-310.
- SOLORZANO, A. & CERDAS, L. (1986) A new subspecies of the bushmaster *Lachesis muta* from Southeastern Costa Rica. *J. Herpet.* **6**, 463 - 466.
- STOCKER, K. F. & MEIER, J. (1988) Thrombin-like snake venom enzymes. *In: Haemostasis and animal venoms*. (Pirkle, H.; Markland, F. S., eds.). New York.
- STOCKER, K. (1990) Snake venom proteins affecting hemostasis and fibrinolysis *In: Medical Use of Snake Venoms Proteins*. Kurt F. Stocker (Ed.), p. 97-160. CRC Press, Inc., Boca Raton. ISBN 0-8493-5846-9
- STOCKER, W.; GRAMS, F.; BAUMANN, U.; REINEMER, P.; GOMIS-RUTH, F.; MCKAY, D. & BODE, W. (1995) The metzincins-topological and sequential relations between the astacins, adamalysins, serralysins, and matrixins (collagenases) define a superfamily of zinc-peptidases. *Protein Sci.* **4**, 823-840.
- SUGIHARA, H.; MORIURA, M. & NIKAI, T. (1983) Purification and properties of a lethal hemorrhagic protein, mucrotosim from the venom of the chinese habu snake *Trimeresurus mucrosquamatus*. *Toxicon* **21**, 247-255.
- TAKEYA, H.; ARAKAWA, M.; MIYATA, T.; IWANAGA, S. & OMORI-SATOH, T. (1989) Primary structure of H<sub>2</sub>-Proteinase, a non-hemorrhagic metalloproteinase, isolated from the venom of the habu snake, *Trimeresurus flavoviridis*. *J. Biochem.* **106**, 151-157.

- TAKEYA, H.; ODA, K.; MIYTA, T.; OMORI-SATOH, T. & IWANAGA, S. (1990) The complete amino acid sequence of the high molecular mass hemorrhagic protein HR1B isolated from the venom of *Trimeresurus flavoviridis*. *J. Biol. Chem.* **265**, 16068-16073.
- TAKEYA, H.; NISHIDA, S.; MIYATA, T.; KAWADA, S. I.; SAISAKA, Y.; MORITA, T. & IWANAGA, S. (1992) Coagulation factor X activating enzyme from Russell's viper venom (RVV-X). *J. Biol. Chem.* **267**, 14109-14417.
- TAKEYA, H.; NISHIDA, S.; NISHINO, N.; MAKINOSE, Y.; OMORI-SATOH, T.; NIKAI, T.; SUGIHARA, H & IWANAGA, S. (1993) Primary structures of aggregation inhibitors (disintegrins) autoproteolytically released from snake venom hemorrhagic metal proteinases and new fluorogenic peptide substrates for these enzymes. *J. Biochem.* **113**, 473-483.
- TENG, C. & HUANG, T. (1991) Snake venom constituents that affect platelet function. *Platelets* **2**, 77-87.
- THEAKSTON, R. D. G., & REID, H. A. (1983) Development of simple standard assay procedures for the characterization of snake venoms. *Bull. WHO* **61**, 949 - 956.
- THRIKA, M., ROTE, W. E., MANLEY, P. J., LUCCHESI, B. R & MARKLAND, F. S. (1994) Purification and characterization of platelet aggregation inhibitors from snake venoms. *Thromb. Res.* **73**, 39-52.
- TSAI, I.; WANG, Y & LEE, Y. (1994) Characterization of a cDNA encoding the precursor of platelet aggregation inhibitor and metalloproteinase from *Trimeresurus mucrosquamatus* venom. *Biochem. Biophys. Acta* **1200**, 337-340.
- TU, A. (1988) Hemorrhagic proteases from snake venom. *In: Hemostasis and Animal Venoms* (Pirkle, H. & Markland, F. S. Eds) pp 425-443. New York.
- TU, A. (1991) Reptile venoms and toxins-tissue damaging effects by snake venom. *In: Handbook of Natural Toxins* **5** (Tu, A. T. Eds). Marcel Dekker, Inc., New York.
- USAMI, Y.; FUJIMURA, Y.; MIURA, S.; SHIMA, H.; YOSHIDA, E.; YOSHIOKA, A.; HIRANO, K.; SUZUKI, M & TITANI, K. (1994) A 28 kDa-protein with disintegrin-like

structure (jararhagin-C) purified from *Bothrops jararaca* venom inhibits collagen- and ADP-induced platelet aggregation. *Bioch. Biophys. Res. Commun.* **201**, 331-339.

VELLARD, J. (1948) El veneno de *Lachesis muta*. *Publicaciones del museo de Historia Natural Javier Prado*. Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Perú, pp 1-49.

WESCAMP, G. & BLOBEL, C. P. (1994) A family of cellular proteins related to snake venom disintegrins. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* **91**, 2748-2751.

WILLIAMS, J. A. (1992) Disintegrins: RGD-containing proteins which inhibit cell/matrix interactions (adhesion) and cell/cell interactions (aggregation) via the integrin receptors. *Path. Biol.* **40**, 813-821.

WILLIS, T. W & TU, A. T. (1988) Purification and biochemical characterization of atroxase, a nonhemorrhagic fibrinolytic protease from western diamondback rattlesnake venom. *Biochemistry* **27**, 4769-4777.

WOLFSBERG, T. G.; BAZAN, J. F.; BLOBEL, C. P.; MYLES, D. G.; PRIMAKOFF, P & WHITE, J. M. (1993) The precursor region of a protein active in sperm-egg fusion contains a metalloprotease and a disintegrin domain: structural, functional, and evolutionary implications. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* **90**, 10783-10787.

WOLFSBERG, T. G.; STRAIGHT, P. D.; ROBYN, L. G.; HUOVILA, A. J.; PRIMAKOFF, P.; MYLES, D. G & WHITE, J. M. (1995) ADAM, a widely distributed and developmentally regulated gene family encoding membrane proteins with a disintegrin and metalloprotease domain. *Developmental Biology* **169**, 378-383.

WOLFSBERG, T. G. & WHITE, J. M. (1996) ADAMs in fertilization and development. *Dev. Biol.* **180**, 389-401.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (1981) Progress in the characterization of venoms and standardization of antivenoms. *WHO offset publication* **58**. Geneva: World Health Organization.

- YAGIHASHI, S; NIAKI, T.; MORI, N.; KISHIDA, M. & SUGIHARA, H. (1986) Characterization of Ac3-proteinase from the venom of *Agkistrodon acutus* (hundred-pace snake). *Int. J. Biochem.* **18**, 885-892.
- YARLEQUE, A.; CAMPOS, S.; ESCOBAR, E.; LAZO, F.; SANCHEZ, N.; HYSLOP, S.; MARSH, N. A.; BUTTERWORTH, P. J & PRICE, R. G. (1989) Isolation and characterization of a fibrinogen-clotting enzyme from venom of the snake, *Lachesis muta muta* (Peruvian bushmaster). *Toxicon* **27**, 1189-1197.
- ZAVALETA, M. V. A.; SALAS, A.M.; VILLEGAS, L.F & CASTILLO YUI, J. (1989) Estudio farmacologico del veneno de *Lachesis muta muta* (shushupe). *In: Concytec-Premios*. (Castro de la Mata, R. Ed.) pp 77-94. Lima, Megaprint Ediciones.
- ZBIKOWSKA, H. & KRAJEWSKI, T. (1991) Vertebrate plasminogen. *Folia Biochimica et Biophysica in Acta Universitatis Lodziensis* **8**, 39-45.
- ZHANG, D.; BOTOS, I.; GOMIS-RUTH, F. X.; DOLL, R.; BLOOD, C.; NJOROGI, F. G.; FOX, J. W.; BODE, W & MEYER, E. F. (1994) Structural interaction of natural and synthetic inhibitors with the venom metalloproteinase, atrolysin C (form d). *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* **91**, 8447-8451.
- ZHANG, Y.; WISNER, A.; XIONG, Y. & BON, C. (1995) A novel plasminogen activator from snake venom. *J. Biol. Chem.* **270**, 10246-10255.
- ZHOU, Q.; SMITH, J. B. & GROSSMAN, M. H. (1995) Molecular cloning and expression of catrocollastatin, a snake-venom protein from *Crotalus atrox* (western diamondback rattlesnake) which inhibits platelet adhesion to collagen. *Biochemistry* **307**, 411-417.