

## PURIFICAÇÃO DE UMA ENZIMA FIBRINOGENOLÍTICA DA PEÇONHA DA SERPENTE *Bothrops alternatus*

### PURIFICATION OF A FIBRINOGENOLYTIC ENZYME FROM THE VENOM OF *Bothrops alternatus*

Júnia de Oliveira COSTA<sup>1</sup>; Cristiani BALDO<sup>2</sup>; Amélia HAMAGUCHI<sup>3</sup>; Maria Inês Homsy BRANDEBURGO<sup>3</sup>; Fábio de OLIVEIRA<sup>4</sup>

**RESUMO:** Este trabalho descreve a purificação de uma enzima fibrinogenolítica da peçonha de *Bothrops alternatus*. A enzima, denominada BaltF, foi purificada utilizando um simples passo de cromatografia em coluna de DEAE Sephacel. A análise por eletroforese em gel de poli(acrilamida) com agentes desnaturantes (SDS-PAGE) mostra que essa enzima apresenta uma banda homogênea com massa molecular aparente de 25 kDa. A enzima BaltF representa cerca de 2,2 % da peçonha total e apresenta-se com um alto grau de pureza. A enzima é desprovida de atividades hemorrágica, fosfolipásica A2 e coagulante e possui atividade proteolítica sobre as cadeias A- $\alpha$  e B- $\beta$  do fibrinogênio bovino. A inibição da atividade fibrinogenolítica da enzima BaltF por agentes quelantes de íons metálicos como EDTA e 1,10-fenantrolina permite classificá-la como metaloprotease.

**UNITERMOS:** *Bothrops alternatus*, Metaloprotease, Fibrinogenase.

### INTRODUÇÃO

As serpentes *Bothrops alternatus* são conhecidas popularmente, no Brasil, como “urutu”, “urutu-cruzeiro” ou “cruzeira”, são consideradas monotípicas e de ampla dispersão, com grande distribuição na América do Sul. São terrestres, utilizam microambientes diversificados e ocupam diversas comunidades vegetais, mostrando uma grande capacidade de adaptação, ocupando vários biomas, o que justifica sua ampla distribuição (MESQUITA, 1997). Possuem atividade predominantemente noturna, embora possam apresentar atividades durante todos os horários do dia.

Os acidentes provocados por essas serpentes caracterizam-se por efeitos locais e sistêmicos. Os efeitos sistêmicos mais comuns são a indução do estado de choque, principal causa de morte, distúrbios na coagulação sangüínea, alterações cardiovasculares, hemorragias gastrointestinais, náuseas, vômitos e hematúria (MEBS; OWNBY, 1990).

Quanto aos efeitos locais destacam-se dor, edema, hemorragia local e necrose tecidual, que dependendo do local afetado, tempo decorrido entre o acidente e aplicação do soro e quantidade de peçonha injetada, podem levar à perda do tecido e amputação do membro afetado (OLIVEIRA, 1999).

A complexa lesão causada por essa peçonha se deve à somatória dos efeitos isolados dos diferentes componentes, com ações biológicas distintas ou com ação sinérgica. Os principais constituintes das peçonhas relacionados com os efeitos locais são as proteases, fosfolipases e miotoxinas.

Neste trabalho descrevemos a purificação de uma enzima fibrinogenolítica presente na peçonha de *Bothrops alternatus*.

### MATERIAL E MÉTODOS

A peçonha bruta de *B. alternatus* foi gentilmente

<sup>1</sup> Graduanda do Curso de Ciências Biológicas, Bolsista PIBIC/CNPq/UFU, Instituto de Genética e Bioquímica, Universidade Federal de Uberlândia

<sup>2</sup> Mestranda, Programa de Pós-Graduação, Instituto de Genética e Bioquímica, Universidade Federal de Uberlândia

<sup>3</sup> Professora, Doutora, Instituto de Genética e Bioquímica, Universidade Federal de Uberlândia

<sup>4</sup> Professor, Doutor, Departamento de Ciências Fisiológicas, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal de Uberlândia

Received: 14/08/02

Accept: 12/11/02

doada pela Prof<sup>a</sup>. Dra. Vera Lúcia de Campos Brites, do Instituto de Biologia da Universidade Federal de Uberlândia (INBIO - UFU).

A peçonha foi dessecada a vácuo e armazenada a -20 °C até o momento do uso. A resina DEAE Sephacel e os reagentes: acrilamida, bis-acrilamida, fenilmetilsulfonil fluoreto (PMSF), N, N, N', N' - tetrametiletileno-diamino (TEMED), dodecil sulfato de sódio (SDS), azul brilhante de coomassie, ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), soroalbumina bovina, azul de bromofenol, β-mercaptoetanol, persulfato de amônio e os padrões para determinação das massas moleculares: fosforilase b (97.000), albumina bovina (66.000), ovoalbumina (45.000), anidrase carbônica bovina (30.000), inibidor de tripsina (20.100), α-lactoalbumina (14.400), foram adquiridos da Amersham Pharmacia Biotech. Os demais reagentes utilizados eram de grau analítico.

Cerca de 200 mg da peçonha bruta dessecada de *Bothrops alternatus* foram dissolvidos em 2,0 ml de tampão bicarbonato de amônio 0,05 M pH 7,8, centrifugados a 10.000 x g por 10 min em temperatura ambiente e aplicados a uma coluna de DEAE Sephacel (1,5 X 15 cm). As amostras foram eluídas com um gradiente convexo de concentração de bicarbonato de amônio (0,05 - 1,0 M) pH 7,8, utilizando uma câmara de mistura com um volume de 150 ml. As frações, contendo 3,0 ml cada, foram coletadas num fluxo de 20 ml/hora, por um coletor de frações Gilson. A absorbância de cada fração foi acompanhada em 280 nm, num espectrofotômetro Spekol UV/VIS (Zeiss).

As dosagens protéicas, em solução contendo 0,1 a 2,0 mg de proteínas, foram realizadas pelo método do microbiureto, conforme descrito por Itzhaki; Gill (1964). A curva padrão foi construída utilizando-se soroalbumina bovina.

A determinação da massa molecular aparente das amostras foi realizada por eletroforese em gel de poliacrilamida a 14%, com agentes desnaturantes, conforme a técnica descrita por Laemmli (1970). Foi utilizado um gel de empilhamento a 5 % em pH 6,8 contendo 0,125 M de Tris-HCl e 0,1 % de SDS e um gel de separação a 14 % em pH 8,8 e 0,1 % de SDS, mantendo a relação acrilamida:bis-acrilamida de 30:0,8 (m/m).

A atividade fibrinogenolítica foi realizada segundo Oliveira et al. (1999). Em 50 µl de uma solução de fibrinogênio bovino (1,5 mg/ml salina) foram adicionados

5 µg da enzima BaltF e a solução incubada por até 60 minutos a 37 °C. A amostra foi dissolvida em 25 µl de tampão Tris HCl 0,06 M, pH 6,8, contendo glicerol a 10 % (v/v), β-mercaptoetanol a 10 % (v/v), SDS a 2 % (m/v) e azul de bromofenol a 0,05 %. Em seguida as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida a 14% com SDS como agente desnaturante.

A influência de agentes inibidores de proteases foi verificada quando a enzima BaltF foi pré-incubada por 30 minutos com EDTA 10 mM, 1,10 fenantrolina 10 mM, PMSF 10 mM, aprotinina 10 mM e β-mercaptoetanol 10 mM.

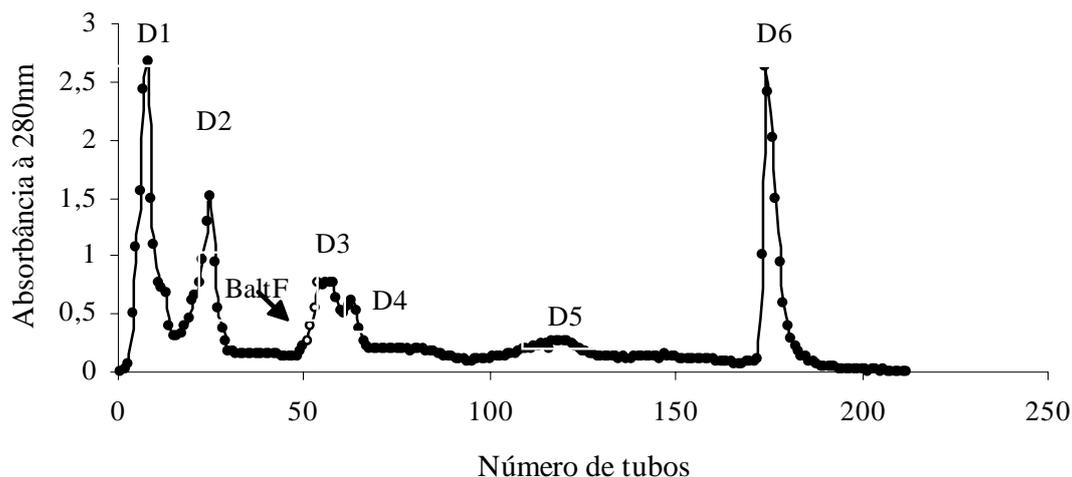
Cerca de 5 µg da enzima BaltF dissolvidos em um volume final de 50 µL de salina, foram pré-incubados por 30 minutos em diferentes pHs (3, 4, 5, 6, 7, 9, 10 e 11) e temperatura ambiente ou em diferentes temperaturas (30, 40, 50, 60, 70 e 80 °C) por 15 minutos e em pH 8. Em seguida as amostras foram colocadas em banho de gelo e a atividade fibrinogenolítica foi determinada como descrito acima.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

O fracionamento da peçonha bruta de *Bothrops alternatus* foi realizado em gel de DEAE Sephacel num gradiente convexo de concentração em tampão bicarbonato de amônio 0,05 M a 1,0 M em pH 7,8. O perfil cromatográfico está mostrado na Figura 1. A peçonha total foi resolvida em seis frações principais designadas de D1 a D6. Todas essas frações foram capazes de hidrolisar o fibrinogênio bovino (atividade fibrinogenolítica), em maior ou menor intensidade, com a fração D3 apresentando a maior atividade dentre todas as frações.

A análise por eletroforese em gel de poliacrilamida com agentes desnaturantes (SDS-PAGE) da fração D3 (tubo a tubo) mostrou que os tubos 51 a 54 eram constituídos por banda única (resultado não mostrado). Esse material, denominado de BaltF (Fibrinogenase de *Bothrops alternatus*), foi reunido, liofilizado e armazenado a -20 °C. A recuperação protéica para a BaltF mostrou que essa enzima representa cerca de 2,2 % da peçonha bruta de *Bothrops alternatus*.

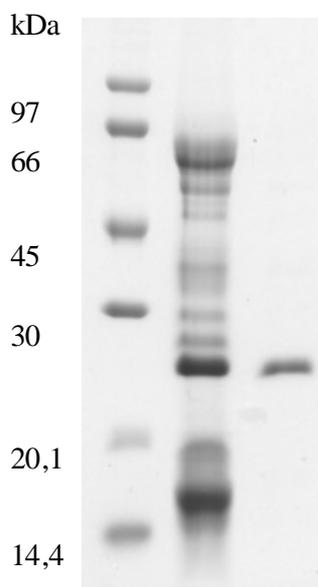
A enzima BaltF apresentou elevada atividade fibrinogenolítica, mas não apresentou nenhuma atividade coagulante, fosfolipásica A2 ou hemorrágica com até 50 µg de proteína.



**Figura 1.** Fracionamento de 200 mg da peçonha bruta de *Bothrops alternatus* em coluna de DEAE Sephacel (1,5 X 15 cm), equilibrada com tampão bicarbonato de amônio 0,05M, pH 7,8. As amostras foram eluídas num gradiente convexo de concentração (0,05 – 1,0 M) do mesmo tampão, num fluxo de 20 ml/h à temperatura ambiente e frações de 3 ml foram coletadas. O gradiente de concentração foi estabelecido a partir do início da cromatografia.

Quando analisada em SDS-PAGE a 14 %, a enzima BaltF apresentou cadeia única e massa molecular aparente de 25 kDa, na presença do agente redutor  $\beta$ -mercaptoetanol (Figura 2) e 22 kDa na ausência desse agente redutor (resultado não mostrado). Essa diferença pode ser explicada pelo fato de a migração da molécula

na eletroforese ser dependente do seu tamanho molecular. Considerando que na presença de  $\beta$ -mercaptoetanol a proteína sofre uma desnaturação mais efetiva devido ao rompimento das pontes dissulfetos, ela poderá aumentar o seu tamanho aparente e diminuir sua migração em relação à proteína sem  $\beta$ -mercaptoetanol.



**Figura 2.** Eletroforese em gel de poliacrilamida a 14 % com agentes desnaturantes para a estimativa da massa molecular da enzima BaltF.

**Linha 1-** Padrão de massa molecular: fosforilase b (97.000), albumina bovina (66.000), ovoalbumina (45.000), anidrase carbônica (30.000), inibidor de tripsina (20.100) e  $\alpha$ -lactoalbumina (14.400); **2** - peçonha bruta de *Bothrops alternatus*; **3** - enzima BaltF.

Estudos de estabilidade enzimática mostraram que a enzima BaltF apresenta atividade máxima numa larga faixa de pH alcalino (Figura 3A), mas não é ativa em elevadas temperaturas. Quando aquecida acima de 60 °C, durante 15 minutos, a enzima perde completamente sua atividade fibrinogenolítica (resultado não mostrado).

Quanto à estabilidade enzimática, a enzima BaltF apresenta um comportamento semelhante a várias outras proteases de peçonha de serpentes já purificadas e descritas na literatura (KOSUKI et al., 1986; SELISTRE; GÍGLIO, 1987; SHIEH et al., 1985).

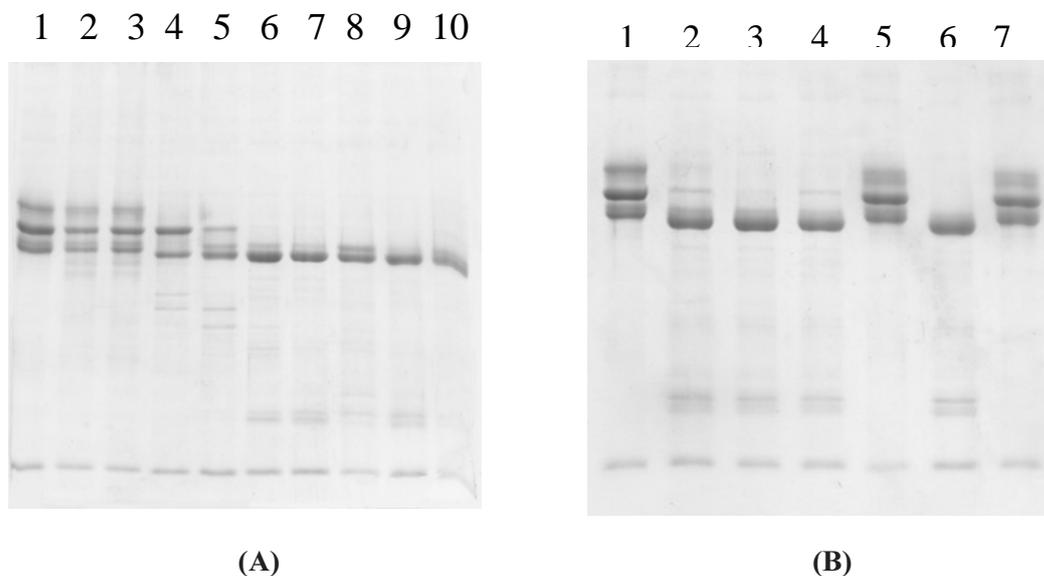
Os testes de degradação das cadeias do fibrinogênio bovino mostraram que a enzima BaltF degrada a cadeia A- $\alpha$  mais rapidamente que a cadeia B- $\beta$ , enquanto que a cadeia  $\gamma$  permanece inalterada, mesmo depois de 60 minutos. Esse mecanismo de hidrólise é comum para a maioria das fibrinogenases isoladas de peçonhas de serpentes (OLIVEIRA et al., 1999; XIUXIA et al., 2001).

As enzimas fibrinogenolíticas, encontradas nas peçonhas de serpentes, podem ser classificadas em três grupos, dependendo da especificidade de hidrólise das

cadeias do fibrinogênio. O primeiro grupo são aquelas com preferência de hidrólise pela cadeia A- $\alpha$  (ESTÊVÃO-COSTA et al., 2000; LEONARDI et al., 2002), o segundo pela cadeia B- $\beta$  (GUO et al., 2001; SAMEL et al., 2002) e o terceiro pela cadeia  $\gamma$  do fibrinogênio (NIKAI et al., 1984). Nossos resultados sugerem que a BaltF pertence à classe  $\alpha$ -fibrinogenases.

Muitas das enzimas fibrinogenolíticas de peçonha foram caracterizadas como metaloproteases dependentes de zinco. Membros desta família são assim chamados em virtude de apresentarem átomo de zinco em suas moléculas, o qual é essencial para sua ação catalítica (STOCKER et al., 1995).

Dentre os inibidores de proteases testados para a enzima BaltF (Figura 3B), a 1,10-fenantrolina e o EDTA foram capazes de inibir completamente a atividade dessa enzima. Os demais inibidores ( $\beta$ -mercaptoetanol, PMSF e aprotinina) não apresentaram efeito sobre esta atividade. Esses resultados são concordantes com a literatura e sugerem que a BaltF pertence à família das metaloproteases. (OWNBY et al., 1994).



**Figura 3.** Eletroforese em gel de poliacrilamida a 14 % com agentes desnaturantes. **(A)** Produtos de digestão do fibrinogênio bovino pela enzima BaltF pré-incubada em vários pHs. Linha 1- fibrinogênio bovino controle, sem BaltF; linhas 2 a 10- fibrinogênio acrescido de BaltF pré-incubada em pHs 3 a 11, respectivamente. **(B)** Produtos de digestão do fibrinogênio bovino pela enzima BaltF pré-incubada com inibidores de proteases. Linha 1- fibrinogênio bovino controle, sem BaltF; linha 2- fibrinogênio incubado com BaltF por 60 minutos em pH 8,0; linhas 3 a 7- fibrinogênio incubado com a BaltF pré-tratada com PMSF 10 mM, aprotinina 10 mM, EDTA 10 mM,  $\beta$ -mercaptoetanol 10 mM e 1,10 fenantrolina 10 mM, respectivamente. Para cada ensaio, 5  $\mu$ g da enzima BaltF foram pré-incubados por 30 minutos em cada pH, ou com inibidores de proteases, como indicado acima, e depois adicionados à solução de fibrinogênio e deixados reagir em pH 8,0 durante 60 minutos.

Bjarnason e Fox (1994) dividiram as metaloproteases em três classes de acordo com suas massas moleculares. A classe P-I corresponde a toxinas pequenas com atividade hemorrágica relativamente fraca e com massas moleculares de 20 - 30 kDa. Essas enzimas possuem três domínios estruturais: pré e pró-domínio, além do domínio protease ligante de zinco. Na classe P-II estão as toxinas de tamanho médio com massas moleculares de 30 - 60 kDa e na classe P-III as toxinas são altamente hemorrágicas com massas moleculares de 60 - 100 kDa.

Com base na sua massa molecular, a enzima BaltF poderia ser incluída na classe P-I das metaloproteases, possuindo apenas o domínio protease na proteína madura. Dentro da classe P-I, essas enzimas pertenceriam ao subgrupo P-IB, junto com as metaloproteases Htc e Ht-d de *Crotalus atrox* (BJARNASON; FOX, 1994), protease A de *Bothrops moojeni* (ASSAKURA et al., 1985), LHF-II de *Lachesis muta* (SANCHES et al., 1991) e BaPI de *B. asper* (GUTIÉRREZ et al., 1995). Todas essas enzimas possuem somente o domínio protease e exercem fraca atividade hemorrágica.

As enzimas fibrinogenolíticas de peçonhas de serpentes, têm sido muito usadas para o tratamento e prevenção de disfunções cardiovasculares. Essas enzimas levam à rápida diminuição do fibrinogênio *in vivo*, causando um efeito anticoagulante e a diminuição da viscosidade do sangue. Vários estudos revelaram que essas enzimas induzem trombólise de forma consistente, eficaz e segura (GASMI *et al.*, 1997; WILLIS; TU, 1989).

Estudos adicionais serão necessários para melhor caracterizar a enzima BaltF e verificar sua possível aplicação terapêutica em doenças cardiovasculares.

## CONCLUSÕES

Os procedimentos cromatográficos utilizados neste trabalho permitiram purificar uma enzima fibrinogenolítica presente na peçonha de *Bothrops alternatus*. A enzima, denominada BaltF, é uma metaloprotease de cadeia simples e apresenta massa molecular aparente de 25 kDa. A enzima foi caracterizada como uma  $\alpha$ -fibrinogenase.

---

**ABSTRACT:** This work describes the purification of a fibrinogenolytic enzyme from the venom of *Bothrops alternatus*. The enzyme, termed BaltF, was purified using a single step chromatography on DEAE Sephacel. BaltF was shown to be homogeneous with molecular mass of about 25 kDa as demonstrated by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. BaltF represents about 2.2 % of the total venom protein and was purified to a high degree of purity. The enzyme is devoid of hemorrhagic, phospholipase A2 and blood-clotting activities and shows a high proteolytic activity towards A- $\alpha$  and B- $\beta$  chains of bovine fibrinogen. The inhibition of the fibrinogenolytic activity of BaltF by chelant compounds such as EDTA and 1,10-phenantrolin supports its classification as a metalloproteinase.

**UNITERMS:** *Bothrops alternatus*, Metalloproteinase, Fibrinogenase.

---

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASSAKURA, M. T.; REICHL, A. P.; ASPERTI, M. C. A.; MANDELBAUM, F. R. Isolation of the major proteolytic enzyme from the venom of the snake *Bothrops moojeni* (Caissaca). **Toxicon**, Oxford, v. 23, n. 4, p. 691-706, 1985.

BJARNASON, K. B.; FOX, J. W. Hemorrhagic metalloproteinases from snake venoms. **Pharmac. Ther.**, Oxford, v. 62, n. 3, p. 325-372, 1994.

ESTÊVÃO-COSTA, M. I.; DINIZ, C. R.; MAGALHÃES, A.; MARKLAND, F. S.; SANCHEZ, E. F. Action of metalloproteinases mutalysin I and II on several components of the hemostatic and fibrinolytic systems. **Thromb Res.**, Elmsford, v. 99, n. 4, p. 363-376, 2000.

GASMI, A.; CHABCHOUB, A.; GUERMAZI, S.; KAROUI, H.; ELAYEB, M.; DELLAGI, K. Further characterization and thrombolytic activity in a rat model of a fibrinogenase from *Vipera lebetina* venom. **Thromb. Res.**, Elmsford, v. 86, n. 3, p. 233-242, 1997.

GUO, Y. W.; CHANG, T. Y.; LIN, K. T.; LIU, H. W.; SHIH, K. C.; CHENG, S. H. Cloning and functional expression of the mucrosobin protein, a beta-fibrinogenase of *Trimeresurus mucrosquamatus* (Taiwan Habu). **Protein Expr. Purif.**, Duluth, v. 23, n. 3, p. 483-90, 2001.

GUTIÉRREZ, J. M.; ROMERO, M.; DIAZ, C.; BORKOW, G.; OVADIA, M. Isolation and characterization of a metalloproteinase with hemorrhagic activity from the venom of the snake *Bothrops asper* (Terciopelo). **Toxicon**, Oxford, v. 33, n. 1, p. 19-29, 1995.

ITZHAKI, R. F.; GILL, D. M. A micro- biuret method for estimating proteins. **Anal. Biochem.**, New York, v. 9, p. 401-410, 1964.

KOSUKI, T.; ARIGA, Y.; NAKAMURA, M.; KINJO, K. Purification and some chemical properties of thrombin-like enzyme from *Trimeresurus flavoviridis* venom. **Thromb Haemost.**, Stuttgart, v. 55, n. 1, p. 24-30, 1986.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage t4. **Nature**, London, v. 227, n. 259, p. 680-689, 1970

LEONARDI, A.; GUBENSEK, F.; KRIZAJ, I. Purification and characterisation of two hemorrhagic metalloproteinases from the venom of the long-nosed viper, *Vipera ammodytes ammodytes* **Toxicon**, Oxford, v. 40, n. 1, p.55-62, 2002.

MEBS, D.; OWNBY, C. L. Myotoxic components of snake venoms: their biochemical and biological activities. **Pharm. Ther.**, Oxford, v. 48, n. 2, p. 223-236, 1990.

MESQUITA, D. O. **Biometria, folidose e ecologia da população de *Bothrops alternatus* Duméril, Bibron e Duméril, 1854 (Serpentes: Crotalinae) da zona geográfica do Triângulo Mineiro e Alto Paranaíba - MG.** 1997. 49 f. Monografia (Ciências Biológicas) - Curso de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia.

NIKAI, T.; MORI, N.; KISHIDA, M.; *et al.* Isolation and biochemical characterization of hemorrhagic toxin from the venom of *Crotalus atrox*. **Arch. Biochem. Biophys**, New York, v. 231, n. 3, p. 309-311, 1984.

OLIVEIRA, R. B. **Fatores epidemiológicos e clínicos associados à incoagulabilidade sanguínea no envenenamento por serpentes do gênero *Bothrops*.** 1999. 95 f. Dissertação (Mestrado em Clínica Médica) - Curso de Pós-Graduação em Clínica Médica, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia.

OLIVEIRA, F.; RODRIGUES, M. V.; BORGES, M. H.; SOARES, A. M.; HAMAGUCHI, A.; GIGLIO, J. R., HOMSI-BRANDEBURGO M. I. Purification and Partial Characterization of a New Proteolytic Enzyme from the Venom *Bothrops moojeni* (Caissaca). **Biochem. Mol. Biol. Int.**, Sydney, v. 47, n. 6, p 1069-1077, 1999.

OWNBY, C. L.; TERRY, R. C.; QUANZHI, L. Presence of heat-stable hemorrhagic toxins in snake venoms. **Toxicon**, Oxford, v. 32, n. 8, p. 945-954, 1994.

SAMEL, M.; SUBBI, J.; SIIGUR, J.; SIIGUR, E. Biochemical characterization of fibrinogenolytic serine proteinases from *Vipera lebetina* snake venom. **Toxicon**, Oxford, v. 40, n. 1, p. 51-54, 2002.

SANCHEZ, E. F.; DINIZ, C. R.; RICHARDSON, M. The complete amino acid sequence of the haemorrhagic factor LHFII, A metalloproteinase isolated from the venom of the bushmaster snake (*Lachesis muta muta*) **FEBS Lett**, Amsterdam, v. 282, n. 1, p. 178, 1991.

SELISTRE, H. S.; GIGLIO, J. R. Isolation and characterization of the thrombin-like enzyme from the venom of the

snake *Bothrops insularis* (jararaca ilhoa). **Toxicon**, Oxford, v. 25, n. 11, p. 1135-1144, 1987.

SHIEH, T. C.; TANAKA, S.; KIHARA, H.; OHNO, M.; MAKISUMI, S. Purification and characterization of a coagulant enzyme from *Trimeresurus flavoviridis* venom. **J Biochem**, Tokyo, v. 98, n. 3, p. 713-721, 1985.

STOCKER, W.; GRAMS, F.; BAUMANN, U.; REINEMER, P.; GOMIS-RUTH, F.-X.; MCKAY, D. B.; BODE, W. The metzincins-topological and sequential relations between the astacins, adamalysins, serralysins, and matrixins (coltagenases) define a superfamily of zinc-peptidases. **Protein Sci.**, v. 4, n. 5, p. 823-840, 1995.

XIUXIA, L.; JIASHU, C.; YINGNA, Z.; PENGXIN, Q.; GUANGMEI, Y. Purification and biochemical characterization of F II(a), a fibrinolytic enzyme from *Agkistrodon acutus* venom. **Toxicon**, Oxford, v. 39, n. 8, p. 1133-1139, 2001.

WILLIS, T. W.; TU, A. T. Purification and biochemical characterization of atroxase, a nonhemorrhagic fibrinolytic protease from western diamondback rattlesnake venom. **Biochemistry**, Whashington, v. 27, n. 13, p. 4769-4777, 1989.