

## **PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN PARCIAL DE UNA GLICOPROTEÍNA CON ACTIVIDAD AMIDOLÍTICA OBTENIDA DEL VENENO DE LA SERPIENTE PERUANA *BOTHROPS BARNETTI***

R. Inga A.<sup>1</sup>, F. Lazo M.<sup>2</sup>, A. Yarlequé, Ch.<sup>3</sup> y D. Vivas R.<sup>4</sup>

### **RESUMEN**

Se ha purificado una glicoproteína del veneno de la serpiente peruana *Bothrops barnetti* mediante tres pasos cromatográficos que involucran exclusión molecular e intercambio iónico. Mediante PAGE-SDS se determinó que la enzima posee un peso de 48 kDa bajo condiciones no reductoras. El contenido de carbohidratos representa el 48% de la masa total. La enzima presentó actividad sobre el sustrato Benzoil Arginil p Nitroanilida (BApNA) y plasma humano citratado. La enzima fue fuertemente inhibida por el PMSF y el inhibidor de tripsina de soya indicando que se trata de una serinoproteasa.

**Palabras clave:** Veneno, serpiente, actividad amidolítica, glicoproteína, *Bothrops barnetti*.

### **PURIFICATION AND PARTIAL CHARACTERIZATION OF A GLYCOPROTEIN WITH AMIDOLYTIC ACTIVITY OBTAINED FROM SNAKE VENOM *BOTHROPS BARNETTI***

### **ABSTRACT**

A glycoprotein from the venom of *Bothrops barnetti* snake, was purified using gel filtration and ionic exchange chromatography. This protein showed 48 kDa as molecular weight by PAGE-SDS under non-reducing conditions being its carbohydrate content 48% of the total mass protein. This enzyme had activity either Benzoil Arginil -p -Nitroanilide (BApNA) and human citrated plasma. In addition this enzyme was strongly inhibited by PMSF and trypsin soybean inhibitor indicating that it is a serinoproteinase

**Keywords:** Venom, snake, amidolytic activity, glycoprotein, *Bothrops barnetti*.

## **1. INTRODUCCIÓN**

Las proteínas son las macromoléculas biológicas más versátiles hasta ahora conocidas, ellas participan en una serie de funciones como: transporte, defensa, estructura, señalización reserva, etc. Una de las principales funciones que se llevan a cabo estas macromoléculas es el poder catalizar las reacciones biológicas que se realizan en las zonas intra y extracelular, asegurando de

esta forma, el correcto funcionamiento metabólico de todo ser vivo. Las proteínas que desarrollan esta función reciben el nombre de enzimas<sup>[1]</sup>.

Al igual que la mayoría de proteínas, las enzimas, una vez ensambladas en el retículo endoplasmático rugoso, en un proceso llamado traducción de proteínas, sufren una serie de modificaciones pos traduccionales antes de ser llevadas a los compartimientos

1 Laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UNMSM, rosalin\_47@hotmail.com

2 Laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UNMSM, fabeth14@gmail.com

3 Laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UNMSM, ayarleque48@gmail.com

4 Laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UNMSM, devivasr@gmail.com

celulares o exportadas fuera de la célula. Entre las modificaciones más importantes se encuentran la glicosilación, que es la adición covalente de azúcares a un grupo determinado de residuos aminoacídicos [2].

La glicosilación de las proteínas pueden ser de dos tipos, dependiendo del grupo al que es transferido el oligosacárido, el primero es cuando participa el NH<sub>2</sub> de la cadena lateral de un residuo asparagina recibiendo el nombre N-oligosacárido (N-linked), mientras que en el segundo, los oligosacáridos son unidos al grupo hidroxilo de la cadena lateral de un residuo de serina, treonina o de hidroxilisina adoptando la denominación de los de O-oligosacáridos (O-linked) [2,3].

Por otro lado, uno de los fluidos biológicos más abundantes en proteína los constituyen los venenos de serpientes [4]. Estos venenos contienen en su mayoría enzimas que cumplen los papeles de inmovilización, muerte y digestión de la presa por su accionar en sustratos específicos como proteínas (metaloproteasas y serinoproteasas) lípidos (lipasas y fosfolipasas), azúcares (hialuronidasas) y ADN (endo y exonucleasas) [4]. Para obtener cualquiera de estas enzimas al estado puro, el procedimiento más idóneo y usado es la cromatografía de exclusión o filtración molecular, intercambio iónico y otras, permitiendo con ello recuperar la proteína funcionalmente activa.

En el presente trabajo se ha aislado y caracterizado bioquímicamente a una glicoproteína del veneno de la serpiente peruana *Bothrops barnetti*, con actividad amidolítica y coagulante del fibrinógeno.

## 2. PARTE EXPERIMENTAL

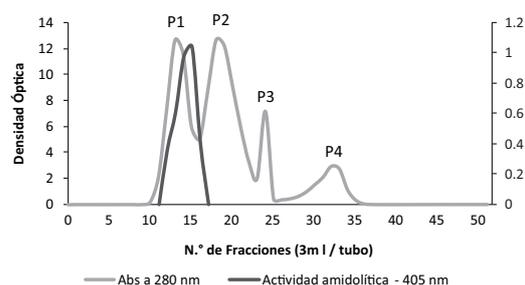
### Materiales

El veneno fue obtenido de especímenes del Serpentario "Oswaldo Meneses" del Museo de Historia natural-UNMSM. El veneno fue liofilizado y mantenido a -20 °C hasta su uso. El suero equino antibotrópico polivalente fue obtenido del Centro Nacional de Productos Biológicos-INS.

Agarosa, fibrinógeno bovino, N-glicosidasa F, O-glicosidasa, benzoil arginil-p-nitroanilida (BAPNA), estándares de peso molecular e inhibidores de proteasas fueron adquiridos de Sigma Chemical Company (USA).

### Purificación

300 mg de veneno liofilizado fueron diluidos en 2 ml de acetato de amonio 0,05M (pH 5,0) centrifugados a 3000 rpm por 15 min para remover las partículas insolubles. El sobrenadante fue aplicado a una columna de 64 x 1,4 cm, empacada con gel de filtración Sephadex G-100 equilibrada y eluida con el mismo buffer. La elución fue recolectada en fracciones de 3 ml a un flujo de 14 ml/h. Todas aquellas fracciones activas del primer paso fueron juntadas y concentradas hasta un volumen de 1,2 ml.



**Figura 1A.** Primer paso de purificación en Sephadex G-100 del veneno de *B. barnetti*

El concentrado resultante (105,8 mg de proteína) fue aplicado a una columna de intercambio catiónico CM Sephadex C-50 (45 x 1,2 cm) equilibrada con el buffer del primer paso. Aquellos componentes que no se adhirieron a la columna fueron eluidos con 90 ml del buffer inicial (acetato de amonio 0,05M pH 5,0), los componentes adheridos fueron eluidos con el mismo buffer pero estableciendo un gradiente de concentración de NaCl de 0,1 a 1 M. Fueron colectadas fracciones de 3ml a un flujo 14 ml/h.

Para el tercer paso, las fracciones activas del paso precedente fueron juntadas y concentradas por centrifugación usando tubos

Microcom a un volumen de 0,6 ml; este concentrado (6,4 mg de proteína) fue aplicado a una nueva columna de Sephadex G-100 (30 x 1 cm) equilibrada con el mismo buffer del primer paso. Se recolectaron fracciones de 1 ml a un flujo de 15 ml/h.

La concentración de proteína fue monitoreada por medida de la absorbancia a 280 nm para todos los pasos cromatográficos. La actividad enzimática fue evaluada usando el sustrato cromogénico Benzoil Arginil p-Nitroanilida y se empleó la metodología de PAGE-SDS para el seguimiento de la purificación.

#### **Electroforesis en gel de poliacrilamida con sodio dodecil sulfato (PAGE-SDS)**

Fue llevada a cabo usando el método de Laemmli<sup>[5]</sup> bajo condiciones no reductoras, usando una cámara vertical MINI-GELSystem (Sigma); las corridas se realizaron por 1 hora. Los geles fueron teñidos con azul brillante de Coomassie. Los estándares de peso molecular usados fueron: albúmina sérica bovina (66 kDa), ovoalbúmina (45 kDa), anhidrasa carbónica (29 kDa) y lisozima (14,3 kDa).

#### **Actividad Amidolítica**

Fue determinada por el método de Erlanger *et al.* (1961)<sup>[6]</sup> modificado, empleando el sustrato cromogénico Benzoil-Arginil-p-nitroanilida (BApNA) midiéndose la liberación de p-nitroanilina a 405 nm.

La mezcla de reacción contenía 1 ml de BApNA a una concentración de  $9 \times 10^{-4}$  M, 0,45 ml de buffer Tris HCl 0,05M pH 8,1 y 25  $\mu$ l de la enzima purificada. Luego de incubarse por 15 minutos a 37 °C se adicionó 1 ml de ácido acético al 60% para detener la reacción y luego medirla a 405 nm.

#### **Actividad coagulante sobre plasma humano**

Muestras de sangre periférica fueron colectadas de personas voluntarias en 3,8% de citrato de sodio (9:1) y centrifugados a 3000 rpm a 15 °C por 15 min para la obtención de plasma. La actividad coagulante fue medida por el método de Copley<sup>[7]</sup> usando plasma humano citratado. La mezcla de reacción contenía 0,2 ml del sustrato y 0,1 ml de cloruro de sodio 0,9% tamponado a pH 7,4; preincubándose por 10 minutos a 37 °C para luego agregar 0,1 ml del veneno crudo o de la enzima purificada. Se determinó la actividad enzimática dividiendo la inversa del tiempo de coagulación entre los mg de proteína utilizada.

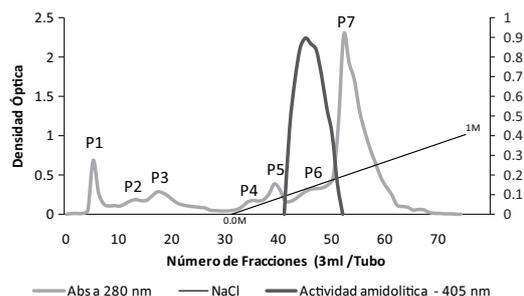
#### **Efecto del pH y la Temperatura**

La determinación del pH óptimo para la actividad amidolítica fue determinado por la variación del pH entre un rango de 4 a 10. La enzima fue diluida en buffer acetato de sodio (0,2 M pH 4,0-6,0), buffer fosfato de sodio (0,2 M pH 6,0-7,0) y buffer Tris HCl (0,2M 8,0- 10,0). Asimismo, la tolerancia de la enzima a la temperatura fue determinada entre el rango de 20 a 90 °C. La enzima fue preincubada por 15 min a valores de temperatura establecidos para luego medir su actividad amidolítica.

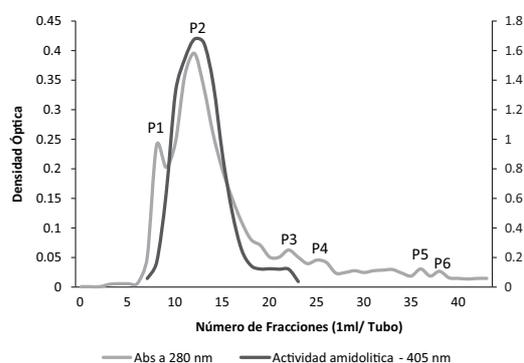
#### **Tipos de glicosilación**

Para evaluar los tipos de glicosilación que tiene TLE- Bb 50  $\mu$ g de la enzima purificada fue diluida en buffer de reacción (50 mM Tris-HCl, pH 8,0) en un volumen final de 50  $\mu$ l, posteriormente se agregaron 2,5  $\mu$ l de solución denaturante (SDS 2% y 1M 2- $\beta$  mercaptoetanol) y se sometió la muestra a calentamiento por 5 min a 100 °C e inmedia-

tamente se detuvo en frío. Se agregaron 2,5 µl de solución detergente (IGEPAL® 15%) y por último se añadió 2 µl de la enzima PNGasa F (N-glicosidasa F) u O-glicosidasa. La muestra fue incubada a 37 °C por 24 horas y detenidas por calentamiento con buffer muestra para PAGE-SDS y analizada por electroforesis.



**Figura 1B.** Segundo paso de purificación en columna de CM Sephadex C-50.



**Figura 1C.** Tercer paso de purificación en columna de Sephadex G-100.

### Deglicosilación bajo condiciones no denaturantes

Se realizó siguiendo la metodología de Silva-Junior *et al.* (2007) utilizando PNGasa F, 0,1 UN sin agentes reductores. Teniendo presente la especificidad de las enzimas tanto TLE-Bb como la de PNGasa F, en el presente estudio se trabajó con la mezcla de reacción en cada una de las pruebas del ítem 5.

### Efecto de inhibidores

Se colocaron en viales pequeños 75 µl de la enzima y 75 µl del inhibidor correspondiente, incubándose a 37 °C por 10 minutos. Luego se tomaron alícuotas de 50 µl de la mezcla realizando los ensayos por triplicado para la prueba de actividad amidolítica con un tiempo de incubación de 15 minutos.

### Determinación de hexosas, hexosaminas y ácido siálico

#### Determinación de Hexosas

La mezcla de reacción contenía: 0,25 o 0,5 ml de veneno de *B. barnetti* (3,33 mg/ml) o de la enzima purificada (0,190 mg/ml) completado con agua destilada a 0,8 ml; 0,1 ml de Fenol al 16% y 2 ml de ácido sulfúrico concentrado, midiéndose después de 30 minutos la absorbancia de esta mezcla a 490 nm (Dubois *et al.*, 1956) [8].

#### Determinación de Hexosaminas

La mezcla de la reacción contenía: 0,2 o 0,4 ml del veneno de *B. barnetti* (9,5 mg/ml) o 0,5 ml de la enzima purificada (0,190 mg/ml), previamente hidrolizados con HCl 3N en agua hirviendo por 4 horas y neutralizados con NaOH 3N, completando con agua destilada a 0,5 ml. Se añadió luego 0,5 ml de acetilacetona, se mezcló, y se hizo hervir por 15 minutos. Posteriormente se adicionó 2 ml de etanol al 95% y 0,5 ml del Reactivo de Ehrlich, para finalmente medir después de 30 minutos la absorbancia de la mezcla a 530 nm (Winler, 1955) [9].

#### Determinación de Ácidos Siálicos

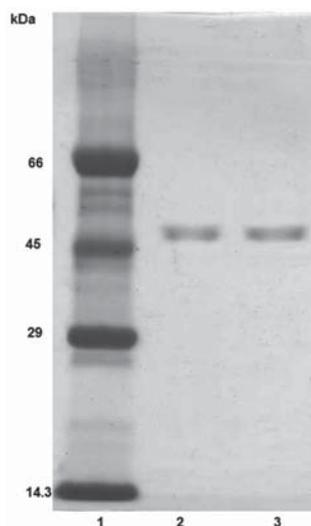
La mezcla de reacción contenía 0,1 ml de veneno crudo de *B. barnetti* (10 mg/ml) o 0,2 ml de la enzima purificada (0,190 mg/ml) previamente sometidos al calor a 80 °C por 1 hora de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,1 N, completándose 0,2

ml con agua destilada. Se adicionó luego 0,1 ml de solución de periodato, se homogenizó y se dejó en reposo por 20 minutos a temperatura ambiente, posteriormente se adicionó 1 ml de solución de arsenito, agitando hasta desaparecer el color amarillo, y 2 ml de ácido 2-tiobarbitúrico, luego los tubos son colocados en un baño de agua hirviendo por 15 minutos. Después, se separó una alícuota de 1,5 ml de la mezcla se le agregó ciclohexanona en proporción 1:1, se agitó 2 veces y se centrifugó 3000 rpm por 10 minutos, midiéndose la absorbancia del sobrenadante a 549 nm (Warren, 1959) [10].

### 3. RESULTADOS

#### Purificación de la Glicoproteína

Una glicoproteína fue aislada del veneno de *Bothrops barnetti* por cromatografía de exclusión molecular sobre Sephadex G-100 e intercambio iónico sobre CM-Sephadex C-50. El fraccionamiento por Sephadex G-100 produce 4 picos de proteínas (Figura 1A), solo el pico 1 mostró actividad amidolítica y coagulante. Después de juntar y concentrar, las fracciones con actividad fueron aplicadas en una columna de CM-Sephadex C-50 y fueron resueltos 7 nuevas fracciones (Figura 1B). Las fracciones que constituyen el Pico 6 mostraron actividad amidolítica, estas fracciones fueron juntadas y concentradas para ser recromatografiadas en la columna Sephadex G-100, en este paso se resolvieron 6 picos de proteína coincidiendo la actividad amidolítica y coagulante con el pico 2 (Figura 1C). La proteína purificada consistió de una sola cadena polipeptídica mostrando un peso molecular de 48 kDa bajo condiciones no denaturantes (Figura 2) cuando la proteína fue tratada con la enzima recombinante PNGasa F, se evidenció un aumento en la movilidad electroforética hasta 29 kDa (Figura 3).



**Figura 2.** Electroforesis en gel de poliacrilamida con sodio dodecil sulfato de la enzima purificada. (1) Marcadores de Peso molecular (2 y 3) Enzima bajo condiciones no reductoras.

La actividad amidolítica de la enzima fue de 1,05 UA/mg de proteína y de 26,66 UA/mg de proteína para la actividad coagulante sobre plasma humano citratado.

La Tabla 1 resume el total de recuperación de la proteína, la actividad amidolítica y coagulante representa el 0.5% del total de proteínas presentes en el veneno. El incremento de la actividad amidolítica de la enzima fue 52 veces con respecto a la actividad del veneno total.

**Tabla 1.** Purificación de la glicoproteína del veneno de *Bothrops barnetti* "sancarranca".

Muestra	Proteína		Actividad específica*	Unidades totales de Actividad	Rendimiento (%)	Purificación
	Cantidad (mg)	%				
Inicial (veneno crudo)	143.8	100	0.02	3.31	100	1
1.º paso CM- Sephadex C-50	6.31	4.39	0.16	1.02	30	7
2.º paso Sephadex G-100	0.35	0.25	1.05	0.43	14	45

\* Actividad específica: Unidades de actividad (µmoles de pnitroanilina liberada/ minuto)/ mg proteína)

### Efecto del pH y la Temperatura

La actividad amidolítica (hidrólisis del BApNA) muestra una dependencia en forma de campana del pH a 37 °C, con una actividad máxima centrada en pH 8,1. Cerca de un 50% de la actividad máxima fue reflejada a pH 9,5 y cerca de 20% a pH 5,5 (Figura 5).

La óptima temperatura de la actividad catalítica de la enzima sobre el sustrato BApNA mostró una alta hidrólisis en proporciones progresivas de los 25 hasta los 40 °C. La enzima perdió hasta el 50% de su máxima actividad a los 60 °C, siendo completamente inactivada a los 80 °C (Figura 6).

### Efecto de los Inhibidores de Proteasas

La actividad enzimática no fue inhibida por el quelante EDTA, tampoco por el TLCK ni los inhibidores iodoacetato y ácido glutámico. Sin embargo, la actividad fue severamente inhibida por el PMSF (50%) y el inhibidor de tripsina de soya (20%). El polisacárido heparina, inhibidor específico de la trombina, así como el β-Mercaptoetanol no tuvieron efecto alguno sobre la actividad de la glicoproteína en estudio (Tabla 2).

**Tabla 2.** Efecto de algunos inhibidores de proteasas sobre la Enzima Similar a Trombina de *Bothrops barnetti*.

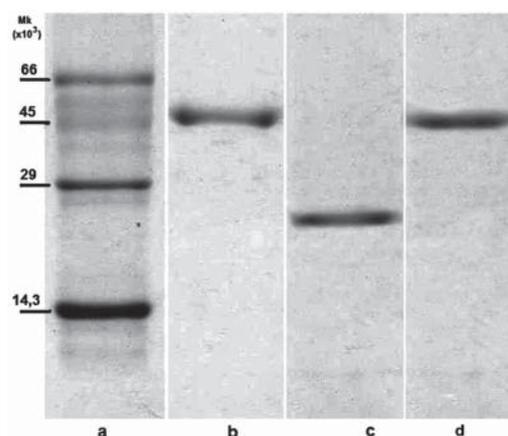
Agente	Concentración final	Actividad (%)
Control	-	100
PMSF	5 mM	55.3
Inhibidor de tripsina de soya	1 mg	80.4
EDTA	5 mM	115.6
TLCK	5 mM	118.2
Glutation	5 mM	94.5
Iodo acetato	5 mM	119
Ácido glutámico	5 mM	109.8
Heparina	5 unidades	95.1
2 β-mercaptoetanol	5 Mm	97.2

### Análisis del contenido de carbohidratos

Para investigar el tipo de carbohidratos en la estructura de la proteína, la enzima fue tratada previamente con O-glicosidasa y PNGasa F, las cuales remueven O-oligosacáridos y N-oligosacáridos, respectivamente.

El análisis por PAGE-SDS bajo condiciones reductoras reveló que la enzima solo incrementó su movilidad electroforética cuando es tratada con PNGasa F (Figura 3).

Para determinar la naturaleza de los carbohidratos unidos a la enzima, la proteína fue sometida a procedimientos químicos que evidenciaron que las hexosas son los azúcares mayoritarios (27,65%), seguido por las hexosaminas y ácido siálico (11,34% y 0,99%, respectivamente). Estos datos representan 39,98% del contenido de carbohidratos analizados por el método químico en comparación al 48% por el método enzimático.

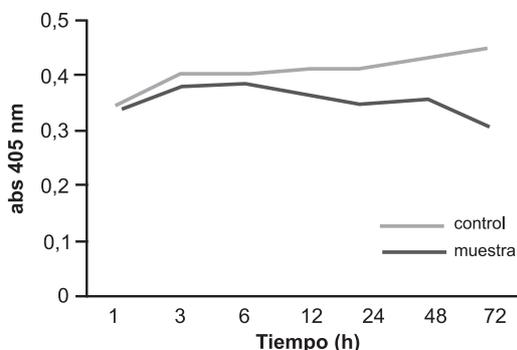


**Figura 3.** Deglicosilación de la TLE-Bb analizada por PAGE-SDS. (a) Marcadores de peso molecular; (b) Enzima tratada con O-glicosilasa; (c) Enzima tratada con N-glicosidasa F; (d) Enzima nativa.

### Rol de los Carbohidratos en la actividad enzimática

Cuando la proteína fue deglicosilada sin agentes denaturantes, para evitar la desnaturación de la enzima, se evidenció una

disminución de la actividad amidolítica que fue proporcional al tiempo de incubación con la glicosilasa F (Figura 4 ).



**Figura 4.** Efecto de la deglicosilación de TLE-Bb a diferente tiempo de incubación.

#### 4. DISCUSIÓN

De acuerdo a los datos mostrados se ha logrado obtener una glicoproteína que posee actividad amidolítica y coagulante sobre plasma humano del veneno de la serpiente peruana *Bothrops barnetti*. Al igual que la mayoría de enzimas glicosiladas halladas en los venenos de serpientes, la proteína aislada posee los azúcares en unión N-Linked<sup>[11]</sup>, que es el tipo de glicosilación mayoritario en la célula, especialmente en aquellas proteínas que van a ser secretadas<sup>[1,2]</sup>.

Las actividades amidolítica y coagulante son propias de las proteínas denominadas enzimas similares a trombina (del inglés Thrombin Like Enzymes, TLE) aislada en su mayor parte de vipéridos americanos. Estas enzimas están relacionadas con los procesos de alteración a nivel del sistema hemostático tanto de las presas naturales como en el hombre cuando se producen los casos de ofidismo<sup>[4, 11]</sup>.

El peso molecular de la enzima purificada, está en el rango de 48 a 52 kDa, lo que la ubica entre las enzimas de este grupo con los mayores pesos encontrados. La estructura unicatenaria para esta enzima es común en todas las TLEs estudiadas<sup>[11]</sup>. Además,

se logró evidenciar la presencia de puentes S-S en la proteína, los cuales son reducidos por el β-mercaptoetanol, no tienen un papel crucial en la actividad enzimática, lo que indicaría que dichos puentes estarían ubicados en un dominio alejado del sitio activo.

El contenido de los carbohidratos representa el 48% de la proteína, esta cantidad indica un papel significativo ya sea en la estructura o función de la enzima, sin embargo este porcentaje puede ser aún mayor como es en el caso de la proteasa A de la serpiente brasileña *Bothrops jararacá*<sup>[12]</sup>.

Fucosa, hexosa, ácido siálico, N-acetyl-D-glucosamina (GlcNAc) galactosa, manosa y N-acetyl- ácido neuroamínico (NeuAc) son los que conforman el esqueleto de carbohidratos asociados a las glicoproteínas de este tipo<sup>[4]</sup>; siendo la manosa el componente que presenta mayor unidades al core. El esqueleto de carbohidratos se asocia al motivo proteico Asn-X-ser/thr de las proteínas (donde X es cualquier aminoácido excepto prolina)<sup>[13]</sup>.

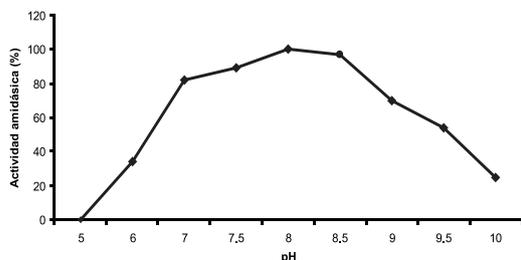
El papel que tienen los carbohidratos en glicoproteínas puede ser otorgar un correcto plegamiento, dar estabilidad a la proteína y participar en su correcta funcionalidad ante cambios bruscos del medio en que van a actuar<sup>[14]</sup>.

Este último punto es de consideración debido a que las proteínas ofídicas actúan en un ambiente muy diferente de donde se producen<sup>[4]</sup>.

Se evidencia lo dicho anteriormente, por la disminución en la actividad amidolítica de la enzima después haber sido tratada con la enzima bacteriana recombinante PNGasa F.

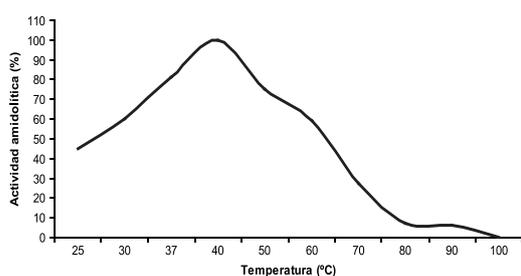
La enzima purificada comparte características bioquímicas semejantes con otras aisladas en serpientes. El efecto del pH sobre la actividad enzimática radica en una interacción de las cargas del medio con los grupos COOH y NH<sub>2</sub> de la proteína promoviendo una pérdida en la conformación terciaria de la proteína<sup>[1]</sup>. Sin embargo, la enzima

purificada evidenció una resistencia ante los cambios de pH, lo que estaría involucrando a los carbohidratos en un papel protector de la enzima tanto a nivel estructural como funcional.



**Figura 5.** Curva de actividad de la Enzima Similar a Trombina del veneno de *Bothrops barnetti* a diferentes pH.

El efecto desnaturante de la temperatura sobre una proteína principalmente radica en el desplegamiento llevándola a su conformación primaria<sup>[1,2]</sup>. Se ha determinado que los carbohidratos mantienen la temperatura de melting original de las enzimas cuando esta forman un complejo con su sustrato respectivo<sup>[13]</sup>. La proteína en estudio no posee un rango elevado de termoestabilidad sin embargo llega a mantener su actividad hasta los 50 °C.



**Figura 6.** Efecto de la temperatura sobre la actividad de la enzima similar a trombina de *Bothrops barnetti*.

La fuerte inhibición de la actividad enzimática por parte de PMSF, así como la significativa inhibición del inhibidor de la tripsina de soya, sugieren fuertemente que la glicoproteína se comporta al igual que la trombina, una seri-

noproteasa involucrada en los procesos de coagulación sanguínea<sup>[4]</sup>, pero una notable diferencia con esta última radica en que no es inhibida por el mucopolisacárido heparina.

## 5. CONCLUSIONES

El veneno de la serpiente peruana *Bothrops barnetti* contiene una glicoproteína de mediano peso molecular con actividad amidolítica y coagulante del plasma humano. Esta enzima posee al menos un puente disulfuro y muestra semejanza funcional con las serinoproteasas.

## 6. AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al CONCYTEC y al Consejo Superior de Investigación (CSI)-VRI de la UNMSM, por el apoyo brindado en la ejecución del presente trabajo.

## 7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Lehninger, A.; Nelson, D. y Cox, M. *Principios de bioquímica*. Editorial Omega. 2.ª ed., Barcelona, pp. 134-197, 2001.
- [2] Alberts, B.; Bray, D.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K. y Watson, J. *Biología Molecular de la Celula*. Ediciones Omega. 4.ª ed. Barcelona, pp. 632-617, 1996.
- [3] Tippson S and Horton S. "Advances in Carbohydrate Chemistry And Biochemistry". Academic Press. Vol. 46 San Diego, pp. 251-271, 1988.
- [4] Stocker, K.. *Medical Use of snake venoms protein*. CRCPress, Boca Raton, FL., 1990.
- [5] Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-685, 1970.
- [6] Erlanger, B.; Kokowsky, N. and Cohen, W. The preparation and properties of two new chromogenic substrates of

- trypsin. *Arch Biochem Biophys*, 95: 271-278, 1961.
- [7] Copley, A. Studies of snake venoms on the blood coagulation. The thromboserpentin enzyme in the venoms. *Thrombos Res*, 2: 487-508, 1973.
- [8] Dubois, A. Gilles, K.; Hamilton, A. Rebers, and Smith, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem*, 28: 350-356, 1956.
- [9] Winzler R. Determinations of serum glycoproteins. En: *Methods of Biochemical Analysis*, 2: 279-311, 1995.
- [10] Warren L. The thiobarbituric acid assay of sialic acids. *J Biol Chem*, 234(8): 1971-5, 1959.
- [11] Castro, H.; Zingali, R.; Albuquerque, M.; Pujol-Luz, M. and Rodrigues, C. Snake venom thrombin-like enzymes: from reptilase to now. *Cell Mol. Life Sci.*, 61: 843-856, 2004.
- [12] Murayama, N., Saguchi, K., Mentele, R., Assakura, M.T., Ohi, H., Fujita, Y., Camargo, A.C.M., Higuchi, S., Serrano, S.M.T. The unusual high molecular mass of Bothrops protease A, a trypsin-like serine peptidase from the venom of Bothrops jararaca, is due to its high carbohydrate content. *Biochim. Biophys. Acta*, 1652, 1-6, 2003.
- [13] Imperiali, B.. O'Connor, S.E. Effect of N-linked glycosylation on glycopeptide and glycoprotein structure, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 3, 643-649, 1999.
- [14] Silva-Junior, F.; Guedes, H.; Garvey, C.; Aguiar, A.; Bourguignon S.; Di Cera, E. and Giovanni-De-Simone S. BJ-48, a novel thrombin-like enzyme from the Bothrops jararacussu venom with high selectivity for Arg over Lys in P1: Role of N-glycosylation in thermostability and active site accessibility. *Toxicon*, 50(1): 18-31, 2007.