

## AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN PARCIAL DE UNA ENZIMA SIMILAR A TROMBINA DEL VENENO DE LA SERPIENTE PERUANA *Bothrops atrox* “JERGÓN”

Gustavo A. Sandoval<sup>1\*</sup>, Nora Ruiz<sup>1</sup>, Fanny Lazo<sup>1</sup>, Edith Rodríguez<sup>1</sup>, Armando Yarlequé<sup>1</sup>, Russolina B. Zingali<sup>2</sup>

### RESUMEN

Se ha determinado algunas propiedades bioquímicas de la enzima similar a trombina (EST) de la serpiente peruana *Bothrops atrox* “jergón”. Para este fin, la enzima fue purificada utilizando tres pasos cromatográficos: Sephadex G-75, CM-Sephadex C-50 y Agarosa-PAB. Asimismo, se determinó el peso molecular por PAGE-SDS y el porcentaje de carbohidratos asociados mediante hidrólisis y análisis de hexosas, hexosaminas y ácido siálico. Se ensayaron las actividades fibrinocoagulante, amidolítica y esterásica, sobre fibrinógeno bovino, BApNA y BAEE, respectivamente. Como resultado del análisis se determinó que la enzima constituye el 1,7% del veneno completo, siendo purificada 25,5 veces y con un rendimiento del 43,3% utilizando BApNA como sustrato. La enzima presenta un peso molecular de 29,6 kDa, del cual el 14,2% lo constituyen los carbohidratos asociados. La EST de *B. atrox* produjo coagulación del fibrinógeno bovino y presentó actividad sobre BAEE y BApNA. De esta manera se ha logrado purificar y caracterizar al principal componente del veneno de *B. atrox* relacionado con su actividad coagulante.

**Palabras clave:** *Bothrops atrox*, enzima similar a trombina, veneno, coagulación.

## ISOLATION AND PARTIAL CHARACTERIZATION OF A THROMBIN-LIKE ENZYME FROM *Bothrops atrox* PERUVIAN SNAKE VENOM “JERGÓN”

### ABSTRACT

We have determined some biochemical properties of a thrombin-like enzyme (TLE) isolated from *Bothrops atrox* peruvian snake venom “jergón”. In this concern, TLE was purified until homogeneity using three chromatographical steps: on Sephadex G-75, CM-Sephadex C-50 and Agarose-PAB. Furthermore, molecular weight was determinate by PAGE-SDS and associated carbohydrates by hydrolysis and analysis of hexoses, hexosamines and sialic acid. Then, fibrinocoagulant, amidolytic and steric activities were measured on bovine fibrinogen, BApNA and BAEE, respectively. As a result of these analyses, we determined that this enzyme represents 1,7% of total venom and was 25,5-fold purified with a 43,3% yield, using BApNA as substrate. This enzyme had 29,6 kDa, where 14,2% was associated carbohydrates. The TLE of *B. atrox* produced coagulation of bovine fibrinogen and had enzymatic activity on BAEE and BApNA. In conclusion, we have purified and characterized the main component of *B. atrox* venom related to its coagulant activity.

**Key words:** *Bothrops atrox*, thrombin-like enzyme, venom, coagulation.

<sup>1</sup> Laboratorio de Biología Molecular. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima – Perú

<sup>2</sup> Laboratorio de Hemostasia y Venenos. Departamento de Bioquímica Médica. Universidad Federal de Rio de Janeiro. Rio de Janeiro - Brasil.

\* E-mail: gsandoval@peru.com

## INTRODUCCIÓN

Las serpientes del género *Bothrops* habitan una extensa región de América y en el Perú presenta hasta 17 especies, siendo *Bothrops atrox* “jergón” la más abundante y peligrosa, por ser causante del 90% de los accidentes ofídicos en el país<sup>1,2</sup>. Como consecuencia de la mordedura se presenta, dolor intenso en la zona afectada, edema, hemorragia y un severo descenso de la presión arterial que ocasiona la muerte; en otros casos una masiva necrosis que lleva a la amputación del miembro afectado<sup>3</sup>.

En estudios previos realizados con el veneno de esta serpiente, se ha determinado que posee una acción marcada sobre la coagulación sanguínea<sup>4,5</sup>, determinándose las siguientes actividades: esterásica, fibrinolítica y kininogenásica, las cuales se encuentran relacionadas con esta acción biológica. Dentro de los componentes enzimáticos relacionados con este fenómeno se encuentran principalmente las enzimas similares a trombina (ESTs) las cuales producen coágulos que bloquean parcialmente la circulación sanguínea<sup>5</sup>, la cual ha sido detectada en varios venenos botrópicos, incluido *B. atrox*, utilizando como sustratos tanto plasma bovino como fibrinógeno bovino y canino<sup>6</sup>. Cuando estos compuestos son aplicados en animales o humanos, producen un descenso en los niveles de fibrinógeno resultando en un estado benigno de hipofibrinogenemia, razón por la cual es empleada en el campo clínico para el tratamiento de oclusiones vasculares y terapias defibrinogénicas<sup>7</sup>. Por esta razón se hace necesario continuar y profundizar los estudios bioquímicos de los principios activos de venenos de las especies de serpientes peruanas.

En este contexto, en el presente trabajo se describe la purificación de la enzima similar a trombina del veneno de *B. atrox* mediante técnicas cromatográficas, así como su caracterización bioquímica parcial.

## PARTE EXPERIMENTAL

### Material biológico

Se utilizó el veneno de ejemplares adultos de *Bothrops atrox* procedentes de Pucallpa (Ucayali) y mantenidos en cautiverio en el serpentario “Oswaldo Meneses” del Museo de Historia Natural de la UNMSM. El veneno fue extraído por presión manual de las glándulas venenosas, siendo luego liofilizado y conservado a 4 °C hasta su utilización en las pruebas experimentales correspondientes.

### Cuantificación de proteínas

La cantidad de proteína fue calculada midiendo la absorbancia de luz UV a 280 nm<sup>8</sup> en un espectrofotómetro Shimadzu UV 120-02. Además, se empleó el método de Lowry<sup>9</sup> modificado en nuestro laboratorio<sup>4</sup>, utilizando un fotocolorímetro Spectronic Bausch & Lomb, empleando albúmina sérica bovina como proteína estándar.

### Purificación de la enzima similar a trombina

La metodología de purificación utilizada se basó en el procedimiento reportado previamente para el aislamiento de la EST de *Lachesis muta*<sup>10</sup>. Como primer paso, se aplicaron 200 mg de veneno crudo disueltos en 2 mL de buffer acetato de amonio 0,05 M, pH 6,0 a una columna de Sephadex G-75 (1,2 x 45,2 cm). La muestra fue eluída con el mismo buffer a un flujo de 13 mL por hora, colectándose fracciones de 1 mL en un colector automático de fracciones Pharmacia-LKB. Las fracciones con mayor actividad sobre BApNA fueron juntadas, concentradas y aplicadas a una segunda columna de CM Sephadex C-50 (1,2 x 35 cm), usándose como eluyente buffer acetato de amonio 0,05 M, pH 6,0. Las fracciones retenidas en el sistema cromatográfico fueron eluídas utilizando el mismo buffer conteniendo NaCl 0,4 M.

Luego, las fracciones con mayor actividad amidolítica fueron juntas, dializadas contra agua destilada y liofilizadas. Para el tercer paso cromatográfico, las fracciones anteriores, resuspendidas previamente en buffer Tris-HCl 0,05 M, NaCl 0,5 M, pH 7,5, fueron aplicadas a una columna de agarosa-PAB (0,8 x 6,0 cm). Las fracciones retenidas por afinidad fueron eluidas empleando buffer Tris-HCl 1 mM, NaCl 0,5 M, pH 3,0 y neutralizadas usando Tris 1 M. Finalmente, las fracciones con mayor actividad sobre BApNA fueron concentradas y mantenidas en congelación para su posterior caracterización.

### **Actividades enzimáticas**

#### *Actividad fibrinocoagulante*

Esta actividad se evaluó por el tiempo de formación del coágulo originado por la acción de la enzima sobre el fibrinógeno bovino<sup>11</sup>. Una unidad de actividad (U) se define como la inversa del tiempo de coagulación en segundos.

#### *Actividad amidolítica*

Fue determinada empleando BApNA como sustrato, midiéndose la liberación de *p*-nitroanilida a 405 nm<sup>12</sup>. Una unidad de actividad (U) es expresada como  $\mu$ moles de *p*-nitroanilida liberados por minuto.

#### *Actividad esterásica*

Se determinó midiendo la hidrólisis del sustrato BAEE y registrándose la absorbancia a 253 nm<sup>13</sup>. Una unidad de actividad (U) corresponde a la cantidad de  $\mu$ moles de BAEE hidrolizados por minuto.

### **Evaluación de la pureza y determinación del peso molecular**

Se empleó la electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones denaturantes con SDS (PAGE-SDS)<sup>14</sup>, en un equipo Mini-PROTEAN 3 (Bio-Rad Laboratories). La corrida electroforética se realizó aplicando 100 V constantes durante 1 h. Luego el gel fue teñido con azul brillante de Coomassie 0,1% por 10 min, para luego ser decolorado hasta evidenciar las bandas proteicas.

### **Determinación de azúcares asociados**

Para la determinación de carbohidratos asociados se emplearon las técnicas descritas por Winzler<sup>15</sup> para hexosas y hexosaminas, y por Warren<sup>16</sup> para ácido siálico.

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **Purificación de la enzima y estimación del peso molecular**

En el primer paso de purificación en Sephadex G-75 (figura 1A), el veneno fue fraccionado en tres picos de proteína, encontrándose la actividad enzimática en las fracciones correspondientes al primer pico con un  $V_e/V_o$  de 1,50. La actividad amidolítica estuvo presente en estas fracciones, las cuales, después de ser juntas y concentradas, fueron pasadas a través de una columna de CM Sephadex C-50. En el segundo paso de purificación (figura 1B) la actividad amidolítica fue ubicada en las fracciones que se separaron de la matriz empleando NaCl 0,4 M, y en el tercer paso de purificación (figura 1C) usando una columna de agarosa-PAB se consiguió la separación completa de la enzima luego de aplicar buffer Tris-HCl 1 mM, NaCl 0,5 M, pH 3,0. Se logró una purificación de 25,5 veces, un rendimiento de 43,3% y 1,7% de proteína activa recuperada (tabla 1). El ensayo electroforético en PAGE-SDS mostró que la enzima purificada corresponde a una única banda homogénea con un peso molecular aproximado de 29,6 kDa (figura 2).

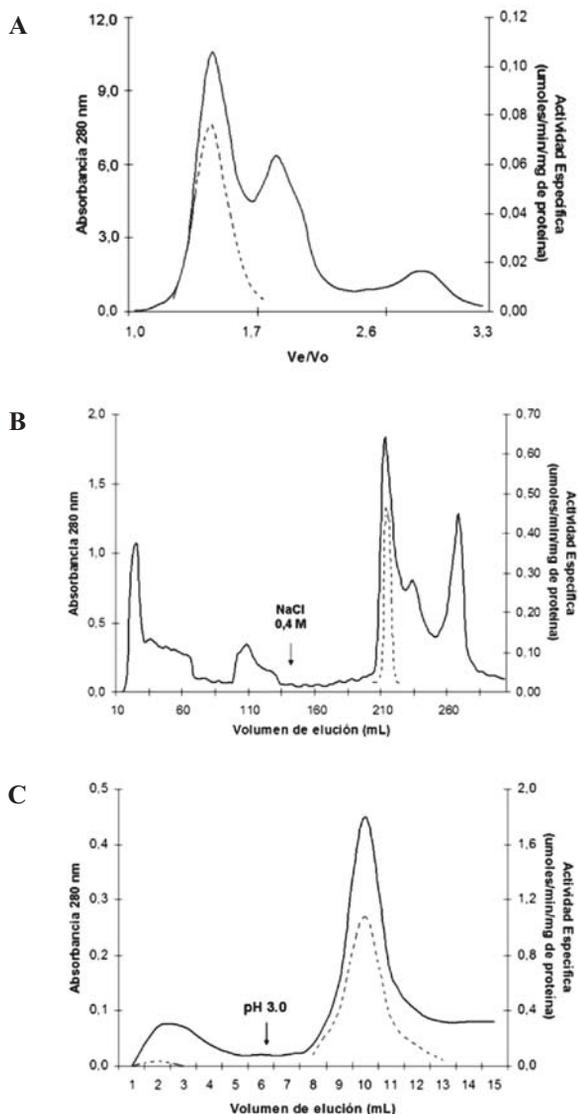


Figura 1. Esquema de purificación de la enzima similar a trombina del veneno de *Bothrops atrox*.

- (A) Fraccionamiento del veneno crudo en Sephadex G-75 empleando buffer acetato de amonio pH 6,0.  
 (B) Separación de las fracciones previas en una columna de CM Sephadex C-50. Las fracciones eluidas con NaCl 0,4 M fueron desaladas, concentradas y aplicadas a un tercer paso cromatográfico.  
 (C) Cromatografía en agarosa-PAB. Las fracciones se separaron empleando buffer Tris-HCl 0,05 M, NaCl 0,5 M, pH 7,5. Las fracciones retenidas fueron eluidas empleando buffer Tris-HCl 1 mM, NaCl 0,5 M, pH 3,0. La línea continua (—) indica la absorbancia a 280 nm, mientras que la línea punteada (---) la actividad específica sobre BApNA en µmoles de *p*-nitroanilina liberados por minuto y por mg de proteína.

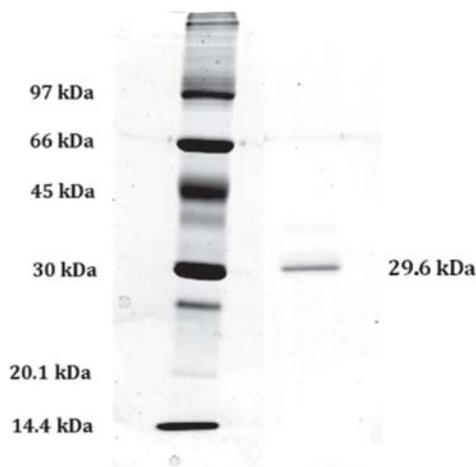


Figura 2. Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS (PAGE-SDS) bajo condiciones no reductoras de la enzima similar a trombina de *Bothrops atrox*.

### Actividad sobre diferentes sustratos

La enzima similar a trombina purificada fue capaz de coagular el fibrinógeno bovino; comparando los tiempos de coagulación obtenidos con el veneno crudo y la enzima purificada se encontraron actividades específicas de 1,26 y 5,50 U/mg de proteína, respectivamente, siendo la actividad de la enzima purificada 4,37 veces más que la actividad del veneno crudo (tabla 2). La enzima purificada también muestra una gran capacidad para hidrolizar sustratos sintéticos como el BApNA con una actividad específica de 0,874 U/mg de proteína, mientras que sobre ésteres sintéticos de arginina como el BAEE, mostró una actividad de 45,83 U/mg de proteína, siendo la actividad purificada 25,5 y 23,4 veces, respectivamente, con respecto a la actividad mostrada por el veneno crudo (tabla 2).

Tabla 1. Cuadro resumen de purificación de la enzima similar a trombina del veneno de *Bothrops atrox*.

Procedimiento	Proteína Total (mg)	Actividad Específica (U/mg de proteína)	Actividad (U)*	Rend. (%)	Purificación (veces)
1° veneno crudo	200,0	0,034	6,86	100,0	1,0
2° sephadex g - 75	51,6	0,081	4,20	61,2	2,4
3° cm sephadex c - 50	7,0	0,542	3,79	55,3	15,8
4° agarosa - pab	3,4	0,874	2,97	43,3	25,5

\* La actividad específica fue determinada empleando benzoil DL arginina *p*-nitroanilina como sustrato. Una unidad de actividad corresponde a la cantidad de  $\mu$ moles de *p*-nitroanilina liberados por minuto

Tabla 2. Actividad del veneno total y de la enzima similar a trombina de *Bothrops atrox* sobre diferentes sustratos.

Substrato	pH	Actividad específica (U/mg de proteína)		Incremento de la actividad (veces)
		Veneno crudo	Enzima	
Fibrinógeno bovino	7,4	1,26	5,50	4,4
BAPNA	8,1	0,034	0,874	25,5
BAEE	7,4	1,96	45,8	23,4

Tabla 3. Contenido de carbohidratos del veneno crudo y de la enzima similar a trombina de *Bothrops atrox*

Componente	Porcentaje (%)	
	Veneno Crudo	Enzima
Hexosas	1,83	12,1
Hexosamina	0,61	1,36
Ácido siálico	0,19	0,75
Total de carbohidratos asociados	2,63	14,21

### Contenido de carbohidratos

El análisis de carbohidratos para el veneno crudo determinó un 1,83% de hexosas, 0,61% de hexosaminas y 0,19% de ácido siálico; haciendo un total de 2,63% de carbohidratos asociados. En cambio la enzima purificada registró 12,1% de hexosas, 1,36% de hexosaminas y 0,75% de ácido siálico, con un total de 14,21% de carbohidratos, lo que demuestra que se trata de una glicoproteína (tabla 3).

Los venenos de los vipéridos presentan cantidades significativas de enzimas similares a trombina y el mecanismo de formación del coágulo de fibrinógeno por acción de éstas es diferente al provocado por trombina. Estos componentes preferentemente liberan sólo fibrinopéptidos A o B, mientras que la trombina produce la liberación de ambos fibrinopéptidos de la molécula del fibrinógeno. La mayor parte de las enzimas similares a trombina son serinoproteasas y no sólo son similares a la trombina en sus propiedades físicas y químicas sino que contienen residuos reactivos de serina, ácido aspártico e histidina, como la trombina. Un hecho importante es que las actividades coagulante y esterásica de estas enzimas son inhibidas simultáneamente por agentes específicos que modifican la proteína, siendo éste un indicativo que dichas actividades parecen residir en el mismo sitio activo.

En el presente trabajo se purificó la enzima similar a trombina del veneno de *B. atrox* utilizando una combinación de cromatografía en Sephadex G-75, CM Sephadex C-50 y agarosa-PAB. El primer sistema que permitió la separación del extracto proteico que constituye el veneno se diferenció en tres picos principales de proteína, correspondiendo la enzima al primer pico. Esto nos indica que la proteína coagulante que hemos aislado se encuentra en torno a la fracción proteica de alto peso molecular que eluye con un volumen de elución ( $V_e$ ) cercano al volumen vacío o muerto ( $V_0$ ). En el segundo paso se logró la separación de dos picos de proteína eluida con el buffer inicial mientras que la enzima similar a trombina eluye al adicionarse al buffer NaCl 0,4 M y el hecho de que aparezca en el primer pico indica claramente que se encontraba atrapada por el intercambiador lo que significa que se trata de una proteína cargada positivamente a pH 6,0, es decir, que su pI estaría en el rango de neutro o ligeramente alcalino. Como tercer paso cromatográfico (figura 1C) se empleó una columna de agarosa - *p*-aminobenzamida (PAB). Esta molécula es un inhibidor competitivo específico de serinoproteasas, mediante la cual se pudo retener a las fracciones con afinidad a ésta para su posterior separación mediante un cambio en el valor de pH de 7,5 a 3,0. Con esta metodología se consiguió separar la enzima similar a trombina mientras que las fracciones que no se ligaron a la columna correspondían a proteínas contaminantes. Del análisis electroforético de la fracción obtenida (figura 2) se demostró la existencia de una sola banda proteica y por tanto podemos afirmar que el método desarrollado es apropiado y sencillo para purificar esta enzima logrando un factor de purificación de 25,5 veces y un rendimiento de 43,3%.

Las enzimas similares a trombina purificadas de otros venenos han sido obtenidas mediante combinaciones de técnicas cromatográficas. Así tenemos que para la purificación de la balterobina, enzima coagulante aislada del veneno de *Bothrops alternatus*, se emplearon métodos cromatográficos sobre Sephadex G-75, Heparina-Sepharosa y HPLC<sup>17</sup>. Del mismo modo Jin *et al.* purificaron la enzima jerdonobina-II del veneno de *Trimeresurus jerdonii*, aplicando la muestra en primer lugar a un intercambiador catiónico de CM Sephadex C-25, posteriormente a una columna de filtración en Sephadex G-100 super fino y finalmente a una columna  $C_8$  de HPLC en fase reversa<sup>18</sup>. Finalmente, la enzima similar a trombina del veneno de *Lachesis muta* fue aislada por Yarlequé *et al.*, a través de tres pasos cromatográficos, los dos primeros en Sephadex G-100 y el último en una columna de intercambio iónico de DEAE-Celulosa, lográndose una purificación de 28,92 veces y un rendimiento de 44,76%<sup>10</sup>.

El análisis electroforético con SDS en condiciones no reductoras (figura 2) demostró que la enzima purificada presenta una sola cadena polipeptídica, con un peso molecular aproximado de 29,6 kDa. Esta enzima tiene un mediano peso molecular pero se encuentra dentro del rango de pesos moleculares reportados para varias enzimas similares a trombina aisladas de venenos de serpientes<sup>19</sup>.

La enzima similar a trombina aislada de *B. atrox* mostró la capacidad de hidrolizar diversos sustratos sintéticos que contienen como grupo cromogénico a la *p*-nitroanilida. Durante los diversos pasos de purificación se empleó el sustrato BApNA, el cual permite la caracterización de enzimas del grupo de las serinoproteasas como la tripsina y quimiotripsina y al cual pertenecen las enzimas similares a trombina de venenos de serpientes<sup>19</sup>. Las fracciones que mostraron más actividad sobre este sustrato fueron ensayadas en su capacidad para coagular el fibrinógeno bovino obteniéndose resultados positivos indicando que ambas actividades están presentes en la enzima en estudio. En el caso del BAEE, por su estructura molecular permite la caracterización de enzimas que hidrolizan el enlace éster entre la arginina y el grupo metilo. La capacidad de la enzima para hidrolizar este sustrato nos indica que ésta pertenece al gran grupo de proteasas esterásicas<sup>20</sup>.

Otro de los aspectos que se abarcó en esta investigación fue la asociación de carbohidratos a la estructura proteica de la enzima similar a trombina purificada. La enzima purificada mostró ser una glicoproteína, conteniendo 12,1% de hexosas, 1,36% de hexosaminas y 0,75% de ácido siálico (tabla 3). Estos valores se encuentran dentro del rango reportado para diferentes enzimas similares a trombina aisladas de venenos de serpientes<sup>19</sup>. Un posible rol de los oligosacáridos en las glicoproteínas es el de modular sus propiedades fisicoquímicas, tales como la solubilidad, viscosidad, estabilidad de carga. Respecto a este último punto, al tratar la enzima similar a trombina del *Lachesis muta* con una *N*-glicosidasa F (PNGasa F) y proceder a la electroforesis mediante PAGE-SDS, se observó un aumento en la movilidad electroforética de la proteína tratada en comparación con la proteína no tratada<sup>21</sup>. Otro rol probable de los carbohidratos sería el de proteger a la enzima de la proteólisis, teniendo en cuenta el entorno fuertemente proteolítico del veneno.

### CONCLUSIONES

En el presente trabajo se ha logrado purificar y caracterizar al principal componente del veneno de la serpiente peruana *Bothrops atrox* relacionado con su actividad coagulante. Las características bioquímicas de esta enzima descritas en el presente artículo servirán de base para el estudio de sus propiedades inmunogénicas a fin de desarrollar estrategias para neutralizar su actividad tóxica.

### AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo fue iniciado en el Laboratorio de Biología Molecular de la UNMSM y finalizado gracias al financiamiento otorgado al Blgo. Gustavo Sandoval por la Red de Macrouiversidades de América Latina y el Caribe a través de una beca de investigación en la Universidad Federal de Río de Janeiro como parte del desarrollo de su tesis de maestría en Biología Molecular.

### BIBLIOGRAFÍA

1. Loja D, Avilés R, Necochea Y, Vilca M, Castro J. Ofidismo por *Bothrops atrox*: Estudio clínico-epidemiológico. *Diagnóstico*. 2000;38(5):261-5.
2. Yarlequé A. Las serpientes peruanas y sus venenos. Lima: Fondo Editorial-UNMSM; 2000.
3. Instituto Nacional de Salud. Diagnóstico y tratamiento de los accidentes por animales ponzoñosos. Lima: El Instituto; 2004.
4. Loayza S, Morante Y, Campos S, Yarlequé A. Enzimas proteolíticas en el veneno de las serpientes peruanas *Lachesis muta* y *Bothrops atrox*. *Bol Soc Quím Perú*. 1985;52(3):151-63.
5. Lu Q, Clemetson JM, Clemetson KJ. Snake venoms and hemostasis. *J Thromb Haemost*. 2005;3(8):1791-9.
6. Orejuela P, Zavaleta A, Salas M, Marsh N. Thrombin-like activity in snake venoms from Peruvian *Bothrops* and *Lachesis* genera. *Toxicon*. 1991;29(2):1151-4.
7. Braud S, Bon C, Wisner A. Snake venom proteins acting on hemostasis. *Biochimie*. 2000;82(9-10):851-9.
8. Warburg O, Christian W. Isolierung and Kristallisation der Garungs ferments enolase. *Biochem Z*. 1941;310:384-421.
9. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 1951;193(1):265-75.

10. Yarleque A, Campos S, Escobar E, Lazo F, Sánchez N, Hyslop S, *et al.* Isolation and characterization of a fibrinogen-clotting enzyme from venom of the snake *Lachesis muta muta* (peruvian bushmaster). *Toxicon*. 1989;27(11):1189-97.
11. Devi A, Banerjee S, Copley AL. Coagulant and esterase activities of thrombin and *Bothrops atrox* venom. *Toxicon*. 1972;10(6):563-73.
12. Erlanger BF, Kokowsky N, Cohen W. The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. *Arch Biochem Biophys*. 1961;95:271-8.
13. Schwert GW, Takenaka Y. A spectrophotometric determination of trypsin and chymotrypsin. *Biochim Biophys Acta*. 1955;16(4):570-5.
14. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970;227(5259):680-5.
15. Winzler RJ. Determination of serum glycoproteins. *Methods Biochemical Anal*. 1955;2:279-311.
16. Warren L. The thiobarbituric acid assay of sialic acids. *J Biol Chem*. 1959;234(8):1971-5.
17. Smolka MB, Marangoni S, Oliveira B, Novello JC. Purification and partial characterization of a thrombin-like enzyme, balterobin, from the venom of *Bothrops alternatus*. *Toxicon*. 1998;36(7):1059-63.
18. Jin Y, Lu QM, Chen RQ, Wu JB, Xiong YL. Molecular characterization of a weak fibrinogen-clotting enzyme from *Trimeresurus jerdonii* venom. *Toxicon*. 2005;45(3):353-60.
19. Castro HC, Zingali RB, Albuquerque MG, Pujol-Luz M, Rodrigues CR. Snake venom thrombin-like enzymes: from reptilase to now. *Cell Mol Life Sci*. 2004;61(7-8):843-56.
20. Castro HC, Silva DM, Craik C, Zingali RB. Structural features of a snake venom thrombin-like enzyme: thrombin and trypsin on a single catalytic platform? *Biochim Biophys Acta*. 2001;1547(2):183-95.
21. Magalhaes A, Ferreira RN, Richardson M, Gontijo S, Yarleque A, Magalhaes HP, *et al.* Coagulant thrombin-like enzymes from the venoms of Brazilian and Peruvian bushmaster (*Lachesis muta muta*) snakes. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*. 2003;136(2):255-66.