

Carolina Okamoto Vieira

Purificação e Caracterização Bioquímica e  
Funcional do Fibrinogênio do Plasma da Serpente

*Bothrops jararaca* (Wied, 1824) (Ophidia:

Viperidae, Crotalinae)

São Paulo

2009

Carolina Okamoto Vieira

Purificação e Caracterização Bioquímica e  
Funcional do Fibrinogênio do Plasma da Serpente  
*Bothrops jararaca* (Wied, 1824) (Ophidia:  
Viperidae, Crotalinae)

Dissertação apresentada ao Instituto de  
Biociências da Universidade de São  
Paulo, para a obtenção de Título de  
Mestre em Ciências, na Área de  
Fisiologia.

Orientadora: Ida S. Sano-Martins

São Paulo

2009

## Ficha Catalográfica

Vieira, Carolina Okamoto  
Purificação e Caracterização  
Bioquímica e Funcional do Fibrinogênio do  
Plasma da Serpente *Bothrops jararaca*  
(Wied, 1824) (Ophidia: Viperidae,  
Crotalinae)

Número de páginas: 60

Dissertação (Mestrado) - Instituto de  
Biociências da Universidade de São Paulo.  
Departamento de Fisiologia.

1. Fibrinogênio 2. Coagulação  
Sangüínea 3. Purificação I. Universidade  
de São Paulo. Instituto de Biociências.  
Departamento de Fisiologia.

### Comissão Julgadora:

---

Prof(a). Dr(a).

---

Prof(a). Dr(a).

---

Prof(a). Dr(a).

---

Prof(a). Dr(a).

---

Profa. Dra. Ida S. Sano-Martins  
Orientadora

Ao Eduardo, meu pequeno

## Quase

Para os erros, há perdão;  
para os fracassos, chance;  
para os amores impossíveis, tempo...

Não deixe que a saudade sufoque,  
que a rotina acomode,  
que o medo impeça de tentar.  
Desconfie do destino e  
acredite em você.

Gaste mais horas realizando que sonhando,  
fazendo que planejando,  
vivendo que esperando  
Porque, embora quem quase morre esteja vivo,  
quem quase vive já morreu.

Sarah Westphal Batista da Silva

## Agradecimentos

Agradecer pode não ser tarefa fácil, nem justa. Assim, para não correr o risco da injustiça, agradeço desde já a todos que de alguma forma passaram pela minha vida e contribuíram para a construção deste trabalho. Agradeço, particularmente, a algumas pessoas pela contribuição direta na construção deste trabalho:

À Dra. Ida S. Sano-Martins pela orientação, colaboração, sugestões, amizade e pelo incentivo que me deu durante todo o trabalho, além da orientação oficial.

À Dra. Anita M. Tanaka-Azevedo pela sua orientação.

Ao Dr. Marcelo L. Santoro e à Dra. Aparecida S. Tanaka pelas excelentes sugestões e também pela colaboração.

À Dra. Diva D. Spadacci-Morena pela revisão crítica deste trabalho e também por todo o seu carinho e atenção.

À Dra. Izaura Y. Hirata pelo seqüenciamento das regiões amino-terminais.

Às queridas Neucely, Iracema, Neusa, Alice, Terezinha e Ângela e também ao Nicolau e Juscelino, funcionários essenciais para o andamento do Laboratório de Fisiopatologia e para a realização dos meus experimentos.

À amiga Sueli Bertelli por seu carinho, amizade e muita força.

À Karen B. Morais pela sua contribuição.

Ao Alexandre L. Figueiredo Jr. pela coleta do sangue do coelho.

Ao Laboratório de Farmacologia por disponibilizar o sangue das serpentes utilizadas em seus experimentos.

Ao Laboratório de Herpetologia pelo fornecimento das serpentes e também dos venenos.

A todos do Laboratório de Fisiopatologia e também do Instituto Butantan que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

Ao Departamento de Fisiologia do Instituto de Biociências-USP.

Ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) e à FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo), pelo apoio financeiro.

Ao meu marido, Júlio, pelo amor, amizade, companheirismo e muita paciência.

Ao meu pequeno Edu que nos trouxe, e nos trará, tantas alegrias.

Enfim, a toda minha família que, com muito carinho e apoio, não mediu esforços para que eu chegasse até mais esta etapa da minha vida.

## ÍNDICE

<b>I. INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
<b>1.1. HEMOSTASIA</b>	<b>1</b>
<b>1.2. HEMOSTASIA COMPARADA</b>	<b>6</b>
<b>1.3. FIBRINOGÊNIO</b>	<b>7</b>
<b>1.4. SERPENTES</b>	<b>13</b>
1.4.1. <i>BOTHROPS JARARACA</i>	13
<b>1.5. VENENOS DE SERPENTES</b>	<b>15</b>
<b>II. OBJETIVOS</b>	<b>19</b>
<b>III. MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>20</b>
<b>3.1. MATERIAIS</b>	<b>20</b>
3.1.1. ANIMAIS	20
3.1.1.1. SERPENTES	20
3.1.1.2. COELHO	20
3.1.2. VENENOS DE SERPENTES	21
<b>3.2. MÉTODOS</b>	<b>21</b>
3.2.1. COLETA DE SANGUE	21
3.2.2. PURIFICAÇÃO DO FIBRINOGÊNIO	21
3.2.2.1. SEPARAÇÃO DO FIBRINOGÊNIO DAS PROTEÍNAS DEPENDENTES DE VITAMINA K	21
3.2.2.2. PRECIPITAÇÃO COM SULFATO DE AMÔNIO	22
3.2.2.3. CROMATOGRAFIA DE FILTRAÇÃO EM GEL	22
3.2.3. MÉTODOS UTILIZADOS NA CARACTERIZAÇÃO DO FIBRINOGÊNIO	23
3.2.3.1. DOSAGEM DAS PROTEÍNAS	23
3.2.3.2. DOSAGEM DO FIBRINOGÊNIO	23
3.2.3.3. DETERMINAÇÃO DA COAGULABILIDADE DO FIBRINOGÊNIO	23
3.2.3.4. REDUÇÃO DAS PONTES DISSULFETO DAS CADEIAS DO FIBRINOGÊNIO DE <i>B. JARARACA</i>	24
3.2.3.5. ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA (SDS-PAGE)	24
3.2.3.6. COLORAÇÃO DO GEL PELO MÉTODO DE PRATA	25
3.2.3.7. DENSITOMETRIA	26
3.2.3.8. PRODUÇÃO DE ANTICORPOS POLICLONAIS ANTI-FIBRINOGÊNIO DE <i>B. JARARACA</i> EM COELHO	26
3.2.3.9. DETERMINAÇÃO DO TÍTULO DE ANTICORPOS ANTI-FIBRINOGÊNIO DE <i>B. JARARACA</i> PELO MÉTODO IMUNOENZIMÁTICO (ELISA)	26
3.2.3.10. WESTERN BLOTTING	27
3.2.3.11. ATIVIDADE COAGULANTE DOS VENENOS DE SERPENTES	28
3.2.3.12. SEQÜENCIAMENTO DA REGIÃO AMINO-TERMINAL DO FIBRINOGÊNIO DE <i>B. JARARACA</i> POR DEGRADAÇÃO DE EDMAN	29
3.2.3.13. ESPECTROMETRIA DE MASSA (MALDI-TOF)	29
<b>IV. RESULTADOS</b>	<b>31</b>



<b>4.1. PURIFICAÇÃO DO FIBRINOGÊNIO</b>	<b>31</b>
<b>4.2. CARACTERIZAÇÃO DO FIBRINOGÊNIO</b>	<b>32</b>
4.2.1. DETERMINAÇÃO DA COAGULABILIDADE DO FIBRINOGÊNIO	32
4.2.2. ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA (SDS-PAGE)	32
4.2.3. ATIVIDADE COAGULANTE DO VENENO DE SERPENTES	34
4.2.4. WESTERN BLOTTING	35
4.2.5. SEQÜENCIAMENTO DA REGIÃO AMINO-TERMINAL DO FIBRINOGÊNIO DE <i>B. JARARACA</i> POR DEGRADAÇÃO DE EDMAN	36
4.2.6. ESPECTROMETRIA DE MASSA (MALDI-TOF)	37
<b>V. DISCUSSÃO</b>	<b>40</b>
<b>VI. CONCLUSÕES</b>	<b>45</b>
<b>VII. RESUMO</b>	<b>46</b>
<b>VIII. ABTRACT</b>	<b>48</b>
<b>IX. APÊNDICE A – ABREVIATURAS</b>	<b>49</b>
<b>X. APÊNDICE B - AMINOÁCIDOS</b>	<b>50</b>
<b>XI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>51</b>
<b>XII. BIOGRAFIA</b>	<b>60</b>

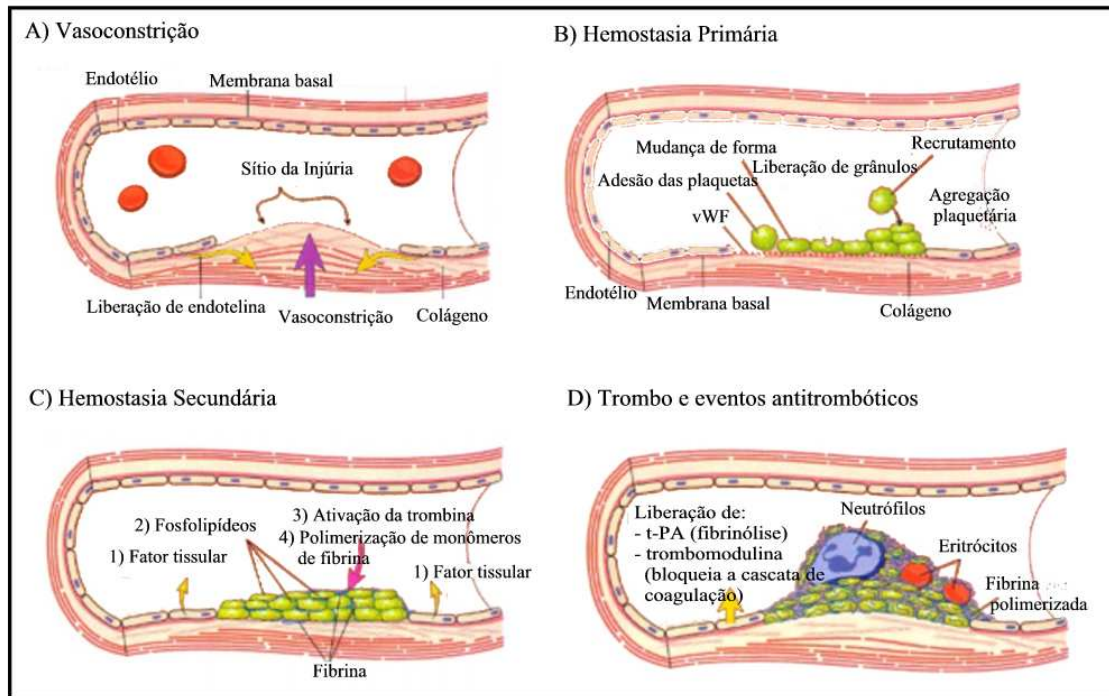
---

# I. Introdução

## 1.1. Hemostasia

A hemostasia é um mecanismo de defesa fundamental de todos os vertebrados que envolve duas funções principais: manter a fluidez sangüínea e evitar a perda de sangue quando ocorre alguma lesão vascular. Este processo depende do delicado balanço e de interrelações complexas entre pelo menos cinco componentes: vasos sangüíneos, plaquetas, proteínas e inibidores da coagulação e sistema fibrinolítico (BROSOVIC, 1991; GENTRY, 2004).

A hemostasia pode ser dividida em hemostasia primária e secundária. A hemostasia primária ocorre pela interação entre a parede do vaso lesado e as plaquetas. Essa interação envolve uma série de eventos que incluem a adesão das plaquetas ao subendotélio, ativação, mudança de forma e liberação do conteúdo granular das plaquetas. O endotélio mantém a fluidez sangüínea produzindo inibidores da coagulação, como a trombomodulina e o heparan sulfato, inibidores da agregação plaquetária, como a prostaglandina I<sub>2</sub> e o óxido nítrico, e também modulando o tônus vascular. Após lesão, ocorre vasoconstrição e exposição do fator de von Willebrand que promove a adesão das plaquetas. Fatores plasmáticos, cofatores, fosfolipídios e íons cálcio participam da hemostasia secundária (Fig. 1) (IWANAGA, 1993; TRIPLETT, 2000).



**Figura 1.** Ilustração esquemática de algumas atividades pró e anticoagulantes das células endoteliais. vWF, fator de von Willebrand e t-PA, ativador de plasminogênio (KUMAR *et al.*, 2004).

As proteínas da coagulação sanguínea são, na sua maioria, enzimas que circulam normalmente na sua forma inativa, denominadas zimogênios (Fig.2) (FURIE & FURIE, 1992). Por convenção, as proteínas plasmáticas pró-coagulantes são referidas como fatores e designadas por numerais romanos (GENTRY, 2004). Em mamíferos, didaticamente, são descritas duas vias clássicas da cascata de coagulação sanguínea: a intrínseca e a extrínseca.

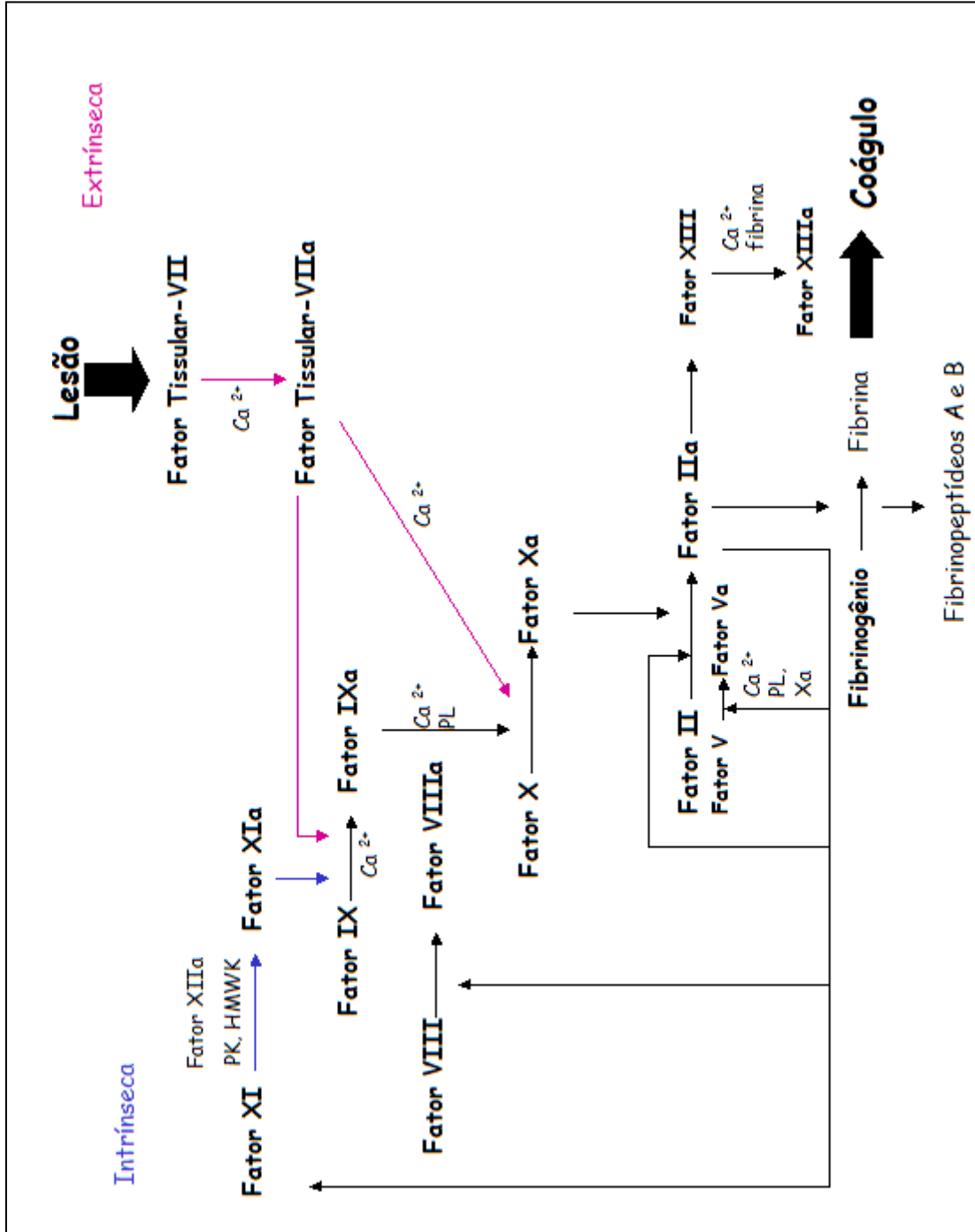


Figura 2. Ativação da cascata de coagulação pelas vias extrínseca e intrínseca e

**Tabela 1.** Fatores de coagulação do plasma humano.

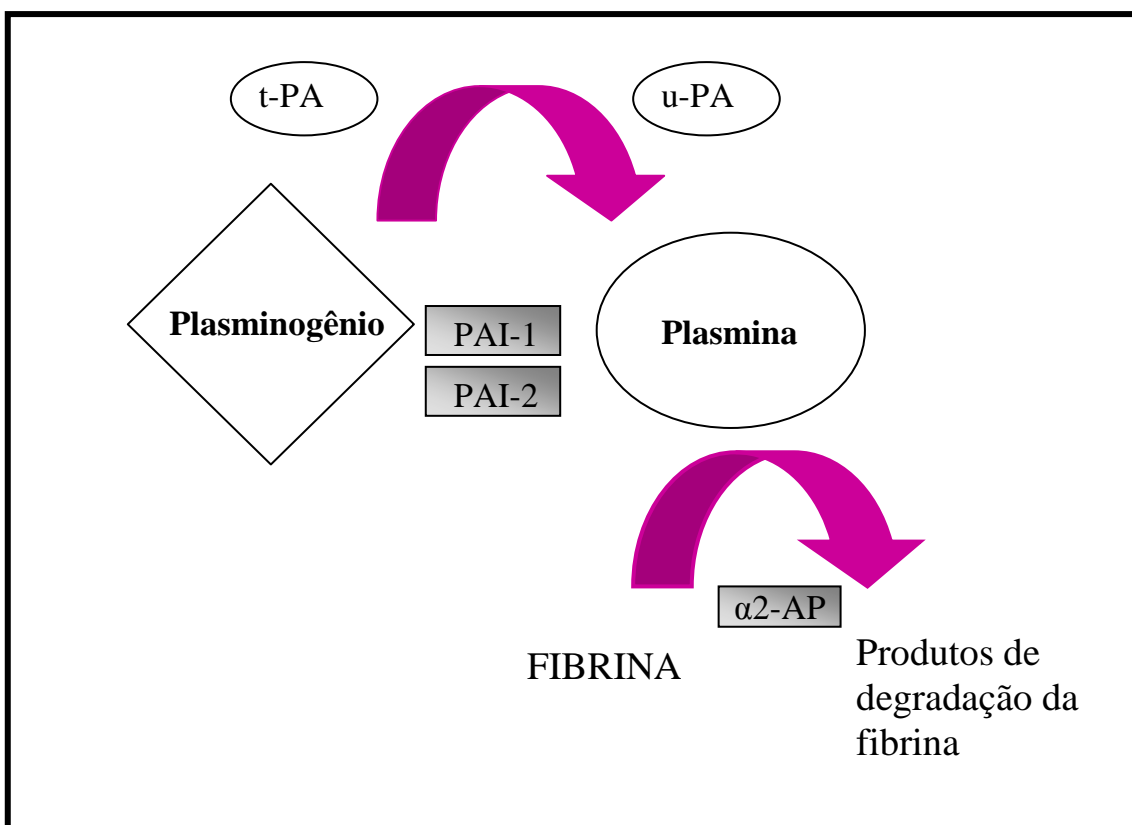
Fator	Proteína	Massa Molecular (kDa)	Concentração Plasmática (µg/mL)
I	fibrinogênio	340	2000-4000
II	protrombina	72	100
III	fator tissular	37	---
IV	íon cálcio	---	---
V	proacelerina	330	10
VII	proconvertina	55	0,5
VIII	fator anti-hemofílico	330	0,1
IX	fator Christmas	55	5
X	fator Stuart	55	10
XI	antecedente de tromboplastina do plasma	160	5
XII	fator Hageman	80	30
XIII	fator estabilizador da fibrina	320	10
---	fator Von Willebrand	220	10
---	pré-caliceína		30
---	cininogênio de alto peso molecular		80

(ROBERTS & LOZIER, 1992)

A ativação da via extrínseca é iniciada após lesão tecidual com a liberação do fator tissular, que é uma proteína de membrana, que juntamente com o fator VIIa (fator ativado) ativa o fator X e, em menor proporção, o fator IX (FURIE & FURIE, 1988). A via intrínseca é uma via complementar que se inicia pela ativação do fator XI em XIa e este ativa o fator IX em IXa. Ambas as vias resultam na formação do fator Xa que, juntamente com o fator Va, em presença de íons cálcio e fosfolipídeos, convertem a protrombina (fator II) em trombina (fator IIa). Por sua vez, a trombina converte o fibrinogênio em monômeros de fibrina e também ativa o fator XIII, que catalisa a polimerização desses monômeros, transformando-os em fibrina estável. Por retroalimentação positiva, a trombina ativa os fatores XI e VIII, que é um co-fator do fator IX que potencializa a ativação do fator X. A trombina ativa também a própria

protrombina e o fator V, co-fator do fator Xa que potencializa a ativação da protrombina. Acredita-se que a via intrínseca seja responsável pela formação e manutenção do coágulo enquanto que, a via extrínseca pelo início da cascata de coagulação (DAVIE *et al.*, 1991).

A dissolução do coágulo ocorre através do sistema fibrinolítico com a ativação da plasmina (Fig. 3). São conhecidos dois ativadores de plasminogênio: t-PA, ativador de plasminogênio tipo tissular, e u-PA, ativador de plasminogênio tipo uroquinase. A plasmina é produzida a partir de uma pró-enzima inativa, o plasminogênio, que tem por função degradar a fibrina. Além da fibrina, a plasmina também degrada o fibrinogênio e os fatores V e VIII, embora seja um processo altamente específico para a fibrina (COLLEN, 1999).



**Figura 3.** Representação esquemática do sistema fibrinolítico (HOFFMAN *et al.*, 2005).

## 1.2. Hemostasia Comparada

Embora a hemostasia dos mamíferos seja bastante estudada, principalmente em função das doenças oclusivas trombóticas arteriais e venosas em humanos (DAHLBACK, 2000), o mesmo não ocorre com outras classes de animais.

Sabe-se que em todos os animais existe a participação de células no mecanismo hemostático, como os hemócitos nos crustáceos, os trombócitos nos peixes, anfíbios, répteis e aves, e as plaquetas nos mamíferos (IWANAGA, 1993).

Estudos da coagulação comparada de algumas espécies de peixes (LEWIS, 1972; JIANG & DOOLITTLE, 2003) e aves (DIDISHEIM *et al.*, 1959) mostraram a ausência de atividade do fator XII, que foi também observada em alguns mamíferos marinhos, como os golfinhos e as baleias (ROBINSON *et al.*, 1969). Em avestruzes também foi observada a ausência do fator XI (FROST *et al.*, 1999). Contudo, em peixes *Danio rerio* foi observada a ativação da via intrínseca (JAGADEESWARAN & SHEEHAN, 1999).

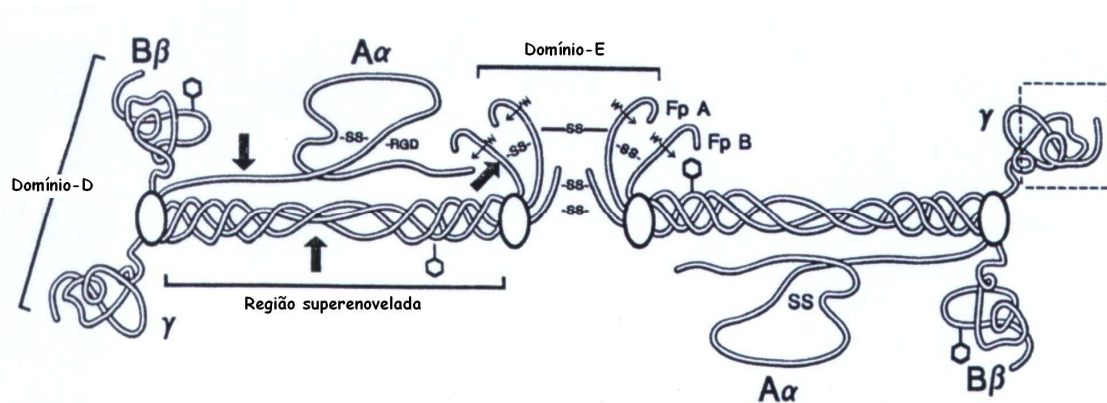
O sangue dos répteis tem o tempo de coagulação prolongado em relação aos mamíferos, anfíbios e elasmobrânquios, indicando diferenças no mecanismo da coagulação (LEWIS, 1972; DENSON, 1976; KUBALEK *et al.*, 2002). Em alguns répteis, a via intrínseca parece ser menos eficiente devido à presença de anticoagulantes, como o descrito no sangue do lagarto *Trachydosaurus rugosus rugosus* (HACKETT & HANN, 1967; NAHAS *et al.*, 1973), além da ausência ou deficiência de alguns fatores da coagulação sangüínea como os fatores VIII e IX (DIDISHEIM *et al.*, 1959; FANTL, 1961). O plasma da serpente *Bothrops jararaca* (*B. jararaca*), apresenta diversos inibidores naturais. TANIZAKI e col. (1991) isolaram uma proteína que inibe metaloproteases do veneno de *B. jararaca* e TANAKA-AZEVEDO e col. (2003) isolaram um inibidor da atividade coagulante de trombina (BjI) presente no plasma da serpente *B. jararaca* sendo que este prolonga a via intrínseca da coagulação sangüínea.

### 1.3. Fibrinogênio

O fibrinogênio é uma glicoproteína plasmática que, em humanos, é sintetizado no fígado pelos hepatócitos e liberado na circulação como uma molécula constituída por duas subunidades idênticas, formadas por três pares de cadeias polipeptídicas denominadas  $A\alpha$ ,  $B\beta$  e  $\gamma$ . As letras “A” e “B” são utilizadas para designar os fibrinopeptídeos A (resíduos 1 a 16) e B (resíduos 1 a 14), que estão presentes nas regiões amino-terminais das cadeias  $A\alpha$  e  $B\beta$ , respectivamente (GENTRY, 2004; TENNENT *et al.*, 2007; MEDVED & WEISEL, 2009).

A parte central da molécula, designada região E, contém a porção amino-terminal de todas as cadeias, incluindo os fibrinopeptídeos A e B, e também as pontes dissulfeto que ligam as duas subunidades. As porções finais das regiões carboxi-terminais das cadeias  $B\beta$  e  $\gamma$  constituem as regiões D (Fig. 4). Em humanos, cada cadeia  $A\alpha$  consiste de 610 resíduos de aminoácidos,  $B\beta$  de 461 e  $\gamma$  de 411. Assim, a molécula inteira possui 2964 aminoácidos (DOOLITTLE, 1994).





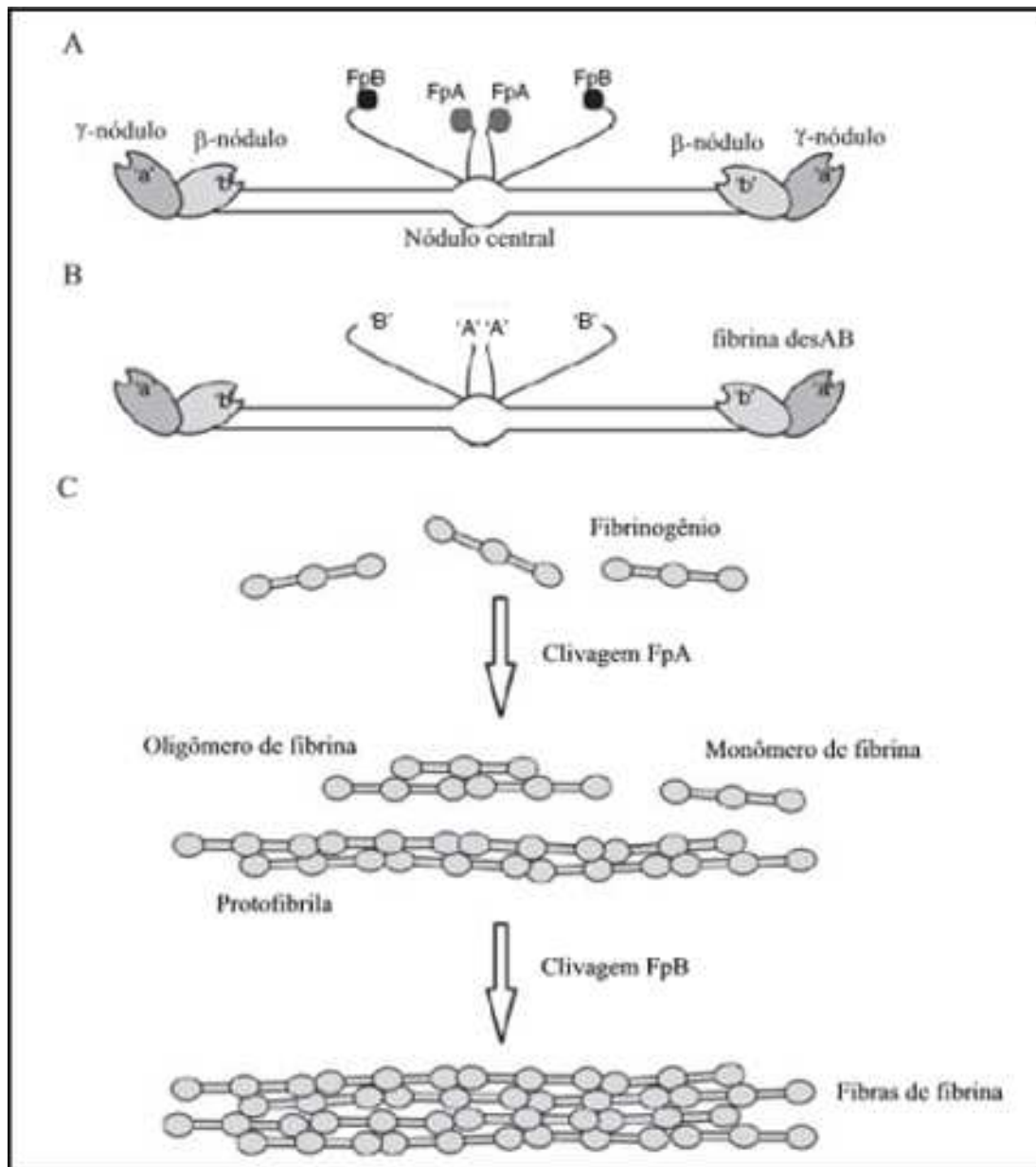
**Figura 4.** Modelo esquemático da molécula de fibrinogênio. O fibrinogênio é uma glicoproteína que forma uma estrutura trinodular. Três cadeias polipeptídicas distintas, A $\alpha$ , B $\beta$  e  $\gamma$ , são ligadas por pontes dissulfeto para produzir cada metade simétrica de uma molécula de fibrinogênio. As duas regiões D formam os nódulos externos e são formadas por dois terços das regiões C-terminais das cadeias B $\beta$  e  $\gamma$ . A região E é nodular e é formada por ligações de pontes dissulfeto próximas à região N-terminal das seis cadeias polipeptídicas. As regiões D e E são separadas entre si por ligações dissulfeto chamada de anéis de dissulfeto e uma rigidez de aminoácidos denominada de domínio superenovelado. A plasmina degrada a molécula do fibrinogênio pela clivagem das cadeias A $\alpha$ , B $\beta$  e sítios da região superenovelada (indicadas pelas setas grossas). A trombina cliva os fibrinopeptídeos A e B da região N-terminal das cadeias A $\alpha$  e B $\beta$  (indicadas pelas setas pequenas) (GREENBERG, 1998).

A conversão do fibrinogênio em fibrina e a conseqüente formação do coágulo de fibrina são os últimos eventos da cascata de coagulação. As ligações Arginina (16)-Glicina (17) presentes nas regiões amino-terminais das cadeias A $\alpha$  e B $\beta$  do fibrinogênio são hidrolisadas pela trombina e os fibrinopeptídeos A e B, respectivamente, são liberados, formando monômeros de fibrina (BLOMBÄCK, 1958). A remoção dos fibrinopeptídeos expõe os sítios A e B do domínio E de um monômero de fibrina (Fig.5), que interagem com os sítios a e b do domínio D (LAUDANO & DOOLITTLE, 1978), respectivamente, de outro monômero, formando dímeros, que, por sua vez, formam polímeros espontaneamente. A região carboxi-terminal da cadeia  $\gamma$  contém um sítio de ligação para o fator XIII que, concomitante com a ativação do fibrinogênio, é ativado pela trombina em fator XIIIa (transglutaminase), formando pontes covalentes entre os resíduos glutamina e lisina de uma molécula de fibrina com outra molécula, liberando amônia. Mais lentamente, as cadeia A $\alpha$  também formam pontes com a participação do fator XIIIa. Essas interações catalisam a polimerização da fibrina

---

formando, finalmente, o coágulo (CHEN & DOOLITTLE, 1969).

No caso dos mamíferos, somente a remoção do fibrinopeptídeo A é necessária para permitir a polimerização, sendo liberado mais rapidamente que o fibrinopeptídeo B (DOOLITTLE, 1976). Acredita-se que inicialmente a liberação do fibrinopeptídeo B seja mais lenta que o A e que sua velocidade aumente dependendo da formação de fibrina (HURLET-JENSEN *et al.*, 1982).



**Figura 5.** Esquema da formação de fibrina e sua polimerização. A) Fibrinogênio esquemático mostrando os fibrinopeptídeos A e B (FpA e FpB, respectivamente), presentes nas cadeias  $A\alpha$  e  $B\beta$ . B) Formação de monômeros de fibrina. Notar os sítios de polimerização da fibrina complementares **A:a** e **B:b**. Os sítios **a** e **b** estão presentes na cadeia  $\gamma$  enquanto que os sítios **A** e **B** são expostos após a remoção dos fibrinopeptídeos A e B, respectivamente (fibrina desAB, que é uma molécula destituída de ambos fibrinopeptídeos). C) Etapas iniciais da polimerização, mostrando oligômeros (polímero constituído de poucos monômeros de fibrina), protofibrilas ou fibrilas (constituídas de dois polímeros de fibrina) e fibras de fibrina (grupos de protofibrilas associados uns aos outros lateralmente) (MEDVED & WEISEL, 2009).

---

A concentração de várias proteínas da coagulação (Tabela 1) está relacionada aos seus papéis específicos. Assim, o fibrinogênio é o fator coagulante predominante (2-4 mg/mL) com meia-vida de aproximadamente 4 dias, sendo que, sua concentração é de até 40 mil vezes superior ao fator VIII. Essa alta concentração de fibrinogênio é devido a sua necessidade para formação de fibrina enquanto que para a ativação do fator X, a quantidade de fator VIII presente no plasma é mais que suficiente (DAHLBACK, 2000).

Há diversos outros fatores associados aos níveis de fibrinogênio plasmático. ERNST e RESCH (1993), FOLSOM e col. (1993) e STEPTOE e col. (2003) relacionaram o aumento da concentração do fibrinogênio com doenças cardiovasculares, sexo, raça, idade, obesidade, entre outros (Tabela 2).

Assim, estudos demonstraram que pessoas obesas chegam a apresentar aumento de 40% na concentração de fibrinogênio, quando comparadas a não obesos (MERTENS & VAN GAAL, 2002).

A gravidez também está associada ao aumento da concentração de fibrinogênio (STIRLING *et al.*, 1984). Sabe-se que o fibrinogênio é vital para a manutenção da gestação, sendo que em grávidas com alterações nos níveis e/ou função do fibrinogênio é necessária a terapia de reposição desta proteína, sob risco de sofrer aborto (KOBAYASHI *et al.*, 1996; INBAL & MUSZBEK, 2003; FRENKEL *et al.*, 2004).

**Tabela 2.** Fatores associados com a concentração de fibrinogênio (em humanos).

Alta concentração de fibrinogênio	Baixa concentração de fibrinogênio
Regiões com alta incidência de doenças cardiovasculares	Regiões com baixa incidência de doenças cardiovasculares
Inverno	Verão
Sexo feminino	Sexo masculino
Raça negra	Altura
Idade	Colesterol HDL
Menopausa	Concentração de testosterona
Obesidade	Estrógenos pós-menopausa
Dieta rica em carboidratos	Atividade física
Pressão sistólica	Consumo moderado de álcool
Colesterol total ou LDL	Dietas ricas em gorduras polinsaturadas
Concentração de triacilglicerol	
Lipoproteína	
Insulina	
Diabetes <i>mellitus</i>	
Cigarro	
Inflamação ou infecção	

(ERNST & RESCH, 1993)

O fibrinogênio também participa da agregação plaquetária, ligando-se à glicoproteína de membrana IIb-IIIa (GPIIb-IIIa) nas plaquetas ativadas, formando uma ponte entre duas plaquetas (ANDRIEUX *et al.*, 1989; HAWIGER *et al.*, 1989; JACKSON, 2007). O fibrinogênio possui três sítios de ligação da GPIIb-IIIa: duas seqüências RGD na cadeia A $\alpha$  (RGDS e RGDF) e um dodecapeptídeo (HHLGGAKQAGDY) na região C-terminal da cadeia  $\gamma$  ( $\gamma$ -dodecapeptídeo), sendo que o  $\gamma$ -dodecapeptídeo é o principal sítio de ligação da GPIIb-IIIa ao fibrinogênio (FARRELL *et al.*, 1992; BERNDT *et al.*, 1995).

Além da coagulação, o fibrinogênio está relacionado a processos inflamatórios agudos e crônicos (GABAY & KUSHNER, 1999). O aumento da produção de fibrinogênio pelo fígado ocorre em resposta a infecções e outros agentes tóxicos. Assim, o

---

fibrinogênio, e também a fibrina, aumentam a proliferação de fibroblastos e ainda facilitam a adesão e migração dos leucócitos (BROWN *et al.*, 1993; LANGUINO *et al.*, 1995).

#### **1.4. Serpentes**

As serpentes pertencem à Classe Reptilia, à Ordem Squamata e à Subordem Ophidia. Existem aproximadamente 2900 espécies de serpentes, organizadas em três Superfamílias: Typhlopoidea (Scolocophidia), Henophidia (Booidea) e Xenophidia (Colubroidea) (ZUG, 2001). Esses animais são caracterizadas pela forma alongada do corpo, escamas epidérmicas por todo o corpo e também pela ausência de membros locomotores, pálpebras móveis e de ouvido externo (MELGAREJO, 2003).

##### **1.4.1. *Bothrops jararaca***

A serpente *B. jararaca* (Wied, 1824), popularmente conhecida como jararaca, pertence à família Viperidae (Laurentie, 1768). Essa família é constituída de cerca de 250 espécies (ZUG, 2001) e caracteriza-se por possuir aparelho inoculador do tipo solenóglifo e cabeça triangular, recoberta por pequenas escamas de aspecto similar às do corpo (MELGAREJO, 2003).



**Figura 6.** Serpente *Bothrops jararaca* (foto cedida por Alexandre Zanotti).

A *B. jararaca* (Fig.6) possui coloração variada com manchas em forma de “v” invertido ao longo do corpo e mede aproximadamente um metro (SAZIMA, 1988). É vivípara e, em média, pode ter ninhada de 12 a 18 filhotes. Essa espécie possui hábitos terrestres, atividade basicamente noturna e alimenta-se principalmente de pequenos roedores. É considerado um animal generalista que pode ser encontrado em matas, cerrados e campos cultivados (AMARAL, 1976), sendo muito comum na região Sudeste do Brasil, podendo ocorrer desde o Sul da Bahia até o Rio Grande do Sul (Fig. 7) (MELGAREJO, 2003).



**Figura 7.** Distribuição da espécie *Bothrops jararaca* no Brasil (FUNASA, 2001).

O gênero *Bothrops* (Wagler, 1824) é responsável por cerca de 90 % dos acidentes por serpentes peçonhentas registrados anualmente no Brasil, sendo que 50 % destes são causados pela *B. jararaca* (FUNASA, 2001). Provavelmente, isso se deve à abundância e distribuição geográfica desta serpente (SAZIMA, 1988).

### 1.5. Venenos de Serpentes

Os venenos de serpentes são misturas complexas compostas, principalmente, por proteínas e peptídeos (90-95 % do peso seco do veneno) que possuem uma grande variedade de atividades biológicas, que podem afetar a homeostasia em mamíferos (LEE, 1979; MARKLAND, 1998).

O veneno de diversas serpentes possui atividades pró-coagulantes devido à presença de proteases que ativam zimogênios da cascata de coagulação (HUTTON &

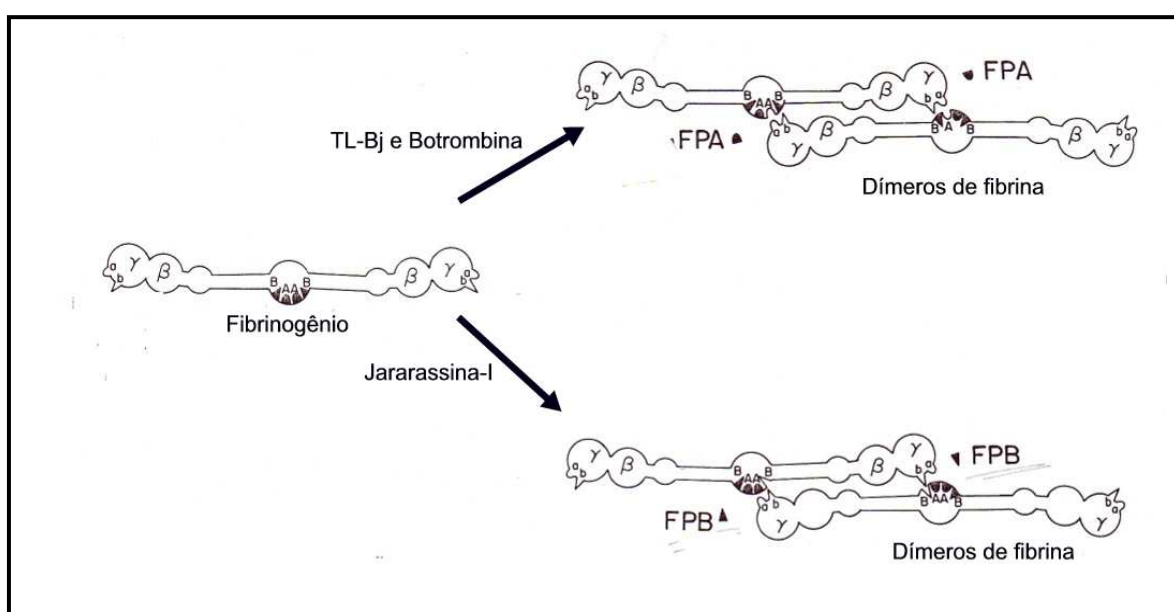


---

WARRELL, 1993). Essas proteases ativam o sistema da coagulação em pontos específicos, sendo denominadas ativadores de fator X, ativadores de protrombina e enzimas trombina-símile (*thrombin-like*), que convertem o fibrinogênio em fibrina.

Cerca de 100 toxinas de venenos de serpentes são descritas como enzimas trombina-símile (MARSH & WILLIAMS, 2005). Embora enzimas trombina-símile compartilhem similaridades funcionais com a trombina de mamíferos, elas são estruturalmente diferentes (JOSEPH *et al.*, 2002). As enzimas trombina-símile clivam o fibrinogênio, mas, diferentemente da trombina, podem ou não liberar ambos os fibrinopeptídeos A e B e também não ativam outros fatores da cascata de coagulação como o fator XIII (JANSZKY, 1950; BLOMBÄCK *et al.*, 1958).

São descritas três enzimas trombina-símile purificadas do veneno de *B. jararaca*, a jararassina-I (VIEIRA *et al.*, 2004), a botrombina (NISHIDA *et al.*, 1994) e a TL-BJ (SERRANO *et al.*, 2000) e apresentam massa molecular de cerca de 30 kDa. A botrombina e a TL-BJ liberam preferencialmente o fibrinopeptídeo A enquanto que a jararassina libera o B (Fig. 8).



**Figura 8.** Esquema da formação de dímeros de fibrina. Notar que as enzimas trombina-símil botrombina e TL-BJ liberam os fibrinopeptídeo A e a jararassina-I libera o B. A trombina remove ambos fibrinopeptídeos A e B (WEISEL, 1986).

O veneno das serpentes pertencentes ao gênero *Bothrops* apresenta atividades proteolítica, coagulante e hemorrágica. Existem várias proteínas nesse veneno que ativam o sistema de coagulação (ativadores de fator X, II e fibrinogênio) levando ao à formação da fibrina e, conseqüentemente, ao consumo de fibrinogênio e à incoagulabilidade sangüínea. O veneno de *Lachesis* apresenta atividades hemorrágica, miotóxica, proteolítica, e coagulante, sendo muito semelhante ao veneno botrópico (OTERO *et al.*, 1998). Esta atividade coagulante é devido à presença de componentes, exclusivamente, do tipo enzimas trombina-símil (SANO-MARTINS & SANTORO, 2003). Por outro lado, o veneno de *Crotalus Sul americana* distingue-se do botrópico por apresentar, além da atividade coagulante (pela presença de enzimas trombina-símil), atividades neurotóxica e miotóxica (SANO-MARTINS & SANTORO, 2003).

Alguns mamíferos e serpentes são resistentes à atividade tóxica dos venenos de serpentes, apresentando proteínas no sangue que inibem componentes do veneno (DOMONT *et al.*, 1991; FORTES-DIAS *et al.*, 1991; THURN *et al.*, 1993). O plasma da serpente *Crotalus viridis* não coagula com arвина, enzima trombina-símil da serpente *Agkistrodon rhodostoma* (*Calloselasma rhodostoma*) (DENSON, 1976) assim como os

---

plasmas das serpentes *Pseudonaja textilis*, *Python reticulatus*, *Crotalus atrox* e *Notechis scutatus* (JOSEPH *et al.*, 2002) e da iguana *Iguana iguana* não coagulam com batroxobina (enzima trombina-símile isolada da serpente *B. atrox*) (KUBALEK *et al.*, 2002).

Além disso, o plasma da serpente *B. jararaca* é capaz de inibir a atividade coagulante de vários venenos de serpentes do gênero *Bothrops* e também de *Crotalus durissus terrificus* (*C. d. terrificus*). OLIVEIRA e TANIZAKI (1992) purificaram um inibidor de proteinase do plasma de *B. jararaca* que reduz a atividade coagulante da enzima trombina-símile do veneno da mesma espécie. NAHAS e col. (1983) sugeriram que o fibrinogênio presente no plasma de *B. jararaca* tenha efeito inibitório sobre a atividade coagulante do veneno botrópico, o que torna ainda mais interessante o estudo dessa proteína nesses animais.

---

## II. Objetivos

Os répteis descenderam dos anfíbios e conquistaram o ambiente terrestre por apresentar pele seca e cornificada, além de ovo diferenciado. Esses animais possuem peculiaridades quanto ao mecanismo de coagulação e podem apresentar anticoagulantes naturais em seu plasma. O fibrinogênio é uma das proteínas mais importantes do mecanismo de coagulação, sendo encontrado em todos os animais vertebrados e até mesmo os invertebrados possuem proteínas que desempenham papel semelhante.

Considerando-se a escassez de informações a respeito da hemostasia em répteis, o estudo do fibrinogênio pode contribuir para a elucidação do mecanismo de coagulação em répteis, bem como possibilitar sua comparação com o de outros animais descritos na literatura, o que torna bastante interessante do ponto de vista evolutivo. Sendo assim, os objetivos deste trabalho foram:

- purificar e caracterizar o fibrinogênio do plasma da serpente *B. jararaca*;
- comparar esta proteína com a de outros animais já descritos;
- verificar a ação do veneno de diferentes serpentes sobre o fibrinogênio purificado.

### **III. Materiais e Métodos**

#### **3.1. Materiais**

##### **3.1.1. Animais**

###### 3.1.1.1. Serpentes

Foram utilizadas 14 serpentes *B. jararaca* adultas, fornecidas pelo Laboratório de Herpetologia do Instituto Butantan, para a obtenção de plasma. O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Butantan (n° 156/04).

###### 3.1.1.2. Coelho

Foi utilizado um coelho macho adulto fornecido pelo Biotério Central do Instituto Butantan, para a produção de anticorpos policlonais anti-fibrinogênio de *B. jararaca*. Este procedimento foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Butantan (n° 401/07).

---

### 3.1.2. Venenos de Serpentes

Os venenos liofilizados das serpentes *B. jararaca*, *C. d. terrificus* e *Lachesis muta rhombeata* (*L. m. rhombeata*) foram fornecidos pelo Laboratório de Herpetologia do Instituto Butantan.

## 3.2. Métodos

### 3.2.1. Coleta de Sangue

As serpentes *B. jararaca* foram anestesiadas com pentobarbital (30 mg/Kg) e a aorta foi exposta por laparotomia para a coleta do sangue. Imediatamente, o sangue foi adicionado ao citrato de sódio 3,8 %, na proporção de 9:1 e misturado gentilmente. O sangue foi centrifugado por 15 minutos a 1200 g a temperatura ambiente e o plasma obtido foi armazenado a -70° C até o momento do uso.

### 3.2.2. Purificação do Fibrinogênio

#### 3.2.2.1. Separação do Fibrinogênio das Proteínas Dependentes de Vitamina K

Os plasmas de 14 serpentes (v=90 mL) foram descongelados a 37°C em banho-maria. Foram adicionados cloreto de bário 1 M, ácido epsílon aminocapróico ( $\epsilon$ ACA)

---

50 mM, benzamidina 5mM e fluoreto de fenil-metil-sulfonil (PMSF) 1 mM ao plasma que, então, foi agitado por 30 minutos a 4°C e centrifugado por 20 minutos a 3600 g.

### 3.2.2.2. Precipitação com Sulfato de Amônio

O sobrenadante, obtido no item 3.2.2.1, teve seu pH acertado para 7,3 com ácido cítrico 50 mM e, em seguida, foram adicionados NaCl 150 mM e sulfato de amônio até 25 % de saturação. Após agitação por 1 hora a 4°C, o sobrenadante foi centrifugado a 7000 g por 20 minutos a 1° C. O precipitado foi ressuspensão em metade do volume inicial de plasma de tampão citrato - fosfato 50 mM pH 6,6 e novamente foi adicionado sulfato de amônio até 25 % de saturação. Após agitação por 1 hora a 4° C, o sobrenadante foi centrifugado a 7030 g por 20 minutos a 1° C. O precipitado foi ressuspensão em mesmo volume de tampão citrato-ácido cítrico 10mM pH 7,3 com NaCl 0,1 M e  $\epsilon$ ACA 1 mM e, em seguida, dialisado contra tampão citrato de sódio 10mM pH 7,0 por 18 horas a 4° C.

### 3.2.2.3. Cromatografia de Filtração em Gel

Após diálise, a amostra foi centrifugada por 15 minutos a 780 g e aplicada (v=5mL) em coluna Sephacryl S300 HR 26/60 (GE Healthcare) previamente equilibrada com tampão citrato de sódio 10 mM pH 7,0. A cromatografia (ÄKTA Prime - GE Healthcare) foi realizada com fluxo de 2mL/min, sendo coletadas frações de 2 mL. A cromatografia foi monitorada através da leitura de  $A_{280}$  em espectrofotômetro SpectraMax 190 (Molecular Devices).

### 3.2.3. Métodos Utilizados na Caracterização do Fibrinogênio

#### 3.2.3.1. Dosagem das Proteínas

A dosagem das proteínas foi feita através da leitura de absorbância a 280 nm em espectrofotômetro SpectraMax190 (Molecular Devices) (STOSCHECK, 1990).

#### 3.2.3.2. Dosagem do Fibrinogênio

A dosagem do fibrinogênio foi feita de acordo com o método colorimétrico de RATNOFF e MENZIE (1951). Assim, em tubos de vidro de centrifugação, foram adicionados 0,5 mL de vidro moído, 10 mL de NaCl 0,85 %, 0,05 mL de trombina bovina (36 U) (Sigma-Aldrich) e 0,2 a 0,5 mL de plasma ou fibrinogênio purificado. Após a formação do coágulo (fibrina), os tubos foram centrifugados a 500 g por 5 minutos. O coágulo foi, então, cuidadosamente espremido e o sobrenadante desprezado. O procedimento foi repetido por mais duas vezes. À fibrina, foi adicionado 1 mL de NaOH 10% e os tubos foram aquecidos em banho fervente por 10 minutos. Após o resfriamento dos tubos, foram adicionados 7 mL de água, 3 mL de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 20 % e 1 mL de reagente fenólico. Trinta minutos depois, foi feita leitura de absorbância a 650 nm.

#### 3.2.3.3. Determinação da Coagulabilidade do Fibrinogênio

A coagulabilidade do fibrinogênio foi determinada de acordo com JAKOBSEN e KIERULF modificado (1973).

Em 0,5 mL de fibrinogênio purificado foi adicionada trombina bovina 3 U (0,025 mL). Após 1 hora em banho a 37° C, foi feita a leitura a 280 nm do sobrenadante do



---

coágulo formado. Foram feitas leituras também da trombina 3 U e do fibrinogênio, separadamente, antes da formação do coágulo para comparação.

#### 3.2.3.4. Redução das Pontes Dissulfeto das Cadeias do Fibrinogênio de *B. jararaca*

As pontes dissulfeto foram reduzidas de acordo com KONIGSBERG (1972). Sucintamente, ao fibrinogênio de *B. jararaca* (500 µL) foi adicionada solução contendo tampão tris 0,5 M, guanidina-HCl 6 M, EDTA 2 mM pH 9 e ditioneitol 10 mM. Após incubação por 4 horas à 50° C (em banho-maria), foi adicionada nova solução contendo água e ácido monoiodoacético pH 8 (acertado com NH<sub>4</sub>OH). A solução foi novamente incubada a 50° C, por 30 minutos e, depois dialisada contra tampão citrato de sódio 10 mM pH 7. Após 18 horas à 4° C, a amostra permaneceu congelada a - 70° C até o momento do uso.

#### 3.2.3.5. Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (SDS-PAGE)

A eletroforese foi feita em gel de poliacrilamida a 5 % para condições não reduzidas e gradiente de 3 a 15 % para condições reduzidas, segundo LAEMMLI (1970).

O gel de corrida foi preparado com acrilamida 30% e bis-acrilamida 0,8%, água, tampão tris 0,375 M (pH 8,8), SDS 0,1 %, TEMED 0,05 % e persulfato de amônio 0,05 %.

O gel de aplicação foi preparado com as mesmas soluções acima, com a diferença de que o tampão tris utilizado, possui pH 6,8. Neste gel, foi colocado pente de 1mm de espessura contendo dez canaletas para aplicação das amostras.

---

Tampão tris 0,05 M (pH 6,8), glicerol 10%, SDS 1% e azul de bromofenol 0,004% foram adicionados às amostras, em presença ou ausência de  $\beta$ -mercaptoetanol. As amostras foram fervidas em banho seco a 100°C por sete minutos e, em seguida, centrifugadas rapidamente.

Foram aplicados 2,5  $\mu$ g das amostras por canaleta. As massas do marcador de massa molecular Broad Range (BioRad) utilizado foram 200 (miosina), 116 ( $\beta$ -galactosidase), 97 (fosforilase b), 66 (soro albumin), 45 (ovoalbumina), 31 (anidrase carbônica) e 21 kDa (inibidor de tripsina). Como tampão de corrida foi utilizado tris 25 mM, glicina 192mM e SDS 0,1%, pH 8,3. A corrida foi feita com amperagem de 30 mA por gel, por aproximadamente uma hora, em aparelho PowerPack 1000 (BioRad).

#### 3.2.3.6. Coloração do Gel pelo Método de Prata

A coloração do gel foi feita de acordo com BLUM (1987). Após a corrida eletroforética, o gel foi fixado por uma hora em solução contendo metanol, ácido acético e formaldeído 37 %. Em seguida, o gel foi lavado em etanol 50% por uma hora, com três trocas. Depois das lavagens, o gel foi submetido a tratamento prévio em solução de tiosulfato de sódio 50 % (0,2 g/L) por 20 segundos, por três vezes. O gel foi, então, lavado com água por três vezes (de 20 segundos) e colocado em solução contendo nitrato de prata 20 % e formaldeído 37 %. O gel foi novamente lavado em água e colocado em solução contendo carbonato de sódio 20 %, formaldeído 37 % e tiosulfato de sódio 50 %, para a revelação. Após as bandas aparecerem, foi adicionado ao gel metanol 50 % e ácido acético, por dez minutos. Em seguida, o gel foi colocado entre duas folhas de papel celofane para secar.

### 3.2.3.7. Densitometria

A massa molecular do fibrinogênio purificado foi calculada por densitometria dos géis de SDS-PAGE (item 3.2.3.5) escaneados e analisados em programa Total Lab.

### 3.2.3.8. Produção de Anticorpos Policlonais Anti-Fibrinogênio de *B. jararaca* em Coelho

O coelho recebeu, por via intramuscular, uma dose do fibrinogênio purificado do plasma da serpente *B. jararaca* (0,5 mL, 50 µg), suspenso em adjuvante Marcol-Montanide (0,5 mL). Após 30 dias, uma amostra de sangue foi coletada da veia marginal auricular para a determinação do título de anticorpos. Em seguida, o coelho recebeu, por via intramuscular, uma dose reforço da proteína purificada com quantidade idêntica. Após mais dois reforços de imunização, o coelho foi anestesiado com tiopental sódico (30 mg/kg), a artéria carótida foi exposta e todo o sangue do animal foi coletado para a purificação de anticorpos.

O soro foi separado através da incubação do sangue a 37° C por 1 hora para a formação do coágulo e centrifugação por 10 minutos a 1200 g e, depois, mantido a -70° C até a sua utilização.

### 3.2.3.9. Determinação do Título de Anticorpos Anti-Fbrinogênio de *B. jararaca* pelo Método Imunoenzimático (ELISA)

O título dos anticorpos anti-fibrinogênio produzidos segundo o item 3.2.3.7. foi determinado utilizando-se o método de ELISA.

Placas de microtitulação de poliestireno (Nalge Nunc) foram sensibilizadas com 100  $\mu\text{L}$  de fibrinogênio de *B. jararaca* (10  $\mu\text{g/mL}$ ) diluído em tampão carbonato/bicarbonato de sódio 0,05 M, pH 9,6, por 18 horas a 4° C, em câmara úmida. Estas foram, então, submetidas a 3 lavagens sucessivas, sendo cada lavagem de 5 minutos, com tampão fosfato de sódio 0,01 M, NaCl 0,15 M, pH 7,4 (PBS) contendo tween 20 0,05 %. Em seguida, foram adicionados 200  $\mu\text{L}$  da solução bloqueadora (leite Molico) 5%, mantendo-se a 37° C por 1 hora. Após um novo ciclo de lavagens, 100  $\mu\text{L}$  do soro anti-fibrinogênio (obtido segundo o item 3.2.3.7) foram adicionados a cada poço, em diluições seriadas (a partir de 1:1000) com tampão de incubação (PBS, pH 7,4, contendo Molico 1%) e incubado a 37° C por duas horas. Após outro ciclo de lavagens, as placas foram incubadas com anti-IgG de coelho conjugada com peroxidase (100  $\mu\text{L}$  por poço) diluído 1:10000 com tampão de incubação, por 1 hora a 37° C. Após lavagens sucessivas, a reação foi revelada pela adição de 100  $\mu\text{L}$  da mistura cromógena mais substrato da enzima (1 mg de orto-fenilendiamino/ mL em tampão citrato 0,2 M pH 5,0, contendo 0,01 % de  $\text{H}_2\text{O}_2$ ). Após 5 minutos de incubação a temperatura ambiente, a reação foi interrompida pela adição de 50  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  30 %. A reação foi acompanhada pela leitura de  $A_{492}$  nm em um espectrofotômetro de placas SpectraMax 190 (Molecular Devices). O título de anticorpos foi determinado pela recíproca da diluição máxima de soro capaz de resultar em uma leitura próxima de 0,100, multiplicada pelo valor da leitura.

#### 3.2.3.10. Western Blotting

Após eletroforese, o gel foi equilibrado por 10 minutos em tampão de transferência (tris 48 mM, glicina 39 mM, metanol 20% e SDS 0.037 %, pH 9.2) a 4° C. A transferência para as membranas de nitrocelulose (Sigma-Aldrich) foi feita a 15 V por 2 horas.

As membranas foram completamente secas em estufa a 37° C por 30 minutos e depois umedecidas em água. Para verificar a eficiência da transferência, as membranas foram coradas com Ponceau S 0,2 % por 10 minutos. As proteínas foram descoradas em

tampão de lavagem (tris 10 mM, NaCl 150 mM, tween 20 0.1 %, pH 7.5). As membranas foram bloqueadas com tampão de bloqueio (leite Molico, tween 20 e solução de lavagem), por 18 horas a 4° C. As membranas foram lavadas com solução de lavagem e incubadas com anticorpos anti-fibrinogênio humano 1:5000 (DiaSorin) e anti-fibrinogênio de *B. jararaca* 1:10000. Após incubação de duas horas em temperatura ambiente, as membranas foram novamente lavadas e o conjugado imunoenzimático (Sigma-Aldrich) foi adicionado (anti-cabra e anti-coelho 1:10000, respectivamente), incubando por mais duas horas em temperatura ambiente. Após três lavagens com solução de lavagem, foi adicionado o substrato cromógeno (3.3'diaminobenzidina, tampão imidazol 0,1 M, CoCl<sub>2</sub> 0,2 M, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30 %) até o aparecimento das proteínas reconhecidas pelos anticorpos, sendo a reação interrompida com lavagens sucessivas de água.

#### 3.2.3.11. Atividade Coagulante dos Venenos de Serpentes

A dose mínima coagulante (DMC) é a menor quantidade de veneno que coagula fibrinogênio ou plasma em 60 segundos a 37° C (THEAKSTON & REID, 1983) e foi determinada utilizando fibrinogênio humano. Assim, 200 µL de fibrinogênio humano (2 mg/mL) foram incubados em banho-maria a 37° C. Após 1 minuto, o veneno das serpentes *C. d. terrificus*, *L. m. rhombeata* E *B. jararaca* (diluído em salina, em concentrações de 1 mg/mL a 0,2 µg/mL) foi adicionado e o tempo para formação do coágulo observado. Foi feita uma curva com os diferentes tempos de coagulação nas diferentes concentrações, possibilitando o cálculo da dose mínima coagulante para cada veneno.

Para testar a atividade coagulante dos diferentes venenos, foram incubados 200 µL de fibrinogênio purificado de *B. jararaca* (2 mg/mL) em banho-maria a 37° C. Após 1 minuto, o veneno das serpentes *C. d. terrificus*, *L. m. rhombeata* ou *B. jararaca* (DMC) foi adicionado e observado se ocorre a formação do coágulo. Esses testes foram feitos em duplicata. Para comparação, os mesmos testes foram feitos utilizando-se trombina 5 U.

### 3.2.3.12. Seqüenciamento da Região Amino-Terminal do Fibrinogênio de *B. jararaca* por Degradação de Edman

A eletroforese foi feita em gel de poliacrilamida 10% em condições reduzidas (presença de  $\beta$ -mercaptoetanol e DTT), segundo item 3.2.3.4. Após a corrida, as proteínas foram transferidas para membrana de PVDF (difluoreto de polivinidileno) (Sigma-Aldrich) a 15 V. Duas horas depois, a membrana foi lavada com água destilada e imediatamente seca em estufa a 37° por 30 minutos. A membrana foi corada com coomassie blue 0,1% em 50% de metanol por 10 minutos e depois descorada com metanol 50 % e ácido acético 10%. Em seguida, a membrana foi lavada várias vezes com água destilada e as bandas correspondentes às cadeias A $\alpha$ , B $\beta$  e  $\gamma$  cortadas. As cadeias foram seqüenciadas utilizando-se seqüenciador automático modelo PPSQ-23 (Schimatzu, Japão) (Departamento de Biofísica, Universidade Federal de São Paulo). As seqüências já descritas para outros animais foram obtidas através do site [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov) e comparadas com as da *B. jararaca* através dos softwares Clustal X e T-Coffee Multiple Sequence Alignment ([www.ebi.ac.uk](http://www.ebi.ac.uk)).

### 3.2.3.13. Espectrometria de Massa (MALDI-TOF)

O fibrinogênio purificado de *B. jararaca* (20  $\mu$ g) foi submetido à eletroforese em gel de poliacrilamida 10 % em condições reduzidas (presença de  $\beta$ -mercaptoetanol e DTT). Após a corrida, as bandas correspondentes às cadeias A $\alpha$ , B $\beta$  e  $\gamma$  foram cortadas do gel, colocadas em um ZipPlate (Millipore) e processadas conforme o manual do fabricante. Assim, as bandas cortadas foram lavadas em solução de bicarbonato de amônio 25 mM e acetonitrila 5 % por 30 minutos e descoradas com solução de bicarbonato de amônio 100 mM e acetonitrila 50 % por 30 minutos, sendo este último processo repetido mais uma vez.

---

O gel de poliacrilamida contendo a proteína de interesse foi desidratado com acetonitrila 100 % por 15 minutos, re-hidratado em 15  $\mu$ L de bicarbonato de amônio 25 mM contendo 100 ng de tripsina (Trypsin Gold-Promega, Madison, WI), e incubado a 30° C por 18 horas.

A resina C<sub>18</sub> presente no ZipPlate foi ativada com 9  $\mu$ L de acetonitrila por 15 minutos a 37° C. Os peptídeos foram removidos do gel de poliacrilamida utilizando-se 180  $\mu$ L de ácido trifluoroacético 0,1 % (TFA) por 30 minutos e, então, ligados à resina através de vácuo fraco. Em seguida, foram lavados duas vezes com 100  $\mu$ L de TFA em vácuo forte. Os peptídeos foram eluídos diretamente em placa de MALDI (PerkinElmer) com matriz de ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxi cinâmico (LaserBiolabs) ( $\alpha$  - CHCA a 10mg/mL) em solução de acetonitrila 50 % e TFA 50 %.

A matriz foi seca em temperatura ambiente para a formação de cristais e, em seguida, a placa de MALDI foi colocada em espectrômetro de massa pro-TOF 2000 MALDI-TOF (PerkinElmer) (Harvard, EUA). O instrumento foi calibrado pelo método de dois pontos de calibração utilizando-se uma mistura de calibração para peptídeos (LaserBiolabs). Foram avaliados os peptídeos com massa molecular entre 750–4500 Da. Os peptídeos foram identificados através do NCBI (National Center for Biotechnology Information, [www.ncbi.nih.gov](http://www.ncbi.nih.gov)), utilizando-se o software ProFound (Universidade de Rockefeller, Nova Iorque).

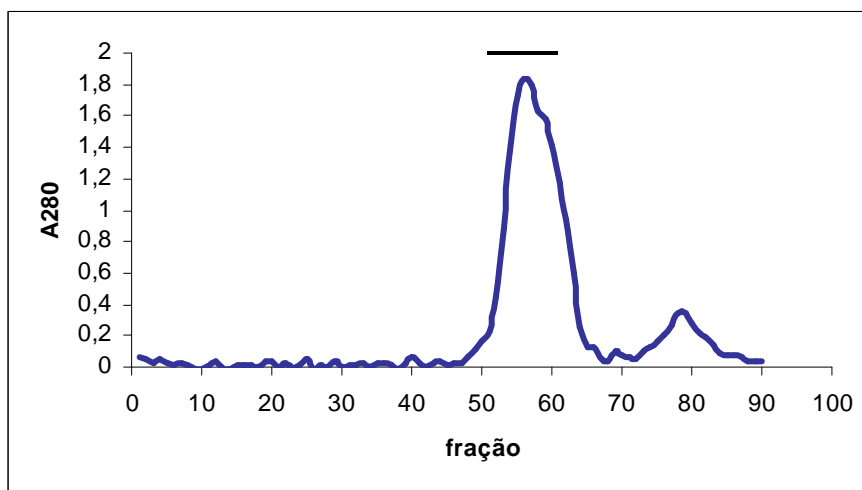
## IV. Resultados

### 4.1. Purificação do Fibrinogênio

As proteínas dependentes de vitamina K (fatores IX, X, VII e II) presentes no plasma da serpente *B. jararaca* foram precipitadas com cloreto de bário enquanto que o fibrinogênio permaneceu no sobrenadante.

Foram feitas duas precipitações com sulfato de amônio, para a retirada de outras proteínas contaminantes, seguidas por diálise por 18 horas a 4° C. A retirada do material precipitado foi feita por centrifugação a 780 g por 15 minutos.

Após a centrifugação, a amostra (v=5 mL) foi aplicada em coluna Sephacryl S300 HR 26/60. Através do cromatograma (Fig. 9), foi possível observar as frações contendo fibrinogênio.



**Figura 9.** Cromatografia de gel filtração. O material contendo fibrinogênio após precipitação com sulfato de amônio foi aplicado em coluna Sephacryl S300 HR 26/60 (GE Healthcare) previamente equilibrada com tampão citrato de sódio 10mM pH 7,0, com fluxo de 1 mL/min e monitorada por A<sub>280</sub>. (—) representa as frações contendo fibrinogênio.



Na tabela 3, é possível observar que a pureza relativa foi de 0,73 mg de fibrinogênio/mg de proteína total. A recuperação obtida foi de 7,5 % e o fator de recuperação foi de 92 vezes.

**Tabela 3.** Purificação do fibrinogênio: cromatografia de gel filtração (Sephacryl S300 HR 26/60).

Amostra	Proteína Total (mg)*	Fibrinogênio Total (mg)**	Pureza Relativa (mg/mg)***	Recuperação (%)	Purificação (vezes)
Plasma	20535	162,7	0,008	100	1
Inicial <sup>1</sup>	107	75,4	0,705	46,3	89
Sephacryl <sup>2</sup>	17	12,2	0,73	7,5	92

\* medido por A<sub>280</sub>

\*\* quantificado pelo método de Ratnoff & Menzie (1951)

\*\*\* mg de fibrinogênio/mg de proteína total

<sup>1</sup> Inicial (precipitado ressuspendido após diálise) da cromatografia de gel filtração

<sup>2</sup> Cromatografia de gel filtração

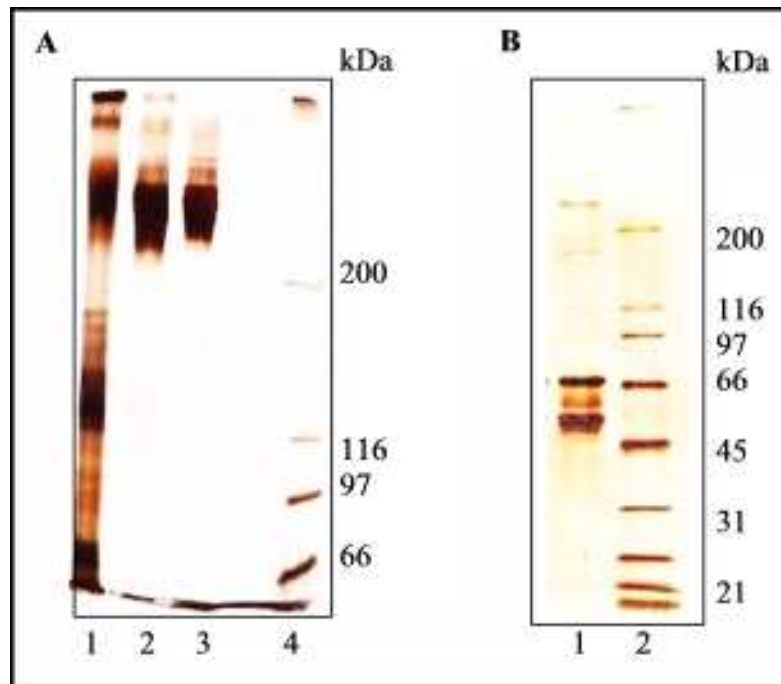
## 4.2. Caracterização do Fibrinogênio

### 4.2.1. Determinação da Coagulabilidade do Fibrinogênio

A coagulabilidade do fibrinogênio de *B. jararaca* obtida foi de cerca de 90 %.

### 4.2.2. Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (SDS-PAGE)

As etapas de purificação do fibrinogênio foram acompanhadas por eletroforese em SDS-PAGE (fig.10).



**Figura 10.** SDS-PAGE (5 % e gradiente 3-15 %) das frações obtidas do processo de purificação do fibrinogênio de *B. jararaca*. (A) SDS-PAGE em condições não reduzidas: (1) plasma de *B. jararaca*; (2) fibrinogênio de *B. jararaca* após precipitações com sulfato de amônio; (3) fibrinogênio de *B. jararaca* após Sephacryl S-300 HR 26/60 e (4) marcador de massa molecular. Foram aplicados 2,5  $\mu\text{g}$  de proteína por canaleta. (B) SDS-PAGE em condições reduzidas: (1) fibrinogênio de *B. jararaca* (4  $\mu\text{g}$  de proteína) e (2) marcador de massa molecular.

Em SDS-PAGE, foi obtida a massa molecular do fibrinogênio em condições não reduzidas, que é de cerca de 370 kDa (fig. 10A). As massas moleculares das cadeias  $\text{A}\alpha$ ,  $\text{B}\beta$  e  $\gamma$ , em condições reduzidas, são de 71, 60 e 55 kDa, respectivamente (fig.10B).

### 4.2.3. Atividade Coagulante do Veneno de Serpentes

O fibrinogênio de *B. jararaca* foi coagulado pela trombina bovina enquanto que nenhum dos venenos testados (das serpentes *C. d. terrificus*, *L. m. rhombeata* e *B. jararaca*) foi capaz de coagulá-lo (Tabela 4). Mesmo assim, quando a trombina foi adicionada ao fibrinogênio previamente incubado com os diferentes venenos de serpentes, ocorreu a formação do coágulo. Porém, o fibrinogênio purificado de *B. jararaca* e humano apresentaram produtos de degradação, quando incubados com veneno de *B. jararaca*, que podem ser observados em SDS-PAGE. Já com veneno de *C. d. terrificus* os fibrinogênios não apresentaram produtos de degradação (Fig. 11).

**Tabela 4.** Atividade Coagulante do Veneno de Serpentes/Trombina bovina sobre o fibrinogênio de *B. jararaca*.

	Trombina bovina (s)*	Veneno <i>Bothrops jararaca</i> (s)**	Veneno <i>Crotalus durissus terrificus</i> (s) ***	Veneno <i>Lachesis muta rhombeata</i> (s)****
Fibrinogênio <i>Bothrops jararaca</i>	23	>600	>600	>600

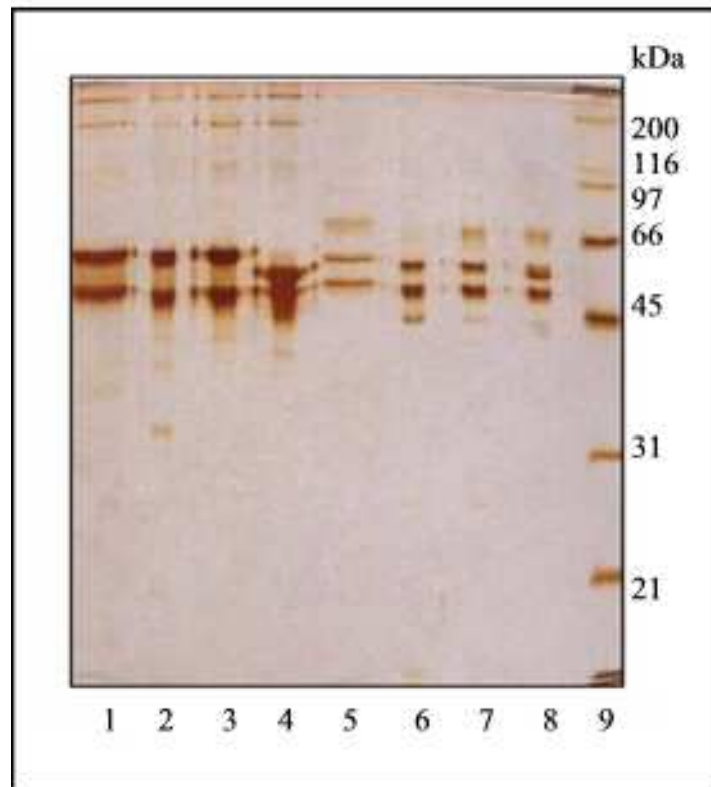
A dose mínima coagulante (DMC) foi definida como a menor quantidade de venenos que coagula uma solução de fibrinogênio ou plasma humano em 60 segundos a 37°C (Theakston & Reid, 1983). Os testes foram feitos em duplicata.

\*Concentração de trombina bovina = 5 U/mL

\*\*DMC = 4.46 µg/mL

\*\*\*DMC = 11.8 µg/mL

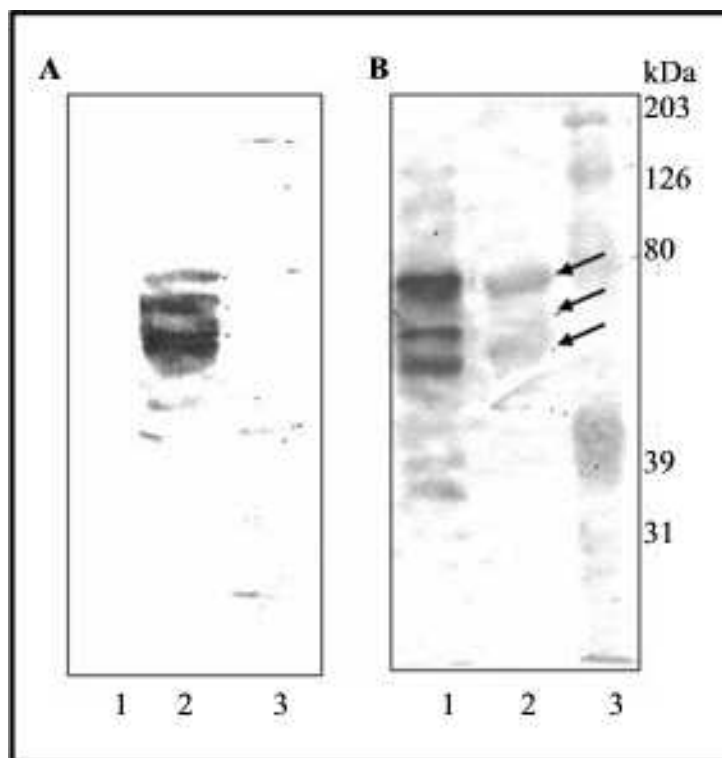
\*\*\*\*DMC = 2.5 µg/mL



**Figura 11.** SDS-PAGE (12%) de fibrinogênio de *B. jararaca* incubado com veneno de serpentes. Fibrinogênio (2 mg/mL) foi incubado com veneno de serpentes (1 mg/mL) em condições reduzidas (presença de  $\beta$ -mercaptoetanol). (1) fibrinogênio de *B. jararaca*; (2) fibrinogênio de *B. jararaca* com veneno de *B. jararaca*; (3) fibrinogênio de *B. jararaca* com veneno de *Crotalus durissus terrificus*; (4) fibrinogênio de *B. jararaca* com trombina bovina; (5) fibrinogênio humano; (6) fibrinogênio humano com veneno de *B. jararaca*; (7) fibrinogênio humano com veneno de *Crotalus durissus terrificus*; (8) fibrinogênio humano com trombina bovina; (9) marcador de massa molecular.

#### 4.2.4. Western Blotting

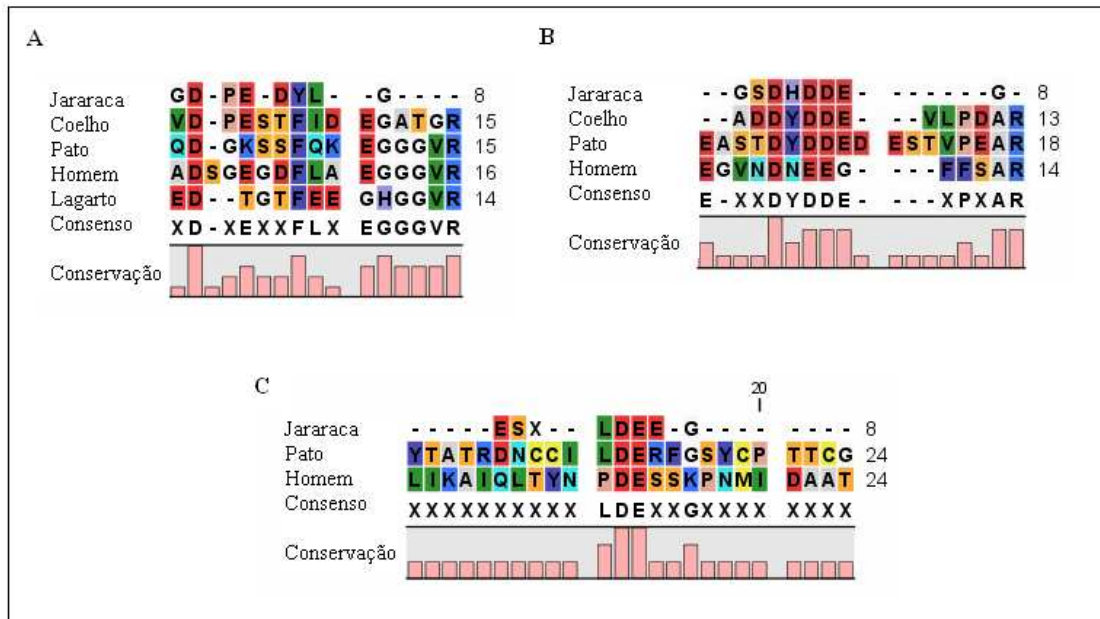
O fibrinogênio de *B. jararaca* foi reconhecido pelos anticorpos anti-fibrinogênio humano enquanto que o fibrinogênio humano não reagiu com os anticorpos anti-fibrinogênio de *B. jararaca* (fig. 12).



**Figura 12.** Western Blotting de fibrinogênio de *B. jararaca* e de humano. As amostras foram aplicadas em gel de poliacrilamida 12% e transferidas para membrana de nitrocelulose. As membranas foram incubadas com anti-fibrinogênio de *B. jararaca* produzido em coelho (A) e anti-fibrinogênio humano produzido em cabra (B). As membranas foram incubadas com IgG anti-coelho e anti-cabra, respectivamente, e reveladas usando substrato cromogênico. (1) Fibrinogênio humano; (2) Fibrinogênio de *B. jararaca*; (3) Marcador de massa molecular. As setas indicam as cadeias A $\alpha$ , B $\beta$  e  $\gamma$  do fibrinogênio.

#### 4.2.5. Seqüenciamento da Região Amino-Terminal do Fibrinogênio de *B. jararaca* por Degradação de Edman

Através do seqüenciamento da região amino-terminal das cadeias polipeptídicas, foram obtidos os oito primeiros aminoácidos de cada cadeia do fibrinogênio de *B. jararaca*. As seqüências foram: GDPEDYLG para a cadeia A $\alpha$ , GSDHDDE para a cadeia B $\beta$  e ESXLDEEG para a cadeia  $\gamma$ . As seqüências foram então comparadas com a de outros animais já descritos, mas não foi possível observar similaridades (Fig. 13).



**Figura 13.** Sequenciamento da região amino-terminal do fibrinogênio de *B. jararaca* por degradação de Edman e comparação com seqüências de outros animais. A) cadeia  $\alpha_1$ , B) cadeia  $\beta$  e C) cadeia  $\gamma$ .

#### 4.2.6. Espectrometria de Massa (MALDI-TOF)

Embora algumas seqüências peptídicas tenham sido observadas, não foi possível obter a seqüência completa do fibrinogênio de *B. jararaca* por espectrometria de massa em MALDI-TOF (Tabela 5).

**Tabela 5.** Identificação dos peptídeos das cadeias do fibrinogênio por MALDI-TOF.

Proteína	Seqüência Peptídica, massa
Cadeia A $\alpha$ do Fibrinogênio	GFPGQDLAGPK, 1531,654
	AGEPGLQGPAGPPGEK, 1849,814
	VGPSGAPGEDGRPGPPGPQGAR, 2011,966
	GFGLPGPSGEPGQQGAPGASGDR, 2191,978
	VGPSGAPGEDGRPGPPGPQGAR, 2011,966
	VVDVDASK, 1220,502
	MLSATPLYCNVHSMNSER, 2191,978
	ALLPQQSYSLAQPLYSPVCINGER, 2691,359
	LPWVNPYMEGATPAIYPFLDSPNK, 3108,388
	SLSCMVHSCSISHAAGR, 1755,819
	SDGVNVTGGCSPQARPAAIR, 2011,966
	TILALAGEGGKPCPPSQALQEHR, 2818,343
	HVLMESTGPAGHCPHLVESVPCEDPMCYSR, 3364,480
Cadeia B $\beta$ do Fibrinogênio	GEAGAQQPNGPSGPAGAR, 1566,732
	AGGAQLGVNQPMGPMGPR, 1810,850
	VGPSGAPGEDGRPGPPGPQGAR, 2011,969
	GEPGDDGPSGAEGPPGPQGLAGQR, 2202,005
	GPPGPAGAPGPQGFQGNPGEPEGEPGVSGPMGPR,3006,389
	AEVDGASFLLK, 1537,691
	GTDYCSVVTVDQTNVK, 2286,980
	CHLLQEVPHGEDLDIIFQDGATK, 3023,362
	LHMLHNQYVLALK, 1967,959
	WILSHEDVILGELLGK, 2210,096
	SAVGSSALSDMISISEKPLAEQDWYHGAIPIR, 3703,708
Cadeia $\gamma$ do Fibrinogênio	IEAEK, 977,378
	ALLELIDSPECLSK, 1918,897
	MVCTYGNQILSLGSLSK, 2201,998
	STEPHLLDTYAPEITK, 2202,987
	NHTSEHFPLGISDNHSLSDFR, 2556,222
	MSEVLGITDDNHVLETFMTK, 2668,200
	AGGAQLGVNQPMGPMGPR, 1810,851
	GLTGPIGPPGPAGANGEK, 1977,862
	VGPSGAPGEDGRPGPPGPQGAR, 2011,971
	GEPGDDGPSGAEGPPGPQGLAGQR, 2201,998
	LQPNLK, 1100,492

---

ILSDTWDQNR, 1246,584  
AVCSTGPLTSMQVIKPNR, 2290,025  
MDLSAHGFIQNQITFLQGSYTR, 2526,213  
CCLLVSEDNLQLSCK, 2168,929  
LGCNGLGFSDLPGKPLAR, 2202,987  
ILQLCGELYDL DASSLQK, 2510,208  
GIPSNNSLDFLDEEYVPLDGTR, 2694,263

---



## V. Discussão

O fibrinogênio é uma glicoproteína plasmática que, em humanos, é constituída por três pares de cadeias polipeptídicas ( $A\alpha$ ,  $B\beta$  e  $\gamma$ ) ligadas por pontes dissulfeto (GENTRY, 2004). O fibrinogênio é uma das proteínas mais importantes do mecanismo de coagulação, sendo encontrado em todos os animais vertebrados, desde peixes ciclostomados até mamíferos e, mesmo entre os invertebrados, é possível observar uma cascata de ativação enzimática seguida de formação de coágulo, como em crustáceos (DOOLITTLE, 1983; 1984; IWANAGA, 1993). Equinodermes, como pepinos do mar, e protocordados, como anfioxos, possuem fragmentos relacionados a um ancestral do fibrinogênio (XU & DOOLITTLE, 1990). Em camarões (*Farfantepenaeus paulensis*), também foi observada uma proteína coagulante que desempenha papel semelhante ao do fibrinogênio (PERAZZOLO *et al.*, 2005).

Em geral, o fibrinogênio tem sido isolado do sangue total usando centrifugações combinadas com crioprecipitação ou precipitações com agentes como etanol, polietileno glicol ou sulfato de amônio (SILVER *et al.*, 1995). O sulfato de amônio é o agente precipitante mais comumente usado em purificações de fibrinogênio, tendo sido utilizado para obtenção de fibrinogênio humano (SIEDENTOP *et al.*, 1985; DURHAM *et al.*, 1987; PARK & CHA, 1993), bovino (MOSHER & BLOUT, 1973) e de salmão (WANG *et al.*, 2000). Já para a separação das proteínas dependentes de vitamina K (fatores II, VII, IX e X, além das proteínas C e S) das demais proteínas presentes no plasma, a adsorção com cloreto de bário é bastante empregada (BAJAJ *et al.*, 1981).

Para obtenção do fibrinogênio de *B. jararaca*, foi feita adsorção com cloreto de bário como passo inicial, no qual o fibrinogênio permaneceu no sobrenadante. Em seguida, foram feitas precipitações com sulfato de amônio, como já descrito na literatura para purificação de fibrinogênio de outros animais, seguidas de cromatografia de gel filtração. Este processo de purificação mostrou melhores resultados quando comparado aos outros processos testados anteriormente, que apresentaram baixo fator de purificação e recuperação de atividade. Nesses processos anteriores, foram feitas precipitações com etanol e cromatografias de troca iônica em diversas colunas nas quais

houve perda da proteína, que não se ligou completamente às resinas, sendo eluídas (dados não mostrados). Sendo assim, o método utilizado neste trabalho foi o mais simples, rápido e eficiente, obtendo um bom resultado e alto grau de pureza, além de um fibrinogênio coagulável e funcional. Esta coagulabilidade obtida do fibrinogênio purificado foi semelhante à observada para fibrinogênios humano (LY *et al.*, 1972; BROSSTAD & GODAL, 1977) e de salmão (MANSETH *et al.*, 2004).

A massa molecular do fibrinogênio purificado da *B. jararaca* foi de cerca de 370 kDa, sendo semelhante à massa molecular do fibrinogênio de lampréias, bovinos e humanos que é de 340 kDa (DOOLITTLE, 1976). Porém, foi menor que a de fibrinogênio de salmão, com 410 kDa (MANSETH *et al.*, 2004) que, por sua vez, é bastante semelhante à massa molecular do fibrinogênio de invertebrados como lagosta, de cerca de 420kDa (FULLER & DOOLITTLE, 1971).

Em condições reduzidas, as massas moleculares das cadeias A $\alpha$ , B $\beta$  e  $\gamma$  obtidas do fibrinogênio de *B. jararaca* foram de 71, 60 e 55 kDa, respectivamente, sendo similares às do fibrinogênio humano e bovino (64, 56 e 47 kDa) (MCKEE *et al.*, 1966; PIZZO *et al.*, 1972) enquanto que, as massas moleculares obtidas para as três cadeias de fibrinogênio de salmão foram de 90-110, 55 e 50 kDa (MANSETH *et al.*, 2004). Variações entre as massas moleculares da cadeia A $\alpha$  são descritas na literatura, enquanto que as massas moleculares das cadeias B $\beta$  e  $\gamma$  permanecem constantes (DOOLITTLE, 1973).

Os répteis apresentam diferenças no mecanismo da coagulação em relação aos mamíferos, possuindo tempo de coagulação prolongado, mas o passo de conversão do fibrinogênio em fibrina é muito semelhante (LEWIS, 1972; DENSON, 1976; KUBALEK *et al.*, 2002). A concentração plasmática do fibrinogênio de *B. jararaca* (2,99 mg/mL) (NAHAS *et al.*, 1973) é semelhante à de mamíferos assim como a da serpente *Python molurus bivittatus* (RATNOFF *et al.*, 1990). Contudo, a ausência ou deficiência de alguns fatores da coagulação sangüínea como os fatores VIII e IX em alguns répteis, parece tornar a via intrínseca menos eficiente (DIDISHEIM *et al.*, 1959; FANTL, 1961). Além disso, a presença de anticoagulantes pode contribuir para uma coagulação mais lenta nesses animais.

HACKETT e HANN (1967) descreveram a presença de um anticoagulante natural no sangue do lagarto *Trachydosaurus rugosus rugosus*. TANAKA-AZEVEDO e col. (2003)

isolaram um inibidor da atividade coagulante de trombina (BjI) presente no plasma de *B. jararaca*, que também prolonga a via intrínseca da coagulação sangüínea. Além de inibir a trombina, o BjI também interage imunologicamente com duas proteínas do veneno de *B. jararaca*.

O fibrinogênio de *B. jararaca* é coagulável pela trombina bovina. Há trabalhos que demonstram que a trombina bovina é eficiente na coagulação de plasmas de outras serpentes, indicando que a atividade da trombina de serpentes é similar à encontrada no plasma de mamífero (JOSEPH *et al.*, 2002).

As enzimas trombina-símile encontradas no veneno de diversas serpentes clivam o fibrinogênio, liberando os fibrinopeptídeos e formando fibrina, o que pode acarretar, *in vivo*, o consumo de fibrinogênio. Esse consumo pode induzir à incoagulabilidade sangüínea (SANO-MARTINS & SANTORO, 2003). Entretanto, os venenos de *B. jararaca*, *C. durissus terrificus* e *L. muta rhombeata* não foram capazes de coagular o fibrinogênio purificado de *B. jararaca*, confirmando que o fibrinogênio é responsável por esse efeito inibitório sobre a atividade coagulante do veneno botrópico, como já sugerido por NAHAS e col. (1983). Além disso, ao adicionar trombina ao fibrinogênio previamente incubado com os diferentes venenos de serpentes, houve a formação do coágulo, indicando que os sítios das cadeias A $\alpha$  e B $\beta$ , envolvidos na proteólise limitada induzida pela trombina, foram preservados. Porém, o fibrinogênio purificado de *B. jararaca* e o humano incubados com veneno de *B. jararaca*, quando observados em SDS-PAGE, apresentaram produtos de degradação devido à ação proteolítica deste veneno. Como esperado, os fibrinogênios incubados com trombina também apresentaram produtos de degradação, pois houve formação de fibrina através de proteólise limitada. Por outro lado, o mesmo não foi observado com veneno de *C. d. terrificus*, que não possui atividade proteolítica.

Os venenos de serpentes podem afetar a hemostasia de mamíferos, ativando algumas proteínas da cascata de coagulação, o que pode levar a um consumo de fibrinogênio e, conseqüentemente, à incoagulabilidade sangüínea (LEE, 1979; MARKLAND, 1998; SANO-MARTINS & SANTORO, 2003). Contudo, alguns mamíferos e serpentes apresentam resistência à atividade tóxica dos venenos de serpentes, apresentando no sangue proteínas que inibem componentes do veneno (DOMONT *et al.*,

1991; FORTES-DIAS *et al.*, 1991; THURN *et al.*, 1993). SANTORO e SANO-MARTINS (1993) verificaram que a enzima trombina-símile de *B. jararaca* tem ação coagulante insignificante sobre o fibrinogênio de coelho. Há também diversas proteínas isoladas do plasma de gambás que fornecem proteção contra o envenenamento pela *B. jararaca* (PERALES *et al.*, 1986; FARAH *et al.*, 1996; NEVES-FERREIRA *et al.*, 2000). Enzimas trombina-símile de venenos de diversas serpentes não foram capazes de coagular também plasmas de diferentes serpentes. O plasma da serpente *Crotalus viridis* não coagula com arвина, enzima trombina-símile da serpente *Agkistrodon rhodostoma* (*Calloselasma rhodostoma*) (DENSON, 1976) assim como os plasmas das serpentes *Pseudonaja textilis*, *Python reticulatus*, *Crotalus atrox* e *Notechis scutatus* (JOSEPH *et al.*, 2002) e da iguana *Iguana iguana* não coagulam com batroxobina (enzima trombina-símile isolada da serpente *B. atrox*) (KUBALEK *et al.*, 2002). Há vários mecanismos de resistência de serpentes à toxicidade de seus venenos, sendo alguns já elucidados (JOSEPH *et al.*, 2002). Há diversos inibidores de proteinases presentes no plasma de *B. jararaca*, como uma proteína isolada que inibe especificamente metaloproteases do veneno de *B. jararaca*, neutralizando a atividade hemorrágica (CHUDZINSKI, 1989; TANIZAKI *et al.*, 1991). De fato, seria extremamente desfavorável e excepcional para a sobrevivência desses animais se o sangue das serpentes fosse coagulado pelo seu próprio veneno (DENSON, 1976).

Os anticorpos anti-fibrinogênio humano reconheceram as três cadeias do fibrinogênio de *B. jararaca* enquanto que, o fibrinogênio humano não reagiu com os anticorpos anti-fibrinogênio de *B. jararaca*. Os nossos resultados sugerem que o fibrinogênio humano possui epítomos em comum com o fibrinogênio de *B. jararaca*, indicando a presença de regiões conservadas nessas moléculas, o que já seria esperado, pois o fibrinogênio é encontrado mesmo em animais primitivos (DOOLITTLE, 1976).

Os anticorpos anti-fibrinogênio de *B. jararaca*, produzidos de forma diferente do humano que foi adquirido comercialmente (Sigma-Aldrich), provavelmente reconheceram apenas os epítomos majoritários de tal forma que não é possível afirmar se há alguns epítomos em comum com fibrinogênio humano. Estudo semelhante realizado em salmão, mostrou que os anticorpos anti-fibrinogênio humano reconhecem apenas a cadeia  $\gamma$  do fibrinogênio de salmão (MANSETH *et al.*, 2004).

O fibrinopeptídeo A, em humanos, é constituído de 16 resíduos de aminoácidos que são liberados das cadeias A $\alpha$  após clivagem proteolítica das ligações Arg16-Gly17 pela trombina. A seqüência amino-terminal entre Asp7 e Arg16 é altamente conservada entre as espécies de mamíferos, enquanto que os resíduos 1 a 6 apresentam grande variabilidade. Em particular, Phe8 é encontrado em quase todos os vertebrados, desde lagartos até o homem (BLOMBÄCK *et al.*, 1969). Contudo, não foi possível observar esse aminoácido na seqüência obtida do fibrinogênio de *B. jararaca*.

Os oito primeiros aminoácidos de cada cadeia do fibrinogênio de *B. jararaca* foram obtidos através do seqüenciamento da região amino-terminal das cadeias polipeptídicas por degradação de Edman. As seqüências foram então comparadas com a de outros animais já descritos, mas, devido ao pequeno número de aminoácidos obtidos, não foi possível observar similaridades.

Através de espectrometria de massa foram observadas algumas seqüências peptídicas, mas não foi possível obter a seqüência completa do fibrinogênio de *B. jararaca*. Como a espectrometria de massa é uma técnica que determina a relação massa/carga (m/z) de seqüências peptídicas, que é depois comparada em banco de dados com as já descritas, a ausência de informações a respeito do fibrinogênio de répteis nos bancos de dados utilizados dificultou essa análise comparativa. Assim, não foi possível comparar as pequenas seqüências peptídicas do fibrinogênio de *B. jararaca* com as de outros animais, podendo existir similaridades entre os mesmos, que não foram observadas.

Em humanos, os estudos a respeito das seqüências do fibrinogênio são intensos, sendo já observado que a seqüência da cadeia B $\beta$  de humanos apresenta 92 % de identidade com a de rato e 62 % com a de lampréia. A cadeia  $\gamma$  apresenta identidade semelhante, sendo de 88 % com a de rato e 62 % com a de lampréia (DOOLITTLE, 1992). Quando essas cadeias foram comparadas com as de bovino, apresentaram identidade superior a 80 %, embora, entre as cadeias A $\alpha$ , essa identidade seja de cerca de 50 % (MURAKAWA *et al.*, 1993).

---

## VI. Conclusões

O método utilizado na purificação do fibrinogênio de *B. jararaca* foi muito eficiente, apresentando alto grau de pureza e um fibrinogênio coagulável e funcional.

Devido às suas características bioquímicas e funcionais, o fibrinogênio de *B. jararaca* e de mamíferos apresentam similaridades:

- ✓ quanto às massas moleculares;
- ✓ quanto à coagulabilidade pela trombina.

Contudo, possuem características distintas:

- ✓ em relação à imunodeteção, pois os anticorpos anti-fibrinogênio de *B. jararaca* produzidos em coelhos não reconheceram o fibrinogênio humano;
- ✓ em relação à atividade coagulante induzida pelos venenos das serpentes *B. jararaca*, *C. durissus terrificus* e *L. muta rhombeta*, pois o fibrinogênio purificado não foi coagulado.

Assim, a serpente *B. jararaca* apresenta diversos inibidores em seu plasma que a protegem contra um possível auto-envenenamento. Além disso, a molécula de fibrinogênio dessa espécie possui a propriedade de não permitir a formação de coágulo pela ação coagulante das enzimas trombina-símile de seu veneno.

## VII. Resumo

O fibrinogênio é uma glicoproteína presente no plasma composta por duas subunidades idênticas formadas por três pares de cadeias polipeptídicas ( $A\alpha$ ,  $B\beta$  e  $\gamma$ ), interligadas por pontes dissulfeto. A trombina cliva o fibrinogênio, liberando os fibrinopeptídeos A e B, formando fibrina e, conseqüentemente, o coágulo. Esse trabalho descreve a purificação e caracterização do fibrinogênio a partir do plasma da serpente *Bothrops jararaca* (*B. jararaca*). O fibrinogênio purificado foi obtido através de adsorção com cloreto de bário, precipitações com sulfato de amônio e cromatografia de gel filtração. O fibrinogênio de *B. jararaca* apresentou massa molecular de 370 kDa em condições não reduzidas e, em condições reduzidas, apresentou massas moleculares de 71, 60 e 55 kDa, similares às cadeias  $A\alpha$ ,  $B\beta$  e  $\gamma$  dos fibrinogênio humano e bovino (64, 56 e 47 kDa, respectivamente). Através do seqüenciamento da região amino-terminal das cadeias polipeptídicas por degradação de Edman, foram obtidos os oito primeiros aminoácidos de cada cadeia do fibrinogênio de *B. jararaca*. As seqüências foram: Gly-Asp-Pro-Glu-Asp-Tyr-Leu-Gly para a cadeia  $A\alpha$ , Gly-Ser-Asp-His-Asp-Asp-Glu para a cadeia  $B\beta$  e Glu-Ser-X-Leu-Asp-Glu-Glu-Gly para a cadeia  $\gamma$ . As seqüências foram então comparadas com a de outros animais já descritos (NCBI-National Center for Biotechnology Information, [www.ncbi.nih.gov](http://www.ncbi.nih.gov)), mas devido ao pequeno número de aminoácidos obtidos não foi possível observar similaridades. Através de espectrometria de massa (MALDI-TOF) foram observadas algumas seqüências peptídicas, mas não foi possível obter a seqüência completa do fibrinogênio de *B. jararaca*. Essas seqüências não apresentaram homologia significativa com outras seqüências já descritas. O fibrinogênio de *B. jararaca* foi coagulado pela trombina bovina enquanto que os venenos das serpentes *B. jararaca*, *Crotalus durissus terrificus* e *Lachesis muta rhombeata* não foram capazes de induzir a formação de coágulo. Além disso, os anticorpos anti-fibrinogênio de *B. jararaca* produzidos em coelho não reconheceram o fibrinogênio humano. Contudo, os anticorpos anti-fibrinogênio humano reconheceram o fibrinogênio de *B. jararaca*. Assim, mesmo apresentando similaridades entre os fibrinogênios de *B. jararaca* e de mamíferos, eles possuem comportamentos distintos,

---

podendo sugerir que a *B. jararaca* apresenta uma molécula de fibrinogênio diferente do humano para evitar um possível auto-envenenamento.



## VIII. Abstract

Fibrinogen is a plasma glycoprotein that is composed of two sets of three non-identical polypeptide chains ( $A\alpha$ ,  $B\beta$  and  $\gamma$ ) which are covalently linked by disulfide bonds. Thrombin cleaves fibrinogen to form fibrin and, consequently, the fibrin clot. This work describes the purification and characterization of fibrinogen from *Bothrops jararaca* (*B. jararaca*) snake plasma. Purified fibrinogen was obtained by barium chloride adsorption, ammonium sulfate precipitation and gel filtration chromatography. *B. jararaca* fibrinogen showed a molecular mass of 370 kDa in non-reducing conditions, similar to human and bovine fibrinogen with 340 kDa. Reduced fibrinogen showed three chains of 71, 60 and 55 kDa, which are similar to the molecular masses of human and bovine  $A\alpha$ ,  $B\beta$  and  $\gamma$  fibrinogen chains (64, 56 and 47 kDa, respectively). *B. jararaca* fibrinogen was clotted by bovine thrombin, however, *B. jararaca*, *Crotalus durissus terrificus* and *Lachesis muta rhombeata* venoms were not able to induce fibrin formation. The N-terminal sequence of *B. jararaca* fibrinogen chains from PVDF membranes showed only the first eight amino acids residues from each chain. The N-terminal sequence was Gly-Asp-Pro-Glu-Asp-Tyr-Leu-Gly for  $A\alpha$  chain, Gly-Ser-Asp-His-Asp-Asp-Glu for  $B\beta$  chain, and Glu-Ser-X-Leu-Asp-Glu-Glu-Gly for  $\gamma$  chain. The *B. jararaca* fibrinogen chains N-terminal sequences were compared to other animal N-terminal sequences previously described. However, due to low signal detection during Edman degradation, the sequence results were not sufficient to provide an accurate Blast search identity (NCBI-National Center for Biotechnology Information, [www.ncbi.nih.gov](http://www.ncbi.nih.gov)). Mass spectrometry (MALDI-TOF) analysis provides some peptide sequences that did not present the complete sequences. Besides, anti-*B. jararaca* fibrinogen produced in rabbit did not recognize human fibrinogen while anti-human fibrinogen recognized *B. jararaca* fibrinogen. Thus, despite *B. jararaca* fibrinogen presents a molecular mass similar to human fibrinogen, the former shows distinctive features, which protect *B. jararaca* snakes from a fortuitous ingress of snake venom proteins into snake circulation, which could cause a self-enuvenomation.

---

## IX. Apêndice A – Abreviaturas

a: fator ativado

A<sub>280</sub>: absorvância a 280 nm

*B. jararaca*: *Bothrops jararaca*

BLAST: *Basic Local Alignment Search Tool*

CaCl<sub>2</sub>: cloreto de cálcio

*C. d. terrificus*: *Crotalus durissus terrificus*

CoCl<sub>2</sub>: cloreto de cobalto

DAB: 3,3-diaminobenzidina

DTT: ditioneitol

εACA: ácido epsílon amino capróico

ELISA: *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*

g: aceleração da gravidade

HCl: ácido clorídrico

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: peróxido de hidrogênio

H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>: ácido sulfúrico

kDa: kilodalton

*L. m. rhombeata*: *Lachesis muta rhombeata*

mA: miliampère

NaCl: cloreto de sódio

Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>: carbonato de sódio

NaOH: hidróxido de sódio

NCBI: National Center Biotechnology Information

NH<sub>4</sub>OH: hidróxido de amônio

nm: nanômetro

N-terminal: aminoterminal

PAGE: eletroforese em gel de poliacrilamida

PBS: tampão fosfato de sódio

PVDF: difluoreto de polivinidileno

SDS: dodecil sulfato de sódio

TEMED: N, N, N', N'Tetrametiletenodiamina

Tris: tris (hidroximetil)-aminometano

---

**X. Apêndice B - Aminoácidos**

---

Aminoácido	Nomes Abreviados	
Glicina	Gly	G
Alanina	Ala	A
Valina	Val	V
Leucina	Leu	L
Isoleucina	Ile	I
Prolina	Pro	P
Fenilalanina	Phe	F
Tirosina	Tyr	Y
Triptofano	Trp	W
Serina	Ser	S
Treonina	Thr	T
Cisteína	Cys	C
Metionina	Met	M
Asparagina	Asn	N
Glutamina	Gln	Q
Aspartato	Asp	D
Glutamato	Glu	E
Lisina	Lys	K
Arginina	Arg	R
Histidina	His	H

---

---

## XI. Referências Bibliográficas

AMARAL, A. **Serpentes do Brasil**. São Paulo: Ed. Melhoramentos e ed. Universidade de São Paulo. 1976

ANDRIEUX, A.; HUDRY-CLERGEON, G.; RYCKEWAERT, J. J.; CHAPEL, A.; GINSBERG, M. H.; PLOW, E. F.; MARGUERIE, G. Amino acid sequences in fibrinogen mediating its interaction with its platelet receptor, GPIIb/IIIa. **The Journal of Biological Chemistry**, v.264, n.16, Jun 5, p.9258-9265. 1989.

BAJAJ, S. P.; RAPAPORT, S. I.; PRODANOS, C. A simplified procedure for purification of human prothrombin, factor IX and factor X. **Preparative Biochemistry**, v.11, n.4, p.397-412. 1981.

BERNDT, M. C.; WARD, C. M.; , de LUCA, M.; FACEY, D. A.; COSTALDI, P. A.; HARRIS, S. J.; ANDREWS, R. K. The molecular mechanism of platelet adhesion. **Australian and New Zealand Journal of Medicine**, v.25, n.6, Dec, p.822-830. 1995.

BLOMBÄCK, B. Studies on fibrinogen: its purification and conversion into fibrin. **Acta Physiologica Scandinavica Supplementum**, v.43, n.148, p.1-51. 1958.

BLOMBÄCK, B.; BLOMBÄCK, M.; NILSSON, I. M. Coagulation studies on "Reptilase", an extract of the venom from *Bothrops jararaca*. **Thrombosis et Diathesis Haemorrhagica**, v.1, n.1, p.76-86. 1958.

BLOMBÄCK, B.; BLOMBÄCK, M.; OLSSON, P.; SVENDSEN, L.; ABERG, G. Synthetic peptides with anticoagulant and vasodilating activity. **Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation Supplementum**, v.107, p.59-61. 1969.

BLUM, H.; GROSS H. J.; BAIER, H. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. **Electrophoresis**, v.8, p.93-99. 1987.

BROSOVIC, M. **Investigation of haemostasis**. Edinburgh: Churchill Livingstone. 1991. 267-278 p. (Practical Haematology)

BROSSTAD, F. & GODAL, H. C. Qualitative changes in fibrinogen following exposure to agents used for preparation of fibrin monomers. **Haemostasis**, v.6, n.3, p.149-156. 1977.

BROWN, L. F.; LANIR N., MCDONAGH, J.; TOGNAZZI, K.; DVORAK A. M.; DVORAK, H. F. Fibroblast migration in fibrin gel matrices. **The American Journal of Pathology**, v.142, n.1, Jan, p.273-283. 1993.

CHEN, R. & DOOLITTLE, R. F. Identification of the polypeptide chains involved in the cross-linking of fibrin. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.63, n.2, Jun, p.420-427. 1969.

- CHUDZINSKI, A. M.; SAMPAIO, M. U.; OLIVA, M. L.; SAMPAIO, C. A. A *Bothrops jararaca* plasma cysteine-proteinase inhibitor related to mammalian kininogen. **Brazilian Journal of Medicine and Biological Research**. v. 22, n.8, p.945-948. 1989.
- COLLEN, D. The plasminogen (fibrinolytic) system. **Thrombosis and Haemostasis**, v.82, n.2, Aug, p.259-70. 1999.
- DAHLBACK, B. Blood coagulation. **Lancet**, v.355, n.9215, May 6, p.1627-1632. 2000.
- DAVIE, E. W.; FUJIKAWA, K.; KISIEL, W. The coagulation cascade: initiation, maintenance, and regulation. **Biochemistry**, v.30, n.43, Oct 29, p.10363-10370. 1991.
- DENSON, K. W. The clotting of a snake (*Crotalus viridis helleri*) plasma and its interaction with various snake venoms. **Thrombosis and Haemostasis**, v.35, n.2, Apr 30, p.314-323. 1976.
- DIDISHEIM, P.; HATTORI K.; LEWIS, J. H. Hematologic and coagulation studies in various animal species. **The Journal Laboratory and Clinical Medicine**, v.53, p.866-875. 1959.
- DOMONT, G. B.; PERALES, J.; MOUSSATCHE, H. Natural anti-snake venom proteins. **Toxicon**, v.29, n.10, p.1183-1194. 1991.
- DOOLITTLE, R. F. Structural aspects of the fibrinogen to fibrin conversion. **Advances in Protein Chemistry**, v.27, p.1-109. 1973.
- DOOLITTLE, R. F. The evolution of vertebrate fibrinogen. **Federation Procedure**, v.35, p.2145-2149. 1976.
- DOOLITTLE, R. F. The structure and evolution of vertebrate fibrinogen. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v.408, Jun 27, p.13-27. 1983.
- DOOLITTLE, R. F. A detailed consideration of a principal domain of vertebrate fibrinogen and its relatives. **Protein Science**, v.1, n.12, Dec, p.1563-1577. 1992.
- DOOLITTLE, R. F. Fibrinogen and Fibrin. In: A. F. Bloom, Dp; Thomas Dp; Tuddenham Egd (Ed.). **Thombosis and haemostasis**. London: Churchill Livingstone. Fibrinogen and Fibrin, p.491-521. 1994.
- DURHAM, L. H.; WILLATT, D. J.; YUNG, M. W.; JONES, I.; STEVENSON, P. A.; RAMADAN, M. F. A method for preparation of fibrin glue. **The Journal of Laryngology and Otology**, v.101, n.11, Nov, p.1182-1186. 1987.
- ERNST, E. & RESCH, K. L. Fibrinogen as a cardiovascular risk factor: a meta-analysis and review of the literature. **Annals of Internal Medicine**, v.118, n.12, Jun 15, p.956-963. 1993.

- FANTL, P. A. A comparative study of blood coagulation in vertebrates. **The Australian Journal of Experimental Biology**, v.39, p.403-412. 1961.
- FARAH, M. F.; ONE, M.; NOVELLO, C. J.; TOYAMA, M. H.; PERALES, J.; MOUSSATCHE, H.; DOMONT G. B.; OLIVEIRA B.; MARANGONI, S. Isolation of protein factors from opossum (*Didelphis albiventris*) serum which protect against Bothrops jararaca venom. **Toxicon**, v.34, n.9, Sep, p.1067-1071. 1996.
- FARRELL, D. H.; THIAGARAJAN, P.; CHUNG, D, W.; DAVIE, E. W. Role of fibrinogen alpha and gamma chain sites in platelet aggregation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.89, n.22, Nov 15, p.10729-10732. 1992.
- FOLSOM, A. R.; QAMHIEH, H. T.; FLACK, J. M.; HILNER, J. E.; LIU, K.; HOWARD, B. V.; TRACY, R. P. Plasma fibrinogen: levels and correlates in young adults. The Coronary Artery Risk Development in Young Adults (CARDIA) Study. **American Journal of Epidemiology**, v.138, n.12, Dec 15, p.1023-1036. 1993.
- FORTES-DIAS, C. L.; FONSECA, B. C.; KOCHVA, E.; DINIZ, C. R. Purification and properties of an antivenom factor from the plasma of the South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*). **Toxicon**, v.29, n.8, p.997-1008. 1991.
- FRENKEL, E.; DUKSIN, C.; HERMAN, A.; SHERMAN, D. J. Congenital hypofibrinogenemia in pregnancy: report of two cases and review of the literature. **Obstetrical and Gynecological Survey**, v.59, n.11, Nov, p.775-779. 2004.
- FROST, C. L.; NAUDÉ, R. J.; OELOFSEN, W.; JACOBSON, B. Comparative blood coagulation studies in the ostrich. **Immunopharmacology**, v.45, n.1-3, Dec, p.75-81. 1999.
- FULLER, G. M. & DOOLITTLE, R. F. Studies of invertebrate fibrinogen. I. Purification and characterization of fibrinogen from the spiny lobster. **Biochemistry**, v.10, n.8, Apr 13, p.1305-1311. 1971.
- FUNASA. Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos: 112 p. 2001.
- FURIE, B. & FURIE, B. C. The molecular basis of blood coagulation. **Cell**, v.53, n.4, May 20, p.505-518. 1988.
- FURIE, B. & FURIE, B. C. Molecular and cellular biology of blood coagulation. **The New England Journal of Medicine**, v.326, n.12, Mar 19, p.800-806. 1992.
- GABAY, C. & KUSHNER, I. Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. **The New England Journal of Medicine**, v.340, n.6, Feb 11, p.448-454. 1999.
- GENTRY, P. A. Comparative aspects of blood coagulation. **Veterinary Journal**, v.168, n.3, Nov, p.238-251. 2004.

GREENBERG, C. S. & ORTHNER, C.L. Blood Coagulation and Fibrinolysis. In: G. R. F. Lee, J.; Lukens, J.; Greer, J.P.; Rodgers, G.M. (Ed.). **Wintrobe Clinical Hematology**. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins, v.1. Blood Coagulation and Fibrinolysis, p.684-764. 1998.

HACKETT, E. & HANN, C. Slow clotting of reptile bloods. **Journal of Comparative Pathology**, v.77, n.2, Apr, p.175-180. 1967.

HAWIGER, J.; KLOCZEWIAK, M.; BEDNAREK, M. A.; TIMMONS, S. Platelet receptor recognition domains on the alpha chain of human fibrinogen: structure-function analysis. **Biochemistry**, v.28, n.7, Apr 4, p.2909-2914. 1989.

HOFFMAN, R.; BENZ, E. J.; SHATTIL, S. J.; FURIE, B.; COHEN, H. J.; SILBERSTEIN, L. E.; MCGLAVE, P. **Hematology: basic principles and practice**. Philadelphia: Elsevier. p. 2821. 2005.

HURLET-JENSEN, A.; CUMMINS, H. Z.; NOSSEL, H. L.; LIU, C. Y. Fibrin polymerization and release of fibrinopeptide B by thrombin. **Thrombosis Research**, v.27, n.4, Aug 15, p.419-427. 1982.

HUTTON, R. A. & WARREL, D. A. Action of snake venom components on the haemostatic system. **Blood Reviews**, v.7, n.3, Sep, p.176-189. 1993.

INBAL, A. & MUSZBEK, L. Coagulation factor deficiencies and pregnancy loss. **Seminars on Thrombosis and Hemostasis**, v.29, n.2, Apr, p.171-174. 2003.

IWANAGA, S. Primitive coagulation systems and their message to modern biology. **Thrombosis and Haemostasis**, v.70, n.1, Jul 1, p.48-55. 1993.

JACKSON, S. P. The growing complexity of platelet aggregation. **Blood**, v.109, n.12, Jun 15, p.5087-5095. 2007.

JAGADEESWARAN, P. & SHEEHAN, J. P. Analysis of blood coagulation in the zebrafish. **Blood Cells, Molecules and Diseases**, v.25, n.3-4, Jun-Aug, p.239-249. 1999.

JAKOBSEN, E. & KIERULF, P. A modified b-alanine precipitation procedure to prepare fibrinogen free of antithrombin-III and plasminogen. **Thrombosis Research**, v.3, p.145-159. 1973.

JANSZKY, B. The solubility of fibrin clots produced by thrombin and by snake venom. **Science**, v.112, n.2902, Aug 11, p.173-174. 1950.

JIANG, Y. & DOOLITTLE, R. F. The evolution of vertebrate blood coagulation as viewed from a comparison of puffer fish and sea squirt genomes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.100, n.13, Jun 24, p.7527-7532. 2003.

JOSEPH, J. S.; CHUNG, M. C. M.; MIRTSCHIN, P. J.; KINI, R. M. Effect of snake venom procoagulants on snake plasma: implications for the coagulation cascade of snakes. **Toxicon**, v.40, n.2, Feb, p.175-183. 2002.

KOBAYASHI, T.; ASAHINA, T.; MAEHARA, K.; ITOH, M.; KANAYAMA, N.; TERAOKA, T. Congenital afibrinogenemia with successful delivery. **Gynecologic and Obstetric Investigation**, v.42, n.1, p.66-69. 1996.

KUBALEK, S.; MISCHKE, R.; FEHR, M. Investigations on blood coagulation in the green iguana (*Iguana iguana*). **Journal of Veterinary Medicine A: Physiology, Pathology and Clinical Medicine**, v.49, n.4, May, p.210-216. 2002.

KONIGSBERG, W. Reduction of disulfide bonds in proteins with dithiothreitol. **Methods in Enzymology**. v.25, p. 185-188. 1972.

KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N. **Robbins & Cotran's Pathologic basis of disease**. Philadelphia: Elsevier. p.1552. 2004

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v.227, n.259, Aug 15, p.680-685. 1970.

LANGUINO, L. R.; DUPERRAY, A.; JOGANIC, K. J.; FORNARO, M.; THORNTON, G.B.; ALTIERI, D. C. Regulation of leukocyte-endothelium interaction and leukocyte transendothelial migration by intercellular adhesion molecule 1-fibrinogen recognition. **National Academy of Sciences of United States of America**, v.92, n.5, Feb 28, p.1505-1509. 1995.

LAUDANO, A. P. & DOOLITTLE, R. F. Synthetic peptide derivatives that bind to fibrinogen and prevent the polymerization of fibrin monomers. **National Academy of Sciences of United States of America**, v.75, n.7, Jul, p.3085-3089. 1978.

LEE, C. Y. & LEE, S.Y. Cardiovascular effects of snake venoms. In: C. Y. Lee (Ed.). **Snake Venoms, Handbook of Experimental Pharmacology**. Berlin: Springer-Verlag, v.52, 1979. Cardiovascular effects of snake venoms, p.11-29

LEWIS, J. H. Comparative hemostasis: studies on elasmobranchs. **Comparative Biochemistry and Physiology A: comparative physiology**, v.42, n.1, May 1, p.233-240. 1972.

LY, B.; GODAL, H. C.; KIERULF, P. Thrombin clotting time--a more sensitive indicator of denatured fibrinogen than clottability. **Haemostasis**, v.1, n.1, p.44-51. 1972.

MANSETH, E.; SKJERVOLD, P.O.; FJÆRA, S. O.; BROSSTAD, F. R.; BJØRNSON, S.; FLENGSRUD, R. Purification and characterization of Atlantic salmon (*Salmo salar*) fibrinogen. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v.138, n.2, Jun, p.169-174. 2004.

MARKLAND, F. S. Snake venoms and the hemostatic system. **Toxicon**, v.36, n.12, Dec, p.1749-800. 1998.



- MARSH, N. & WILLIAMS, V.. Practical applications of snake venom toxins in haemostasis. **Toxicon**, v.45, n.8, Jun 15, p.1171-81. 2005.
- MCKEE, P. A.; ROGERS, L. A.; MARLER, E.; HILL, R. L The subunit polypeptides of human fibrinogen. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.116, n.1, Sep 26, p.271-279. 1966.
- MEDVED, L. & WEISEL, J. W. Recommendations for nomenclature on fibrinogen and fibrin. **The Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v.7, n.2, Feb, p.355-359. 2009.
- MELGAREJO, A. R. Serpentes Peçonhentas do Brasil. In: (Ed.). **Animais Peçonhentos no Brasil. Biologia, Clínica e Terapêutica dos Acidentes** São Paulo: Sarvier - FAPESP, 2003. Serpentes Peçonhentas do Brasil, p.33-61
- MERTENS, I. & VAN GAAL, L. F. Obesity, haemostasis and the fibrinolytic system. **Obesity Reviews**, v.3, n.2, May, p.85-101. 2002.
- MOSHER, D. F. & BLOUT, E. R. Heterogeneity of bovine fibrinogen and fibrin. **The Journal of Biological Chemistry**, v.248, n.19, Oct 10, p.6896-6903. 1973.
- MURAKAWA, M.; OKAMURA, T.; KAMURA, T.; SHIBUYA, T.; HARADA, M.; NIHO, Y. Diversity of primary structures of the carboxy-terminal regions of mammalian fibrinogen A alpha-chains. Characterization of the partial nucleotide and deduced amino acid sequences in five mammalian species; rhesus monkey, pig, dog, mouse and Syrian hamster. **Thrombosis and Haemostasis**, v.69, n.4, Apr 1, p.351-360. 1993.
- NAHAS, L.; BETTI, F.; KAMIGUTI, A. S.; SATO, H. Blood coagulation inhibitor in a snake plasma (*Bothrops jararaca*). **Thrombosis et Diathesis Haemorrhagica**, v.30, n.1, Sep 15, p.106-113. 1973.
- NAHAS, L.; KAMIGUTI, A. S.; SOUSA E SILVA, M. C.; RIBEIRO DE BARROS, M. A.; MORENA, P. The inactivating effect of *Bothrops jararaca* and *Waglerophis merremii* snake plasma on the coagulant activity of various snake venoms. **Toxicon**, v.21, n.2, p.239-246. 1983.
- NEVES-FERREIRA, A. G.; CARDINALE, N.; ROCHA, S. L. G.; PERALES, J.; DOMONT, G. B. Isolation and characterization of DM40 and DM43, two snake venom metalloproteinase inhibitors from *Didelphis marsupialis* serum. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1474, n.3, May 1, p.309-320. 2000.
- NISHIDA, S.; FUJIMURA, Y.; MIURA, S.; YOSHIDA, E.; SUGIMOTO, M.; YOSHIOKA, A.; FUKUI, H.; OZAKI, Y.; USAMI, Y. Purification and characterization of bothrombin, a fibrinogen-clotting serine protease from the venom of *Bothrops jararaca*. **Biochemistry**, v.33, n.7, Feb 22, p.1843-1849. 1994.
- OLIVEIRA, E. P. & TANIZAKI, M. M. Effect of a proteinase inhibitor from the plasma of *Bothrops jararaca* on coagulant and myotoxic activities of *Bothrops* venoms. **Toxicon**, v.30, p.123-128. 1992.

- OTERO, R.; FURTADO, M. F. D.; GONÇALVES, L. R. C.; NÚÑEZ, V.; GARCÍA, M. E.; OSORIO, R. G.; ROMERO, M.; GUTIÉRRE, J. M. Comparative study of the venoms of three subspecies of *Lachesis muta* (bushmaster) from Brazil, Colombia and Costa Rica. **Toxicon**, v.36, n.12, Dec, p.2021-2027. 1998.
- PARK, M. S. & CHA, C. I. Biochemical aspects of autologous fibrin glue derived from ammonium sulfate precipitation. **Laryngoscope**, v.103, n.2, Feb, p.193-196. 1993.
- PERALES, J.; MUÑOZ, R.; MOUSSATCHE, H. Isolation and partial characterization of a protein fraction from the opossum (*Didelphis marsupialis*) serum, with protecting property against the *Bothrops jararaca* snake venom. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v.58, n.1, p.155-162. 1986.
- PERAZZOLO, L. M.; LORENZINI, D. M.; DAFFRE, S.; BARRACCO, M. A. Purification and partial characterization of the plasma clotting protein from the pink shrimp *Farfantepenaeus paulensis*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v.142, n.3, Nov, p.302-307. 2005.
- PIZZO, S. V.; SCHWARTZ, M. L.; HILL, R. L.; MCKEE, P. A. The effect of plasmin on the subunit structure of human fibrinogen. **Journal of Biological Chemistry**, v.247, n.3, Feb 10, p.636-645. 1972.
- RATNOFF, O. D. & MENZIE, C. A new method for the determination of fibrinogen in small samples of plasma. **The Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v.37, n.2, Feb, p.316-320. 1951.
- RATNOFF, O. D.; ROSENBERG, M. J.; EVERSON, B.; EMANUELSON, M.; TULODZIECKI, N. Notes on clotting in a Burmese python (*Python molurus bivittatus*). **The Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v.115, n.5, May, p.629-635. 1990.
- ROBERTS, H. R. & LOZIER, J. N. New perspectives on the coagulation cascade. **Hospital Practice**, v.27, n.1, Jan 15, p.97-105, 109-112. 1992.
- ROBINSON, A. J.; KROPATKIN, M.; AGGELER, P. M. Hageman factor (factor XII) deficiency in marine mammals. **Science**, v.166, n.911, Dec 12, p.1420-1422. 1969.
- SANO-MARTINS, I. S. & SANTORO, M. L. Distúrbios Hemostáticos em Envenenamentos por Animais Peçonhentos no Brasil. In: J. L. C. Cardoso, F. O. S. França, *et al* (Ed.). **Animais Peçonhentos no Brasil**. São Paulo. Sarvier. São Paulo. Distúrbios Hemostáticos em Envenenamentos por Animais Peçonhentos no Brasil., p.289-301. 2003.
- SANTORO, M. L. & SANO-MARTINS, I. S. Different clotting mechanisms of *Bothrops jararaca* snake venom on human and rabbit plasmas. **Toxicon**, v.31, n.6, Jun, p.733-742. 1993.
- SAZIMA, I. Um estudo comportamental da jararaca, *Bothrops jararaca*, com uso de marcas naturais. **Memórias do Instituto Butantan**, v.50, p.83-99. 1988.

- SERRANO, S. M.; SAMPAIO, C. A.; MENTELE, R.; CAMARGO, A. C.; FINK, E. A novel fibrinogen-clotting enzyme, TL-BJ, from the venom of the snake *Bothrops jararaca*: purification and characterization. **Thrombosis and Haemostasis**, v.83, n.3, Mar, p.438-444. 2000.
- SIEDENTOP, K. H.; HARRIS, D. M.; SANCHEZ, B. Autologous fibrin tissue adhesive. **Laryngoscope**, v.95, n.9 Pt 1, Sep, p.1074-1076. 1985.
- SILVER, F. H.; WANG, M. C.; PINS, G. D. Preparation and use of fibrin glue in surgery. **Biomaterials**, v.16, n.12, Aug, p.891-903. 1995.
- STEPTOE, A.; KUNZ-EBRECHT, S.; OWEN, N.; FELDMAN, P. J.; RUMLEY, A.; LOWE, G. D. A.; MARMOT, M. Influence of socioeconomic status and job control on plasma fibrinogen responses to acute mental stress. **Psychosomatic Medicine**, v.65, n.1, Jan-Feb, p.137-144. 2003.
- STIRLING, Y.; WOOLF, L.; NORTH, W. R. S.; SEGHATCHIAN, M. J.; MEADE, T. W. Haemostasis in normal pregnancy. **Thrombosis and Haemostasis**, v.52, n.2, Oct 31, p.176-82. 1984.
- STOSCHECK, C. M. Quantification of protein. **Methods in Enzymology**, v.182, p.50-68. 1990.
- TANAKA-AZEVEDO, A. M.; TANAKA, A. S.; SANO-MARTINS, I. S. A new blood coagulation inhibitor from the snake *Bothrops jararaca* plasma: isolation and characterization. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.308, n.4, Sep 5, p.706-712. 2003.
- TANIZAKI, M. M.; KAWASAKI, H.; SUZUKI, K.; MANDELBAUM F. R. Purification of a proteinase inhibitor from the plasma of *Bothrops jararaca* (jararaca). **Toxicon**, v.29, n.6, p.673-681. 1991.
- TENNENT, G. A.; BRENNAN, S. O.; STANGOU, A. J.; O'GRADY, J.; HAWKINS, P. N.; PEPYS, M. B. Human plasma fibrinogen is synthesized in the liver. **Blood**, v.109, n.5, Mar 1, p.1971-1974. 2007.
- THEAKSTON, R. D. & REID, H. A. Development of simple standard assay procedures for the characterization of snake venom. **Bulletin of the World Health Organization**, v.61, n.6, p.949-956. 1983.
- THURN, M. J.; BROADY, K. W.; MIRTSCHIN, P. J. Neutralization of tiger snake (*Notechis scutatus*) venom by serum from other Australian elapids. **Toxicon**, v.31, n.7, Jul, p.909-912. 1993.
- TRIPLETT, D. A. Coagulation and bleeding disorders: review and update. **Clinical Chemistry**, v.46, n.8 Pt 2, Aug, p.1260-1269. 2000.
- VIEIRA, D. F.; WATANABE, L.; SANT'ANA, C. D.; MARCUSSI, S.; SAMPAIO, S. V.; SOARES, A. M.; ARNI, R. K. Purification and characterization of jararassin-I, A

---

thrombin-like enzyme from *Bothrops jararaca* snake venom. **Acta Biochimica et Biophysica Sinica (Shanghai)**, v.36, n.12, Dec, p.798-802. 2004.

WANG, L. Z.; GORLIN, J.; MICHAUD, S. E.; JANMEY, P. A.; GODDEAU, R. P.; KUUSE, R.; UIBO, R.; ADAMS, D.; SAWYER, E. S. Purification of salmon clotting factors and their use as tissue sealants. **Thrombosis Research**, v.100, n.6, Dec 15, p.537-548. 2000.

WEISEL, J. W. Fibrin assembly. Lateral aggregation and the role of the two pairs of fibrinopeptides. **Biophysical Journal**, v.50, n.6, Dec, p.1079-1093. 1986.

XU, X. & DOOLITTLE, R. F. Presence of a vertebrate fibrinogen-like sequence in an echinoderm. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.87, n.6, Mar, p.2097-2101. 1990.

ZUG, G. R., VITT, L. J., CALDWELL, J. P. **Herpetology: an introductory biology of amphibians and reptiles**. San Diego: Academic Press. 2001. 630 p.

---

## XII. Biografia

### Formação Acadêmica:

- 2003 - 2006**      Graduação em Ciências Biológicas (forma de ingresso: transferência)  
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP) –  
campus de Botucatu  
Bolsista do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e  
Tecnológico (PIBIC-CNPq)
- 2001 – 2003**      Graduação em Biologia  
Universidade Presbiteriana Mackenzie

### Produção bibliográfica:

#### Artigos completos publicados em periódicos

1. VIEIRA, C. O., TANAKA, A., SANO-MARTINS, I., MORAIS, K., SANTORO, M., TANAKA-AZEVEDO, A. M. *Bothrops jararaca* Fibrinogen and its Resistance to Hydrolysis Evoked by Snake Venoms. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry & Molecular Biology**, v.151, p. 428 - 432, 2008.
2. MORAIS, K. B., VIEIRA, C. O., HIRATA, I. H., TANAKA-AZEVEDO, A. M. *Bothrops jararaca* Antithrombin: Isolation, Characterization and Comparison with other Animal Antithrombins. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry & Molecular Biology**, v. 152, p. 171-176, 2009.