AUTARQUIA ASSOCIADA À UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DA DELTA TOXINA DO VENENO DE *Crotalus durissus terrificus*

LUCÉLIA DE ALMEIDA CAMPOS

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do Grau de Mestre em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear - Aplicações.

Orientador:
Patrick Jack Spencer

São Paulo
2006

INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
Autarquia Associada à Universidade de São Paulo

ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DA DELTA TOXINA DO VENENO DE *Crotalus durissus terrificus*

IPEN
LIVRO
23366
BIBLIOTECA

LUCÉLIA DE ALMEIDA CAMPOS

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do Grau de Mestre em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear – Aplicações.

Orientador:
Patrick Jack Spencer

SÃO PAULO
2006

[redacted]SÃO [redacted] NUCLEAR/SP-[redacted]

"São fúteis e cheias de erros as ciências que não nasceram da experimentação, mãe de todo conhecimento"

Leonardo da Vinci

Aos meus pais, Claudio e Sonia, dedico esse trabalho.

Obrigada pelo apoio incondicional, o amor e toda a força e coragem que me deram para concluir mais essa etapa da minha vida.
Devo tudo a vocês!

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pela proteção e força para trilhar os caminhos da vida.

Aos meus pais. Cláudio e Sonia, pelo total apoio, confiança, dedicação durante todo esse tempo e por dividirem comigo os melhores momentos de minha vida.

Ao meu orientador e amigo Dr. Patrick Jack Spencer, pela amizade, confiança e por compartilhar comigo seus conhecimentos, experiências profissionais e de vida.

Ao meu irmão Marcelo, por estar sempre por perto e me chamar de *nerd.*

Ao meu namorado André, pelo amor e apoio durante todos esses anos e pela ajuda com o Photoshop.

Á Dra. Maisa Splendore Della-Casa do Instituto Butantan, pelo auxílio nos ensaios de agregação plaquetária, além da grande amiga que ganhei.

À Dra. Ana Moura do Instituto Butantan, pela disponibilização do laboratório e dos equipamentos.

À Dra. Ruth Vassão do Instituto Butantan, muito obrigada pelo apoio, incentivo e principalmente pela relação de amizade que construímos com muitas risadas.

À Dra. Nanci do Nascimento pela ajuda na correção e revisão do trabalho.

Às Dras. Olga Zazuco Higa, Ligia Ely Morganti Ferreira Dias e Maria Aparecida Pires Camilo. obrigada pela ajuda e disponibilização de reagentes e aparelhos.

À Dra. Mirian Camargo Guarnieri da Universidade Federal de Pernambuco, pela amizade e disponibilização de reagentes.

Às amigas Milena e Ilca da Universidade Federal de Pernambuco, pela ajuda nos experimentos, palavras de apoio e principalmente pela amizade.

Ao Dr. Rui Seabra Ferreira Jr. do Centro de Estudos de Venenos e Animais Peçonhentos de Botucatu, pelo fornecimento do veneno.

Ao Dr. Daniel Pimenta do Instituto Butantan, pela realização da análise de massa.

Ao Dr. Ivo Lebrun do Instituto Butantan, pelas primeiras tentativas com experimentos de análise de aminoácidos.

À Dra. Esther Ricci. pela ajuda na realização do gel 2D e discussão dos dados.

À Daniela Nardi, da Universidade Federal de São Paulo. pela ajuda nos ensaios conclusivos de análise de aminoácidos.

Ao amigo Johnny, pela ajuda na padronização nas técnicas de purificação e principalmente pela amizade.

Ao amigo Murilo Casare, obrigada pela ajuda nas cromatografias e principalmente pelos momentos de descontração no laboratório.

À amiga Janaína, pela correção do trabalho, ajuda na bancada e por estar sempre por perto em todos os momentos.

Ao amigo José Alberto "Troxa" da Silva, obrigada pela amizade e momentos de descontração com todas as histórias engraçadas contadas por você.

Ao amigo Júnior, obrigada pelos longos papos sobre mistérios que existem entre o céu e a terra.

Ao amigo Andrés pelas histórias engraçadas e criação de fotos e vídeos comprometedores do pessoal do laboratório.

Às minhas "irmãs" Fernanda Calvo e Milena, obrigada por estarem sempre por perto.

Às amigas, Natália. Daniela, Rosa, Solange, Priscila, muuuuito obrigada pelo apoio e amizade durante todos esses anos.

Às minhas grandes amigas de graduação, Fefa, Patruca, Maricota, Danisbela e Mayra (Cô), muito obrigada pela amizade, apoio e momentos de besteirol!

A todos os funcionários e amigos do IPEN, Dona Ge, Edu. Longino pela manutenção e organização dos laboratórios.

À Neidinha, pelos momentos de risadas na copa.

A CAPES pelo apoio financeiro.

ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DA DELTA TOXINA DO VENENO DE *Crotalus durissus terrificus*

Lucélia de Almeida Campos

RESUMO

O veneno de *C. d. terrificus* tem sido descrito como sendo de pouca complexidade, tendo 4 frações caracterizadas, convulxina, giroxina, crotoxina e crotamina. O presente trabalho visou o isolamento e caracterização da Delta toxina cuja existência havia sido aventada em trabalhos anteriores.

Após a realização de uma varredura de tampões em uma coluna de exclusão molecular Superdex-75 acoplada a um sistema FPLC, na presença de três diferentes tampões, chegou-se a uma condição ideal de fracionamento do veneno crotálico. Em seqüência realizou-se a segunda etapa de purificação em sistema HPLC em uma coluna C4, onde foi possível identificar o pico de interesse. O pico puro passou por análises em MALDI-ToF sendo sua massa estimada em 14.074,92 Da, Quando analisado por eletroforese em gel de poliacrilamida, a delta toxina apresentou massa molecular de cerca de 14 kDa e uma migração anômala, Por eletroforese 2D, a proteína apresentou caráter ácido, com pI entre 4 e 5 e massa molecular de aproximadamente 42 kDa, revelando *"spots"* muito semelhantes podendo ser isoformas com características de uma proteína glicosilada. Após digestão dos spots com tripsina, os fragmentos foram confrontados com o banco de dados do "swissprot", mostrando alto grau de homologia "até 43% de cobertura" com a trocarina, um ativador de protrombina do veneno de *Tropidechis carinatus*, esses dados foram confirmados com a análise de aminoácidos.

De posse desses resultados, optou-se por testar a capacidade da fração purificada de ativar fator X e II, usando substratos sintéticos. Os resultados apontaram para uma ativação direta do fator X, uma vez que não houve ativação do fator II, atividade que também não foi detectada no veneno total. A mesma se mostrou um potente ativador da agregação de forma direta, uma vez que os ensaios de agregação plaquetária foram realizados com plaquetas lavadas, logo na ausência de fatores séricos. Quando os ensaios de agregação foram realizados na presença de alguns inibidores observou-se que nem a atividade metalo proteinase, nem a serino proteinase, tampouco um domínio lectina estavam envolvidos no processo, uma vez que EDTA, benzamidina e D-galactose não inibiram a atividade da proteína.

No presente trabalho isolamos a Delta toxina do veneno de *C. d. terrificus*. A mesma se comportou como previsto por Vital Brazil em 1980, eluindo na posição por ele aventada, sendo uma proteína ativadora de Fator X que ativa agregação plaquetária mesmo em concentrações muito baixas e de massa molecular de 40 kDa levando nos a crer se tratar de um homotrímero cujos componentes são unidos por ligações fracas.

ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF DELTA TOXIN FROM THE VENOM OF *Crotalus durissus terrificus*

Lucélia de Almeida Campos

ABSTRACT

The *Crotalus durissus terrificus* venom has been so far described as being of low complexity, with four major components described: convulxin, gyroxin, crotoxin and crotamine. In recent studies, other components of this venom were characterized as, for example, an analgesic factor. In 1980, Vital Brazil predicted the existence of a toxin which could be involved in platelet aggregation, and named it delta toxin. However, this toxin has never been isolated or characterized. The aim of the present work was to purify and characterize this toxin.

After FPLC size exclusion chromatography followed by reverse phase HPLC, an homogeneous fraction was obtained, with a molecular weight of 14,074.92 Da. When analyzed by SDS-PAGE, this toxin presented an anomalous behavior, with a molecular weight of 14 kDa, while in 2D gels, spots around 40 kDa and with an isoelectrical point between 4 and 5 were observed suggesting isoforms with glicosilation microheterogeneity. After trypsin digestion, the fragments were submitted to the swissprot databank showing high homology (43% coverage, 15 matching peptides) with trocarin, a prothrombin activator from *Tropidechis carinatus*. These data were further confirmed by aminoacid analysis.

The toxin was tested for its ability to activate factor II and X using synthetic substrates. Our data indicate a direct activation of factor X. The same toxin also behaved as a potent direct platelet aggregation activator on washed platelets. Assays with specific inhibitors indicate that neither metalloproteinase, nor serinoproteinase or t lectin domains are involved in the aggregating activity, since EDTA, benzamidin and D-galactose did not inhibit the toxin.

In the presentent work, we were able to identify, purify and characterize a new toxin from the brazilian rattlesnake. It behaved as predicted by Vital-Brazil and displayed direct factor X activating properties, also inducing platelet aggregation, even at low concentrations. Our data also indicate that it is probably a homotrimer with the subunities linked by hydrophobic and/or electrostatic interactions.

COMISSÃO NACIONAL DE ENERGIA NUCLEAR/SP-IPEN

SUMÁRIO

		Página
1.	**INTRODUÇÃO**	01
1.1.	Hemostasia	07
2.	**OBJETIVOS**	11
3.	**MATERIAIS E MÉTODOS**	12
3.1.	Varredura de tampões	12
3.2.	Purificação do veneno crotálico (FPLC) – Exclusão Molecular	12
3.3.	Cromatografia de Fase Reversa (HPLC)	13
3.4.	Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (SDS-Page)	14
3.5.	Eletroforese Bidimencional	15
3.6.	Seleção e Digestão dos "Spots"	17
3.7.	MALDI-ToF	18
3.8.	*Peptide Mass Fingerprint* por MALDI-ToF	19
3.9.	Análise de Aminoácidos	20
3.10.	Agregação Plaquetária	20
3.10.1.	Obtenção do Plasma rico em Plaqueta	20
3.10.2.	Plaquetas Lavadas	21
3.10.3.	Inibidores de serino, metalo proteinases e lectina	22
3.11.	Ativador de Fator X	22
3.12.	Ativador de Fator II	22
3.13.	Western Blotting	23
4.	**RESULTADOS**	25
4.1.	Varredura de tampões	25
4.2.	Purificação do veneno crotálico (FPLC) – Exclusão Molecular	27
4.3.	Cromatografia de Fase Reversa (HPLC)	27
4.4.	Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (SDS-Page)	30
4.5.	Eletroforese Bidimencional	31
4.6.	Seleção dos "Spots" e *Peptide Mass Fingerprint* por MALDI-ToF	32
4.7.	MALDI-ToF	33
4.8.	Análise de Aminoácidos	36
4.9.	Agregação Plaquetária	37
4.9.1.	Inibidores [illegible] rino, metalo proteinases e lectina	39
4.10.	Ativa[illegible]	41
4.11.	Ativador de Fator II	42
4.12	[illegible]stern Blotting	43
[illegible]	[illegible]SÃO	44
[illegible]	CONCLUSÕES	49
7.	**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**	50

LISTA DE ABREVIATURAS

CK	Creatinoquinase
kDa	quilodaltons
mg	miligramas
FPLC	Fast Protein Liquid Chromatograph
HPLC	High Performance Liquid Chromatograph
nm	nanômetros
TFA	Ácido trifluoro acético
SDS	Duodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS
pI	Ponto isoelétrico
DTT	Ditiotreitol
V	Volts
Tris	Tris (hidroximetil)-aminometano
A	Amperes
MALDI-ToF	Matrix-assisted laser desorption ionization – time of flight
PMF	Peptide Mass Fingerprint
HCL	Ácido Clorídrico
g	Força centrífuga relativa
PL	Plaqueta Lavada
ADP	Adenosina difosfato
PBS	Tampão Fosfato Salina
EDTA	Ácido etilenodiamino tetracético
PMSF	Fenil metilsulfonil fluoreto
DAB	3,3' Diaminobenzidina
2D	Bidimensional
HEPES	Ácido 2-[4-(2-hidroxietil)-1-piperazinil]etanosulfônico
CHAPS	3-3[(3-cholamidopropyl)dimethyl-ammonio]-1-propanesulfonate

1. INTRODUÇÃO

Os venenos ofídicos são provavelmente os fluídos secretórios de vertebrados mais concentrados de que se têm notícias (Stocker, 1990) e são compostos por proteínas e peptídeos que representam acima de 90% do peso seco. Estas biomoléculas são as responsáveis pelas atividades tóxicas e biológicas das peçonhas de serpentes.

Já foram descritas inúmeras toxinas e enzimas com um vastíssimo espectro de atividades (Theakston & Kamiguti, 2002). Entre elas podemos citar enzimas que atuam em diversos pontos da cascata da coagulação (Monteiro & Zingali, 2002, Rucavado *et al.* 2001), toxinas que atuam em canais iônicos, proteases que interferem com a integridade do endotélio (Zamuner & Teixeira, 2002), fosfolipases (Lizano *et al.*, 2001), L-amino ácido dehidrogenases (Tempone *et al.*, 2001).

Os venenos, assim como outras substâncias naturais têm despertado um grande interesse pela diversidade de princípios ativos que encerram e pelo potencial que estes compostos apresentam de levar à síntese de novas drogas ou ao desenvolvimento de novas ferramentas nas áreas de farmacologia, hemostasia, neurofisiologia e outras.

O veneno da serpente *Crotalus durissus terrificus* tem sido descrito como de pouca complexidade. Essa serpente encontra-se distribuída no Brasil nas zonas altas e secas, sul oriental e meridional, desde o Rio Grande do Sul até Minas Gerais. Sua denominação popular é cascavel ou boiquira. O veneno apresenta efeitos importantes sobre os músculos esqueléticos, sistema nervoso, rins e sangue. Outros órgãos como o fígado também pode ser acometido

(Barravieira, 1994). O veneno crotálico também induz rabdomiólise generalizada, mialgia, aumento dos níveis de creatinoquinase (CK) acompanhado de mioglobinúria e dor por todo o corpo (Sano-Martins *et al.*, 2001). A letalidade dos acidentes ofídicos envolvendo serpentes do gênero Crotalus tem o maior índice observado, com 1,87% de óbito (FUNASA/MS, 2001). A soroterapia é o tratamento mais adequado para os casos de acidentes ofídicos, o soro anticrotálico deve ser administrado intravenosamente e a dose varia de acordo com a gravidade do caso. A hidratação adequada é fundamental para a prevenção da insuficiência renal aguda (FUNASA/MS).

Foram isoladas e caracterizadas 4 principais toxinas deste veneno: convulxina, giroxina, crotoxina e crotamina (Takeda *et al.*, 1985).

A convulxina foi isolada em 1970 por Prado-Franscesci, é uma glicoproteína neurotóxica de alto peso molecular, cerca de 70 kDa provoca distúrbios no sistema nervoso autônomo, efeitos como convulsões tônico-clônicas, perda de equilíbrio, alterações circulatórias e respiratórias, ativação e agregação plaquetária, na ausência de fibrinogênio. Esta proteína foi descoberta após observarem que efeitos como alterações respiratórias e circulatórias não poderiam ser atribuídos as toxinas já isoladas na época como a crotoxina e a crotamina (Vital Brazil, Prado-Franceschi & Ezequiel Waisbich, 1967; Prado-Franceschi & Vital Brazil, 1981,Vargaftig, 1983).

Outro grupo de componentes do veneno é o das enzimas, entre as quais, pela importância clínica, destaca-se uma enzima tipo trombina demonstrada por Nahas e isolada por Raw *et al.* em 1986, provavelmente envolvida nos distúrbios

da coagulação sanguínea observada em cerca de 40% dos pacientes (Azevedo Marques *et al.*, 1992).

As alterações observadas nos fatores de coagulação estão relacionadas à enzima tipo trombina, um componente das frações do veneno que tem a capacidade de transformar *in vitro*, fibrinogênio em fibrina, isto resulta em um consumo de fatores de coagulação e, conseqüentemente, na incoagulabilidade sanguínea (Barravieira, 1994).

A giroxina possui peso molecular de 33 kDa e provoca síndrome convulsiva, caracterizada por movimentos circulatórios ao longo do seu eixo longitudinal do corpo lembrando o rolar de um barril (Silva 2004), característico em camundongos. A giroxina também apresenta atividade coagulante do fibrinogênio no plasma, exercendo assim uma atividade do tipo trombina (Barrio, 1961; Alexander *et al.*, 1988).

A crotoxina foi primeiramente descrita como a proteína majoritária do veneno, possui 23 kDa, representa 60% do veneno total de *Crotalus durissus terrificus* apresenta alta toxicidade (Slotta & Fraenkel-Conrat. 1938). É uma neurotoxina pré-sinaptica que atua nas terminações nervosas motoras inibindo a liberação de acetilcolina pelos impulsos nervosos, sendo este o principal fator responsável pelo bloqueio neuromuscular e portanto pelas paralisias motoras e respiratórias observadas nos animais (Vital Brazil & Bárbara Excell, 1970; Azevedo Marques *et al,* 1992). Esta neurotoxina é composta por duas sub-unidades ligadas não covalentemente. A sub-unidade ácida é enzimaticamente inativa e não possui toxicidade, é também conhecida como crotapotina e potencializa a ação da fosfolipase (sub-unidade básica) (Bon *et al.*. 1986).

A crotamina é um polipeptídeo básico de 4.8 kDa que atua na membrana das fibras musculares alterando sua permeabilidade ao sódio, produzindo espasmos musculares (Moura Gonçalves e Laura Gouvêa, 1950; Azevedo Marques *et al.*, 1992).

Apesar da extensa literatura a respeito deste veneno e de seus componentes, poucos trabalhos têm focado o isolamento de eventuais toxinas ainda não descritas, levando a crer que este veneno encerra unicamente os componentes acima descritos. No entanto, evidências apontam para a presença de outros constituintes. Entre eles, podemos citar a hialuronidase, que vem sendo isolada por um grupo de Ribeirão Preto (Bomfim, comunicação pessoal). Uma fração de baixo peso molecular e com potente ação analgésica está parcialmente isolada

Vital-Brazil (1980) sugeriu a existência de uma toxina que eluiria entre a convulxina e a giroxina quando o veneno é fracionado por cromatografia de exclusão molecular e que estaria envolvida na agregação plaquetária, alteração da permeabilidade vascular e causar grande hemoconcentração. Esta proteína foi então denominada por ele de delta toxina (Vital Brazil, 1980). Apesar de citada na literatura, esta toxina nunca foi isolada, tampouco caracterizada.

A maioria dos trabalhos que envolvem fracionamento do veneno de *C.d. terrificus* utiliza resinas cromatográficas de baixa resolução, resultando em 4 picos principais, que representam as toxinas acima descritas. No trabalho de Nascimento (1991), a purificação do veneno crotálico em resina Sephadex G75 resultou em quatro frações como mostra a Figura 1.

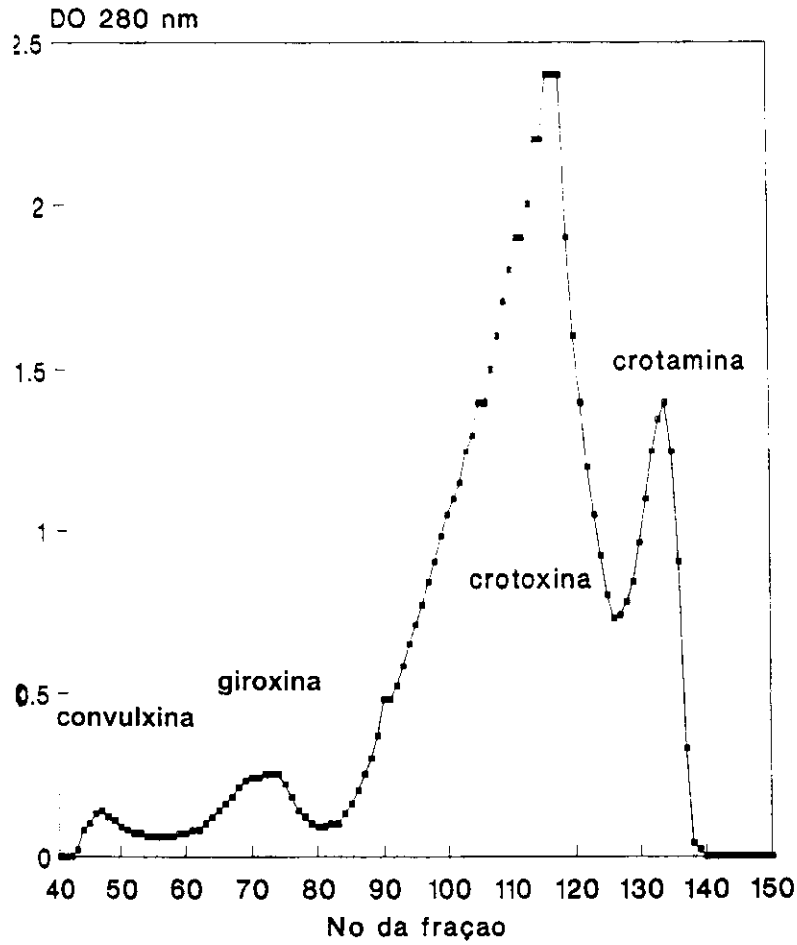


Figura.1 - Perfil de eluição de veneno crotálico em resina Sephadex G75. Fluxo 12mL/hora

Em experimentos recentes, que utilizaram resinas mais modernas (maior resolução), foi possível verificar um pico adicional na mesma posição descrita por Vital Brazil. Na Figura 2 está representado o perfil cromatográfico do veneno de *C.d. terrificus*, usando uma resina Superdex 75 (Casare, 2003).

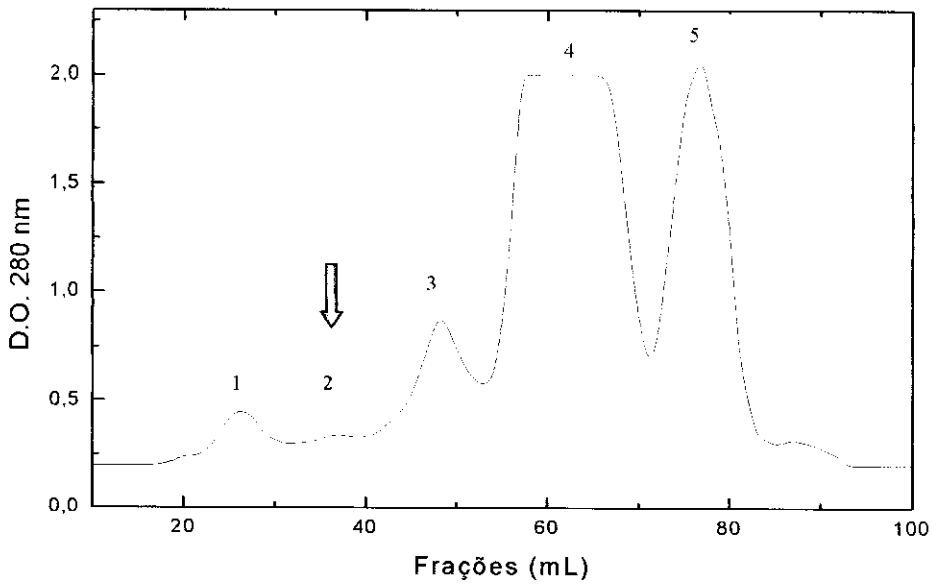


Figura.2 - Perfil de eluição de veneno crotálico em resina Superdex 75
Fluxo: 30 ml/hora.

Análises preliminares desta fração, por eletroforese em gel de poliacrilamida, indicam a existência de bandas cujo peso molecular não é compatível com aqueles previamente descritos, sugerindo que nesta fração se encontram biomoléculas ainda não relatadas no veneno crotálico. Além do interesse acadêmico, a análise destes componentes também pode ser relevante do ponto de vista clínico, uma vez que, estas toxinas podem ter papel importante na patologia do acidente crotálico.

1.1 Hemostasia

A hemostasia é um processo pelo qual o organismo torna-se capaz de estancar um sangramento e manter o sangue fluido dentro do compartimento vascular.

A coagulação consiste em uma série de mecanismos bioquímicos com a finalidade de consolidar o tamponamento através da deposição de redes de fibrina. Esse sistema envolve os vasos sanguíneos, as plaquetas, os fatores pró-coagulantes plasmáticos e agentes fibrinolíticos. Existe ainda sistema calicreína-cinina e os inibidores das serino proteases (fatores coagulantes) e cada fator plasmático têm uma propriedade específica (Oliveira, 1998).

O coágulo sanguíneo se forma de acordo com as três etapas citadas: Primeiro uma substância, ou um complexo de substâncias, denominada ativador de protrombina é formado em resposta à ruptura de um vaso ou lesão. Segundo, o ativador da protrombina catalisa a conversão de protrombina em trombina. Terceiro, a trombina atua como uma enzima para converter o fibrinogênio (solúvel) em fibrina (insolúvel) aos quais aderem plaquetas, eritrócitos e plasma, formando o coágulo (Guyton, 1999).

A cascata de coagulação pode ser desencadeada após uma lesão por dois processos:

Via Extrínseca:

Principal via de inicialização da coagulação sanguínea que envolve componentes do sangue e elementos vasculares.O processo se inicia quando o sangue entra em contato com um tecido extravascular traumatizado, e este libera dois fatores que desencadeiam o processo de coagulação: o fator tecidual que é

uma enzima proteolítica e os fosfolipídios teciduais, presentes nas membranas celulares.

O fator tecidual combina-se com o fator VII da coagulação e este complexo na presença de fosfolipídios teciduais atuam sobre o fator X formando o FXa. Este combina-se imediatamente com os fosfolipídios e também com o fator V, formando o complexo denominado ativador da protrombina. Este converte a protrombina em trombina, dando continuidade ao processo de coagulação.

Via Intrínseca:

Após o trauma, o segundo mecanismo inicia-se quando dois fatores da coagulação são alterados, o fator XII e as plaquetas. Quando o FXII entra em contato com o colágeno, ele se converte em uma enzima proteolítica denominado FXII ativado. Simultaneamente o trauma lesa as plaquetas que liberam fator plaquetário III.

O Fator XIIa ativa o Fator XI transformando em FXIa, que por sua vez reage enzimaticamente com o Fator IX passando para a forma FIXa.

O FIXa em ação conjunta com o Fator VIII e fosfolipídios plaquetários ativam o Fator X. Agora com o FXa em combinação com o FV formarão um complexo ativador de protrombina (Guyton, 1999).

No final do processo de coagulação ambas vias são processadas e resultam no ponto comum de formação de FXa, o qual é responsável pela geração de trombina. Assim a trombina converte fibrinogênio em monômeros de fibrina que sofrem a ação do FXIII através de uma reação de trans-glutaminação formando polímeros de fibrina. Por outro lado, o plasminogênio, sob ação de

ativadores de plasminogênio (uPA ou tPA) é transformado em plasmina a qual degrada fibrina em vários fragmentos (Rissi-Silva, 2004).

Atualmente são conhecidos mais de 100 diferentes tipos de venenos de serpentes que afetam o sistema hemostático por vários mecanismos (Marckland, 1998)

O envenenamento causado por *C.durissus* é freqüentemente associado a disfunção hemostática, provavelmente pela ação de enzimas trombina-simile. Os distúrbios de coagulação tem sido descritos em cerca de 50% dos pacientes picados por *C.durissus* (Sano-Martins *et al.*, 2001)

A maioria das serpentes da família Crotalidae apresenta enzimas responsáveis pelos efeitos hemostáticos dos envenenamentos. O mecanismo pelo qual estas proteínas podem atuar é variado (Stocker *et al.*, 1982). Dentre os componentes dos venenos ofídicos, vários são os que afetam o mecanismo hemostático, incluindo a coagulação, a fibrinólise, a função plaquetária e a integridade vascular.

A atividade pró-coagulante dos venenos tem como alvo principalmente os últimos fatores da cascata de coagulação, como por exemplo o fibrinogênio, a protrombina e o Fator X (Joseph *et al.*, 1999).

Enzimas que atuam sobre o fibrinogênio para formar fibrina, denominadas trombina-símile, foram isoladas de venenos de serpentes. Algumas destas enzimas clivam conjuntamente, as cadeias Aa e Bb do fibrinogênio, liberando os fibrinopeptideos A e B. Outras clivam apenas a cadeia Aa , liberando o fibrinopeptideo A (Stocker *et al.*, 1982).

COMISSÃO NACIONAL DE ENERGIA NUCLEAR/SP-IPEN

As serino proteases dos venenos ofídicos estão entre as enzimas que afetam o sistema hemostático. Em geral essas proteínas afetam as vias da cascata da coagulação, ativando especificamente componentes do sangue envolvidos na coagulação, levando à fibrinólise e agregação plaquetária ou degradação proteolítica (Serrano & Maroun, 2005).

O isolamento de novas toxinas que modulam a hemostasia, é de importância fundamental nos estudos clínicos e na pesquisa científica, no sentido de fornecer novas ferramentas para o estudo dos mecanismos envolvidos na cascata da coagulação.

2. OBJETIVO

O presente trabalho visa determinar as condições ideais para isolar a delta toxina do veneno total de *Crotalus durissus terrificus* e caracterizar a mesma do ponto de vista bioquímico, assim como identificar os seus possíveis alvos fisiológicos.

3. *MATERIAIS E MÉTODOS*

O veneno de *Crotalus durissis terrificus* foi gentilmente cedido pelo Centro de Estudos de Venenos e Animais Peçonhentos CEVAP-Botucatu.

3.1. Varredura de tampões

Em uma coluna Superdex 75 de exclusão molecular, testaram-se diferentes tampões para determinar aquele que resultaria em uma melhor resolução das frações purificadas.

Para tal, 25 mg de veneno crotálico foram dissolvidos em 1,2 mL do tampão apropriado, centrifugados e o sobrenadante foi injetado em uma coluna Superdex 75 (1,6 x 70 cm), acoplada a um sistema FPLC, previamente ambientada no mesmo tampão. A cromatografia foi realizada no modo analítico sem a coleta do eluato.

O processo foi realizado utilizando-se os tampões formiato de amônio (0,1M pH 3.0), acetato de sódio (0,1M pH 5.0) ou citrato de sódio (0,1M pH 5.0).

3.2. Purificação do veneno crotálico (FPLC) – Exclusão Molecular

A cromatografia por exclusão molecular baseia-se na separação de proteínas de acordo com seus pesos moleculares. É a técnica ideal para amostras com pouco volume. As amostras são eluídas na presença de um

simples tampão sem gradiente (Fischer, 1990; Amersham Pharmacia biotech, 1999).

Sucessivas purificações foram realizadas para a obtenção da toxina de interesse.

Alíquotas de cerca de 100 mg de veneno foram dissolvidas em 1,2 mL de tampão formiato de amônio (0,1M pH 3.0). Essa solução foi agitada até a solubilização total do veneno e posteriormente centrifugada a 11.326 g em uma microcentrífuga. O sobrenadante foi injetado em uma coluna Superdex 75 (1,6 x 70 cm) de exclusão molecular acoplada a um sistema FPLC (Pharmacia), previamente ambientada com o tampão formiato de amônio. A absorvância do eluato foi medida a 280 nm. Foram coletadas frações de 1 mL por tubo.

Após as purificações a fração de interesse foi congelada e liofilizada.

3.3. Cromatografia de fase reversa (HPLC)

A cromatografia de fase reversa baseia-se na separação de proteínas e peptídeos de acordo com a interação reversível da amostra com a superfície hidrofóbica da coluna cromatográfica. A ligação é normalmente muito forte e requer o uso de um solvente orgânico para a eluição da proteína (Amersham Pharmacia biotec, 1999)

O segundo pico coletado depois da cromatografia de exclusão molecular, foi liofilizado e ressuspendido em 1 mL de TFA (Ácido trifluoro acético) 0,1%. A seguir este material foi injetado (400 µL/ corrida) em uma coluna de fase reversa Vydak C4 de 4,6 x 200 mm, precedida de uma pré-coluna do mesmo fabricante

conectada a um cromatográfo Shimadzu. Após uma lavagem com 5 mL de solução A (TFA 0,1%), para eluição da fração não adsorvida, iniciou-se um gradiente de 0 a 100% de B (acetonitrila mais 0,05% de TFA) em 20 minutos. Findo o gradiente, manteve-se esta condição por mais 5 mL, retornando-se então para a condição inicial. O fluxo utilizado foi de 1 mL/minuto e a absorvância do eluato foi monitorada a 220 nm. Com o intuito de identificar o pico de interesse, foram também injetadas alíquotas dos picos 1 e 3, permitindo assim eliminar os picos correspondendo aos contaminantes. Foi também realizada uma corrida falsa, utilizando apenas tampão, visando identificar possíveis ruídos na linha base.

3.4. Eletroforese em gel de Poliacrilamida (SDS-PAGE)

A eletroforese é uma técnica laboratorial usada para separação de macromoléculas de acordo com sua carga ou tamanho. Essa separação ocorre com a migração da proteína através de uma matriz de gel sob a influência de um campo elétrico. (Baptista, 2004).

Dissolveu-se 1 mg de veneno de *Crotalus durissus terrificus* em 500 µL de solução salina chegando a uma concentração final de 2 mg/mL. Amostras com veneno total foram preparadas com tampão de amostra com e sem agente redutor.

Um miligrama de delta-toxina liofilizada após fracionamento em FPLC foi diluído em 500 µL de água destilada. Amostras com a delta toxina semi-pura

foram preparadas com tampão de amostra em condições redutoras e não redutoras. O mesmo foi feito com o pico correspondente a Delta toxina após a purificação em sistema HPLC.

As amostras foram aquecidas a 95° C por 5 minutos, e posteriormente aplicadas em um gel de poliacrilamida a 12%, utilizando o sistema de tampões descrito por Laemmli, (1970) . No gel aplicou-se também um padrão de peso molecular conhecido. A voltagem foi fixada em 90 volts.

Finda a eletroforese, o gel foi corado com Coomassie blue 250-R, por 1 hora, sendo posteriormente descorado com solução contendo 30% de etanol e 10% de Ácido Acético.

3.5. Eletroforese Bidimensional

A Eletroforese 2D é um método usado para análise de complexos protéicos extraídos de amostras biológicas. Essa técnica separa proteínas de acordo com duas propriedades independentes em dois passos diferentes: o primeiro passo, a focalização isoelétrica, separa proteínas de acordo com o ponto isoelétrico (pI); O segundo passo, o SDS PAGE, eletroforese em gel de poliacrilamida, separa então as bandas da primeira dimensão de acordo com seu peso molecular.

Preparo da amostra:

Aproximadamente 1mg de amostra liofilizada resultante do pico 2 da exclusão molecular foi solubilizada em solução de rehidratação contendo uréia

8M. CHAPS 2%, tampão com carreadores de anfólitos 0.5% e azul de bromofenol. Instantes antes da rehidratação da tira, adicionou-se 0,3 μL de IPG Buffer (Amersham Biosciences) e 0,7 μL de DTT (Ditiotreitol), obtendo-se um volume total de 350 μL. Aplicou-se a solução sob a tira de 18 cm pH 4-7 e a rehidratação foi realizada no aparelho IPGphor (Amersham Biosciences) por 12 horas, sob voltagem de 30 V.

Após a hidratação, iniciou-se a focalização isoelétrica. Inicialmente, a tira foi submetida a uma diferença de potencial de 500 V por uma hora. A seguir, a voltagem foi aumentada para 1000 V por uma hora. Na última etapa, a voltagem foi elevada para 8000 V até atingir um total de 32000 V/hora.

Finda a focalização as tiras foram colocadas em 15mL de solução de equilíbrio contendo 50 mM de Tris-HCl, pH 8,8, 6M uréia, 30% Glicerol, 2% SDS (dodecil sulfato de sódio), azul de bromofenol e 65 mM de DTT (Ditiotreitol). Após 15 minutos sob agitação constante, a solução acima foi substituída por uma solução similar, substituindo o DTT por iodoacetamida 135 mM para promover a carboximetilação dos grupamentos tiol.

Na segunda dimensão, a tira foi posicionada sobre o gel de poliacrilamida (14%) 20x25 cm e em um dos lados foi colocado um marcador de peso molecular. Adicionou-se uma solução seladora contendo 0,5% de agarose em Tris 25 mM/Glicina 200 mM contendo 0,01% de SDS. A eletroforese foi efetuada em uma cuba Hoefer ® DALT (Amersham Biosciences) aplicando-se uma corrente de 30mA até que a frente de azul de bromofenol alcançasse a extremidade inferior do gel.

Após a corrida o gel foi fixado por duas horas em uma solução contendo 50% de metanol e 10% de ácido acético. A coloração foi feita "over night" em Coomassie Blue (Serrano, 2004).

3.6. Seleção e digestão dos "Spots"

Os "*spots*" foram analisados de acordo com o ponto isoelétrico e a massa molecular. Estes então foram recortados e colocados em "eppendorfs" individualmente identificados. O protocolo de digestão e extração abaixo baseou-se naquele descrito por Westermeier e Naven (2002).

Adicionou-se 100 μL de solução 75 mM de bicarbonato de amônio em etanol 40% para a remoção do corante, agitando-se a mistura e incubando-se por 10 minutos. Esse procedimento foi repetido até a descoloração total do gel.

As proteínas contidas no gel foram então reduzidas pela adição de DTT 5mM em bicarbonato de amônio 25 mM, incubando-se os tubos por 30 minutos a 60^0C.

Após a remoção da solução redutora, foram adicionados 10μL de iodacetamida 55 mM em bicarbonato de amônio 25 mM e esta mistura foi incubada no em câmara escura por 30 minutos à temperatura ambiente. Após a remoção do sobrenadante, os "spots" foram lavados com bicarbonato 25 mM seguido [illegible] acetonitrila. O gel foi então triturado e desidratado por sucessivas lavagens com acetonitrila (3x 25 μL, 10 minutos cada) e seco em "speed vac".

A rehidratação foi feita com a aplicação de 2 μL de tripsina (grau seqüenciamento) a 40 ng/μL e quantidade suficiente de tampão de bicarbonato de

amônio 50 mM para cobrir o gel por completo, mantendo-se o mesmo resfriado por 45 minutos. O sobrenadante foi retirado e adicionou-se a solução tampão (sem a enzima) até cobrir os pedaços de gel, mantendo o mesmo a 30°C por 16 horas.

Para a extração dos peptídeos adicionou-se 20 μL de bicarbonato de amônio 50mM e as amostras foram colocadas em banho de ultra-som por 10 minutos. Adicionou-se 20 μL de acetonitrila/ 5% TFA (1:1) e a amostra permaneceu em banho de ultra-som por mais 10 minutos. O sobrenadante foi transferido para outro tubo e o procedimento foi repetido por mais três vezes. Adicionou-se então 10 μL de acetonitrila e os spots foram colocados mais uma vez em banho de ultra-som por 10 minutos. O sobrenadante foi retirado e adicionado aos sobrenadantes anteriores.

3.7. MALDI-ToF

Espectrometria de massa é a análise ou separação de partículas carregadas em fase gasosa, tais como átomos e moléculas ionizadas, baseados em uma relação carga/massa. Os íons produzidos ma fonte de ionização são separados em um analisador e seguem para o detector (Aebersold & Mann, 2003; Lind et al, 2003).

Para a espectrometria de massa tipo MALDI-TOF, as análises foram realizadas com amostras pura e semi-pura de delta toxina, em um equipamento MALDI-ToF/Pro (Amersham). As amostras, em solução, foram misturadas na

proporção 1:1 (v:v) com uma solução supersaturada de matriz para peptídeos (ácido cinâmico) ou matriz para proteínas (ácido sinápico), depositadas sobre a placa de amostragem (0,4-0,8 µL) e deixadas secar no ambiente. Foi utilizado o modo automático de controle do equipamento e aquisição de dados.

3.8. Peptide Mass fingerprint por MALDI-ToF

Para o mapeamento peptídico, as proteínas são diferenciadas com base em seu padrão de fragmentação. A proteína é clivada na porção C-terminal dos aminoácidos básicos (ARG e LYS) após passar por uma digestão com tripsina (Ricci-Silva, 2004).

Para PMF (*peptide mass fingerprinting*) os íons detectados foram analisados pelo banco de dados local (pertencente ao software de controle e aquisição de dados) e/ou pelos bancos de dados públicos disponíveis na Internet, principalmente pelo MASCOT (Lin D. et al. 2003).

3.9. Análise de Aminoácidos

Técnica utilizada para determinação quantitativa dos aminoácidos que compõem uma dada proteína. Baseia-se na hidrólise ácida da ligação peptídica que une os aminoácidos e a quantificação destes em sistema cromatográfico automatizado.

COMISSÃO NACIONAL DE ENERGIA NUCLEAR/SP-IPEN

A composição de aminoácidos foi determinada através da hidrólise ácida e derivatização pós coluna, com ninidrina. Estes foram analisados em um analisador automático BioChrom 20 Plus (Amersham Biosciences), provido de válvulas injetoras de amostras. O sistema foi periodicamente calibrado com uma mistura padrão de aminoácidos, obtendo-se um valor para o tempo de eluição de cada aminoácido e um fator de correção entre a área de cada pico e a concentração de aminoácidos na amostra.

A amostra de proteína (+/- 1 mg) foi hidrolisada em 1 mL de HCl 6M, na presença de 0,08 mL de fenol a 5% em água (v/v), a 110°C por 72 horas em atmosfera de nitrogênio. Após a hidrólise, o material foi concentrado a vácuo, ressuspendido em citrato de sódio 0,2 M, pH 2,2 e filtrado em membrana Millipore, antes de ser injetado no aparelho (Poletti, 2006).

3.10. Agregação Plaquetária

3.10.1 Plasma rico em plaquetas

O sangue venoso humano de doadores saudáveis (9 mL) foi coletado em tubo plástico contendo 1 mL de citrato de sódio 3,8%. O sangue foi centrifugado durante 25 minutos a 129 g (centrifuga 5810R eppendorf) em temperatura ambiente para a obtenção do plasma rico em plaquetas (PRP).

3.10.2. Plaquetas lavadas

Para a obtenção de plaquetas lavadas (PL), EDTA 2% foi adicionado ao PRP na proporção 1:20 e esta mistura centrifugada por 15 minutos a 1258 g.

Após ser desprezado o sobrenadante, o "pellet" plaquetário foi dissolvido em 10 mL de tampão de lavagem (818 mg NaCl, 84 mg $NaHCO_3$, 19 mg KCl, 13 mg Na2HPO$_3$, 20 mg $MgCl_2$, 646 mg Na_3CitratO, 10 mg glicose. 350 mg BSA, dissolvidos em 100mL de H2O, pH ajustado para 6,5 com HCl) e a mistura centrifugada por 15 minutos a 1258 g. Após repetir a etapa anterior, novamente o sobrenadante foi desprezado e o "pellet" redissolvido em 2 mL de solução Tyrode (783 mg NaCl, 100 mg $NaHCO_3$, 22 mg KCl, 9 mg Na_2HPO_4, 20 mg $MgCl_2$, 14 mg $CaCl_2$, 238 mg HEPES pH ajustado para 7,4 com HCl) contendo glicose 1%. As plaquetas foram contadas em Serono-Baker 9020+AX System e ajustadas com solução Tyrode para atingir a concentração de 400 x 10^9/L.

Os efeitos da proteína sobre a agregação plaquetária, foram estudados por meio da incubação das mesmas com PL (plaqueta lavada) por 5 minutos a 37°C, sob agitação. A transmissão de luz foi monitorada com o auxílio de um agregômetro (CHRONO-LOG), calibrado para 100% de transmitância com Tyrode e para 0% de transmitância com a solução de plaquetas lavadas (400 x 109/L).

O controle positivo foi feito com a adição de 10 μM de colágeno após a incubação com PBS sobre a PL. Amostras de delta toxina foram testadas em várias concentrações, variando de 144 μg/mL até 0,9 μg/mL por ensaio.

3.10.3. Inibidores de serino protease, metalo protease e lectina.

Para o teste com inibidores de serino, metalo proteinases e lectinas as amostras de delta toxina (na concentração de 18 μg/mL) foram incubadas com PMSF (Fenil metil sulfonil fluoreto) 5 mM ou EDTA (ácido etilenodiamina tetra-acético) 5 mM e 0,2 mM, D-galactose 5 mM e 16 mM, 1,10-fenantrolina 5 mM e

10 mM e benzamidina 5mM e 25 mM, por 30 minutos a 37°C. Após a incubação as amostras foram testadas em plaquetas lavadas e monitoradas pelo agregômetro (Aguilar, et al., 2001, Laing et.al., 2005).

3.11. Ativador de fator X

A ativação do fator X foi medida por meio da atividade amidolítica de fator Xa formado, utilizando um espectrofotômetro Modelo Ultrospec III (Pharmacia LKB Biotech) (450nm) após a incubação de 10 μL de amostra (2mg/mL) ou controle a 37°C com 40mM de substrato cromogênico (F3301 Sigma) e 0,3 nM de fator X bovino em tampão Tris-HCl 25nM, NaCl 200 mM, $CaCl_2$ 10 mM, pH 8,3. A leitura foi feita em diversos tempos (Hofmann e Bon, 1987).

3.12. Ativador de Fator II

A ativação do fator II foi medida por meio da atividade amidolítica de fator IIa formado, utilizando um espectrofotômetro (450nm) após a incubação de 10 μL de amostra (2mg/mL) ou controle a 37°C com 40mM de substrato cromogênico (F2238 Sigma) e 148nM de fator II em tampão Tris-HCl 25nM, NaCl 200 mM, $CaCl_2$ 10 mM, pH 8,3. A leitura foi feita em diversos tempos (Silva *et al.* 2003).

3.13. Western Blotting

Western blotting é um método para detectar a interação de proteínas com anticorpos. Essa técnica usa eletroforese em gel para separar as proteínas denaturadas por peso molecular. As proteínas são então transferidas do gel para uma membrana (tipicamente de nitrocelulose), onde são usados como sonda anticorpos específicos para a proteína. A reação antígeno-anticorpo pode ser detectada por um segundo anticorpo marcado, dirigido contra o primeiro anticorpo. A revelação é feita por técnicas imunoquímicas (Towbin et. al., 1979, De Paula, 1995).

Após a realização de uma eletroforese em gel de poliacrilamida a 12% com as amostras de veneno total e delta toxina pura em condições redutoras e não redutoras, as proteínas do gel foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose em uma cuba de transferência de western blotting sob uma corrente elétrica fixada em 0,85 mA/cm^2. A transferência durou 1 hora e 30 minutos. A membrana de nitrocelulose foi então retirada da cuba e lavada por 1 hora com PBS+leite desnatado (3%) sob leve agitação.

Após a lavagem, iniciou-se a incubação da membrana com a solução de 25mL de PBS+leite (3%) e 50µL de antiveneno crotálico (Instituto Butantan) em uma concentração final de 1:500. Essa solução foi colocada em um recipiente com a membrana e permaneceram "overnight" sob leve agitação a 4°C.

A membrana foi retirada e lavada com PBS 3 vezes por 10 minutos.

Uma segunda solução com 20 mL de PBS+leite (3%) e 20μL de IgG de coelho anti IGg de cavalo conjugada com peroxidase (2° Ac.) na proporção 1:1000 foi adicionada a membrana, que permaneceu sob agitação por 2 horas. A membrana foi lavada com PBS por 3 vezes e então adicionou-se a solução de revelação contendo o cromogênio DAB (3,3' Diaminobenzidina), adicionado de peróxido de hidrogênio 0,2% em tampão PBS.

COMISSÃO NACIONAL DE ENERGIA NUCLEAR/SP-IPEN

4. RESULTADOS

4.1 Varredura de tampões

Por meio da varredura de tampões chegou-se a uma condição de resolução máxima que evidenciou um pico entre a convulxina e a giroxina.

Nas Figuras 1 e 2 nota-se que os tampões acetato de sódio e citrato de sódio, respectivamente, não resultaram em uma boa resolução na separação de proteínas de alto peso molecular.

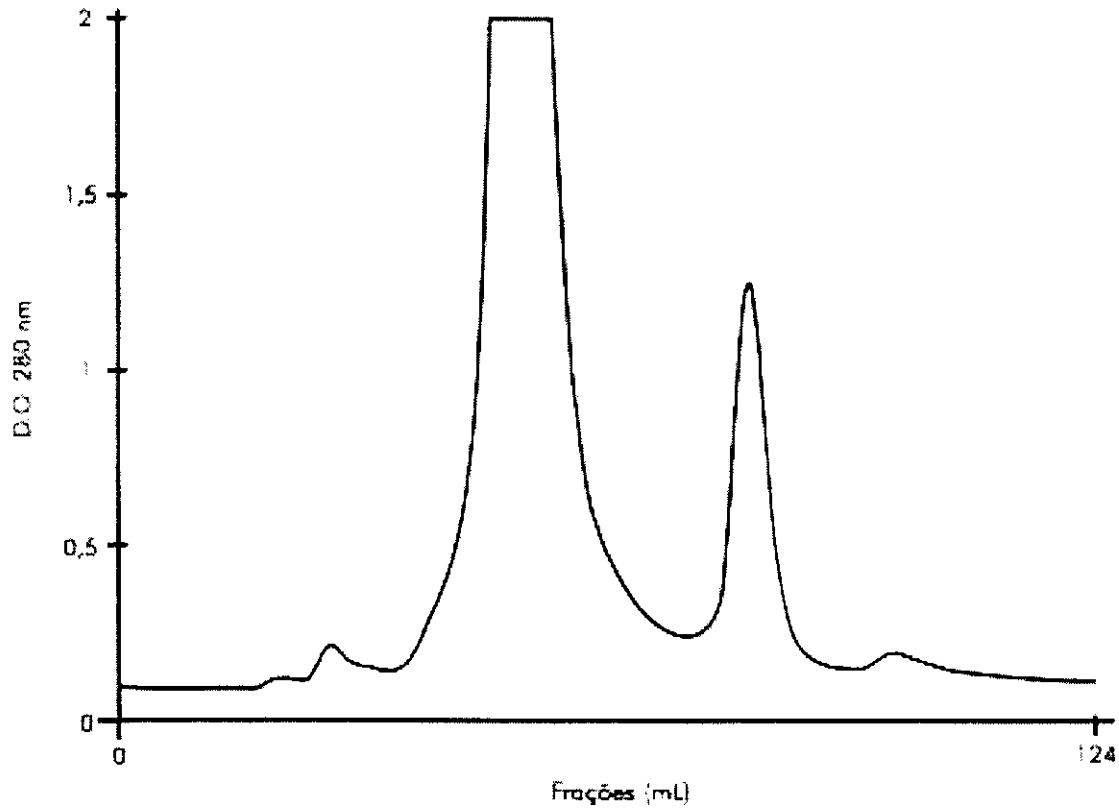


Figura 1. Perfil cromatográfico do veneno de *C.d. terrificus* em coluna Superdex 75. Tampão: Acetato de sódio 0,1M pH 5,0

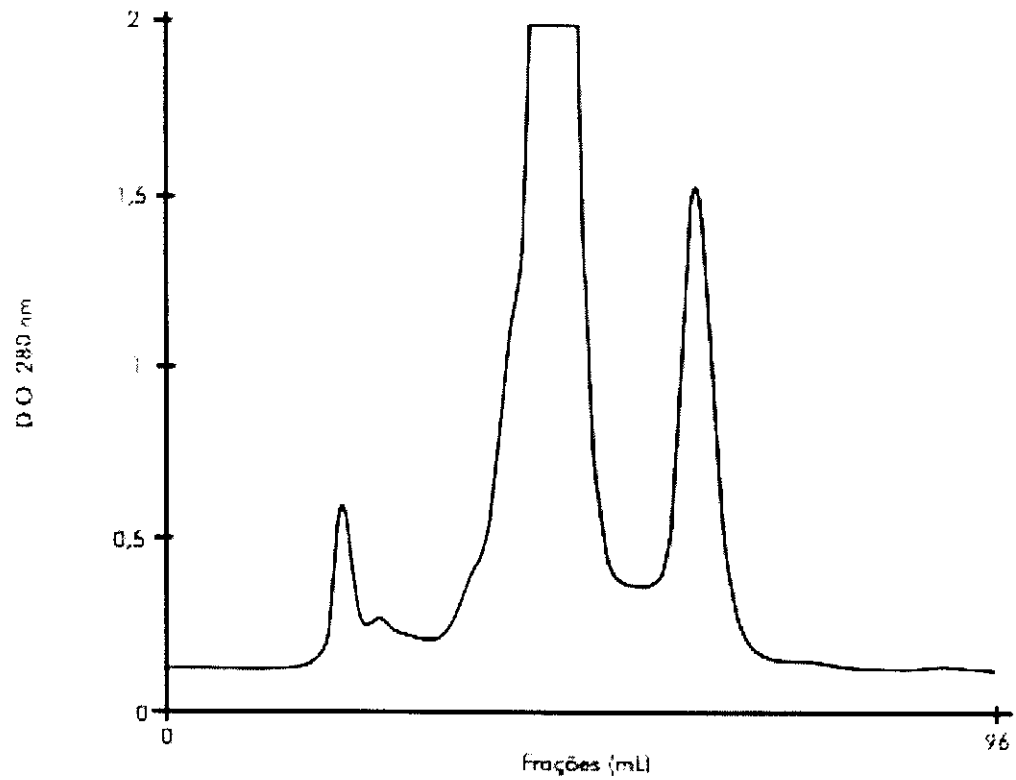


Figura 2. Perfil cromatográfico do veneno de *C.d. terrificus* em coluna Superdex 75. Tampão: Citrato de sódio 0,1M pH 5,0

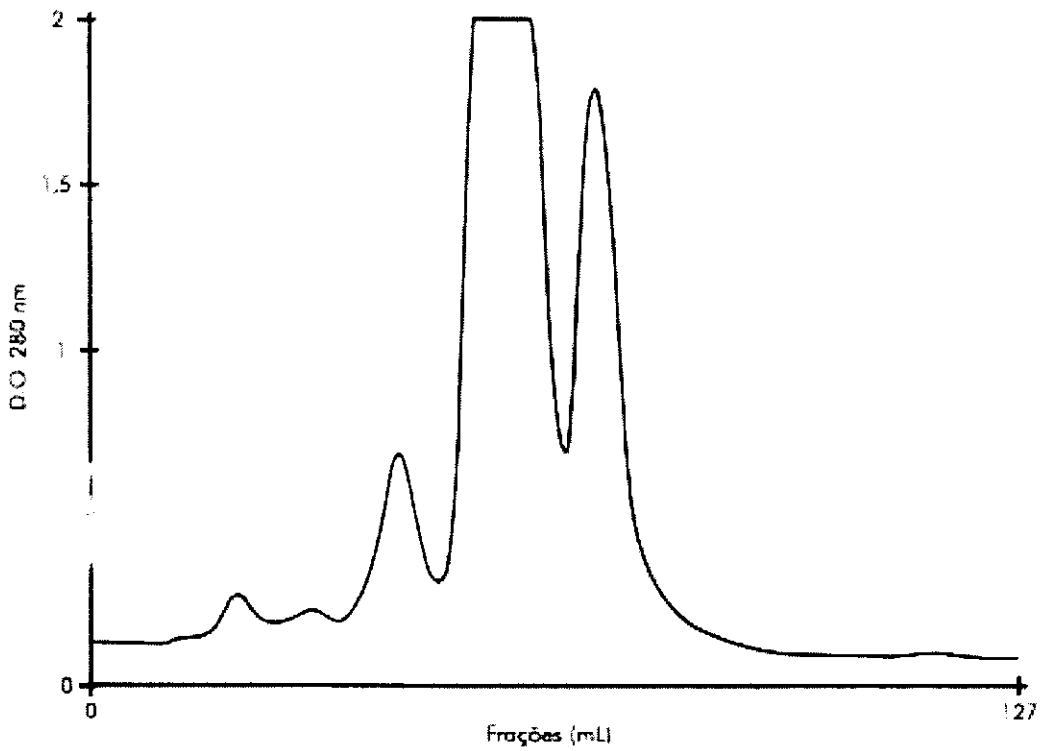


Figura 3. Perfil cromatográfico do veneno de *C.d. terrificus* em coluna Superdex 75. Tampão: Formiato de amônio 0,1M pH 3,0

A Figura 3 evidencia que a natureza do tampão é de grande importância para uma melhor separação de proteínas de alto peso molecular.

4.2. Purificação do veneno crotálico (FPLC) – Exclusão Molecular

Após a padronização das técnicas de purificação, sucessivas cromatografias com o veneno crotálico foram realizadas para a obtenção de uma quantidade de proteína suficiente para os ensaios posteriores.

4.3. Cromatografia de fase reversa (HPLC)

Para a obtenção da proteína pura, uma segunda etapa de purificação foi realizada em sistema HPLC. Após a identificação do tempo de retenção na fase reversa da giroxina e da convulxina que são os contaminantes após fracionamento em FPLC, foi possível identificar isoladamente o pico correspondente á delta toxina (Figura 4).

Após a identificação do tempo de retenção, corridas subseqüentes foram realizadas. A primeira etapa de purificação em HPLC resultou no isolamento da delta toxina sem a contaminação de giroxina e convulxina (Figura 5 A). Após a repurificação das amostras em uma segunda etapa de cromatografia em HPLC, comprovou-se a pureza da proteína (Figura 5 B).

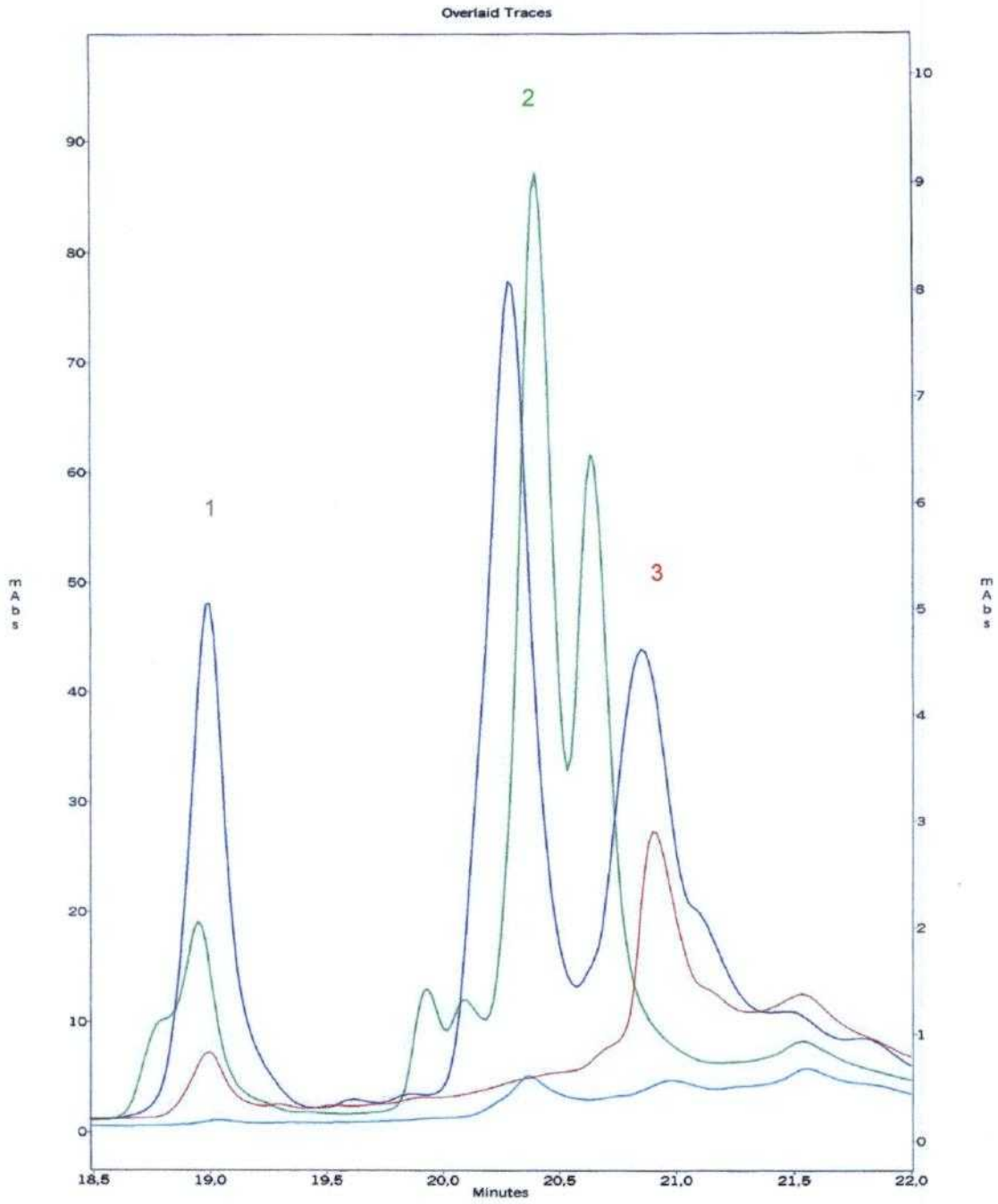


Figura 4. Perfil cromatográfico da purificação em sistema HPLC em coluna de fase reversa. Leitura em 220nm. Picos : (1) deltatoxina, (2) giroxina e (3) convulxina.

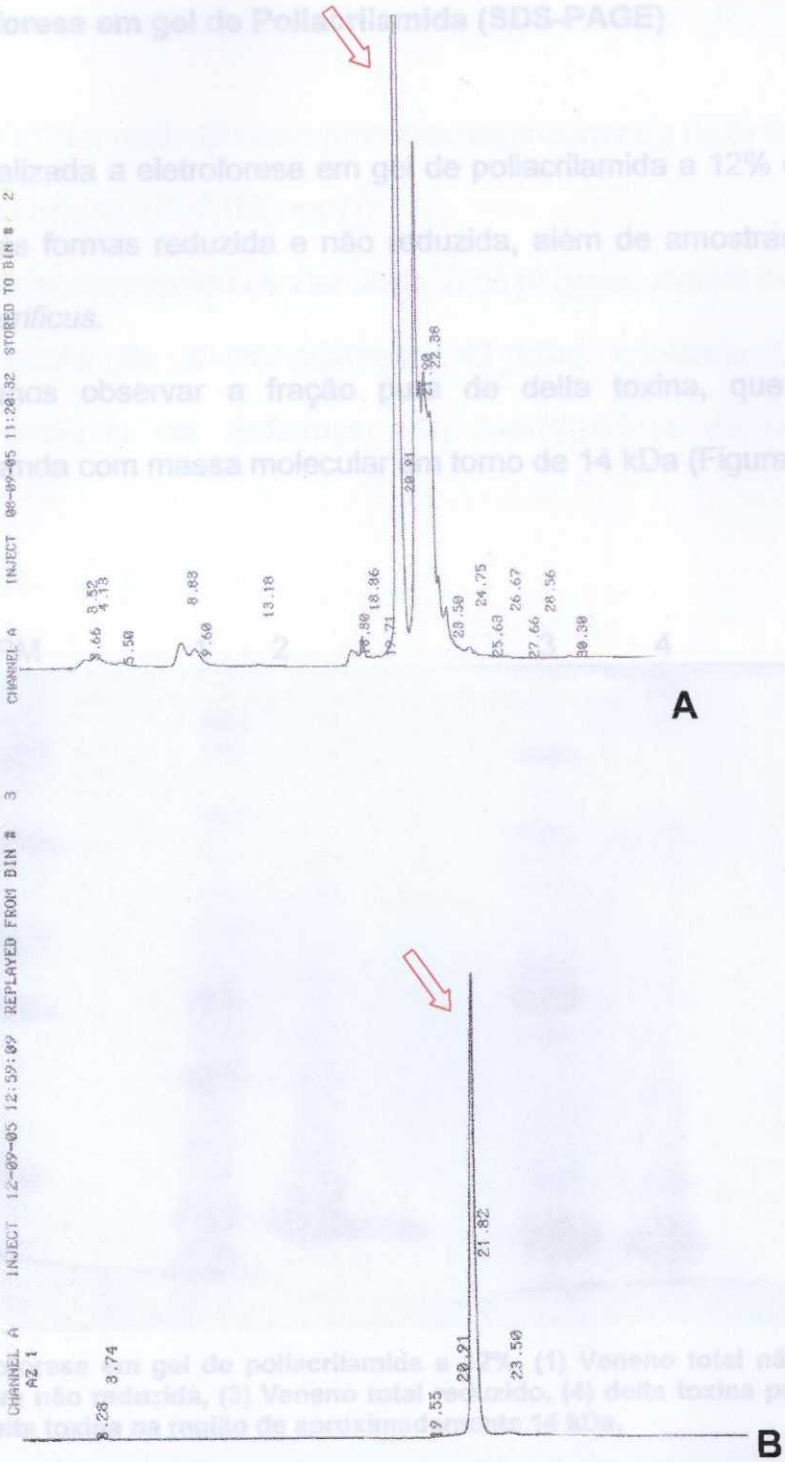


Figura 5. (A) Perfil cromatográfico da primeira etapa de purificação em sistema HPLC da delta toxina pós gel filtração. (B) Obtenção da proteína pura na segunda etapa de purificação em RP-HPLC.

4.4. Eletroforese em gel de Poliacrilamida (SDS-PAGE)

Foi realizada a eletroforese em gel de poliacrilamida a 12% com a delta toxina pura, nas formas reduzida e não reduzida, além de amostras do veneno total de *C.d. terrificus*.

Podemos observar a fração pura de delta toxina, que apresentou apenas uma banda com massa molecular em torno de 14 kDa (Figura 6).

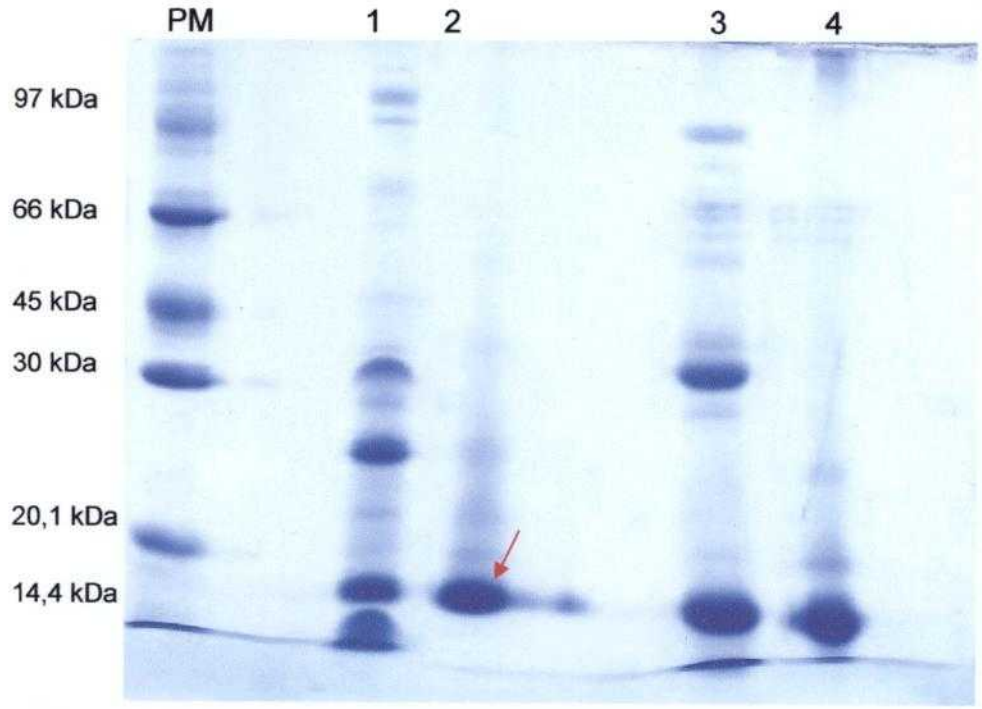


Figura 6. Eletroforese em gel de poliacrilamida a 12%. (1) Veneno total não reduzido, (2) delta toxina pura não reduzida, (3) Veneno total reduzido, (4) delta toxina pura reduzida. A seta indica a delta toxina na região de aproximadamente 14 kDa.

4.5. Eletroforese Bidimensional

O Gel 2D foi realizado com amostras semi-puras de delta toxina, após a purificação em sistema FPLC (Figura 7).

A proteína apresentou caráter ácido, e de pI (ponto isoelétrico) entre 4 e 5 e massa molecular de aproximadamente 42 kDa, revelando "*spots*" muito semelhantes podendo ser isoformas com características de uma proteína glicosilada.

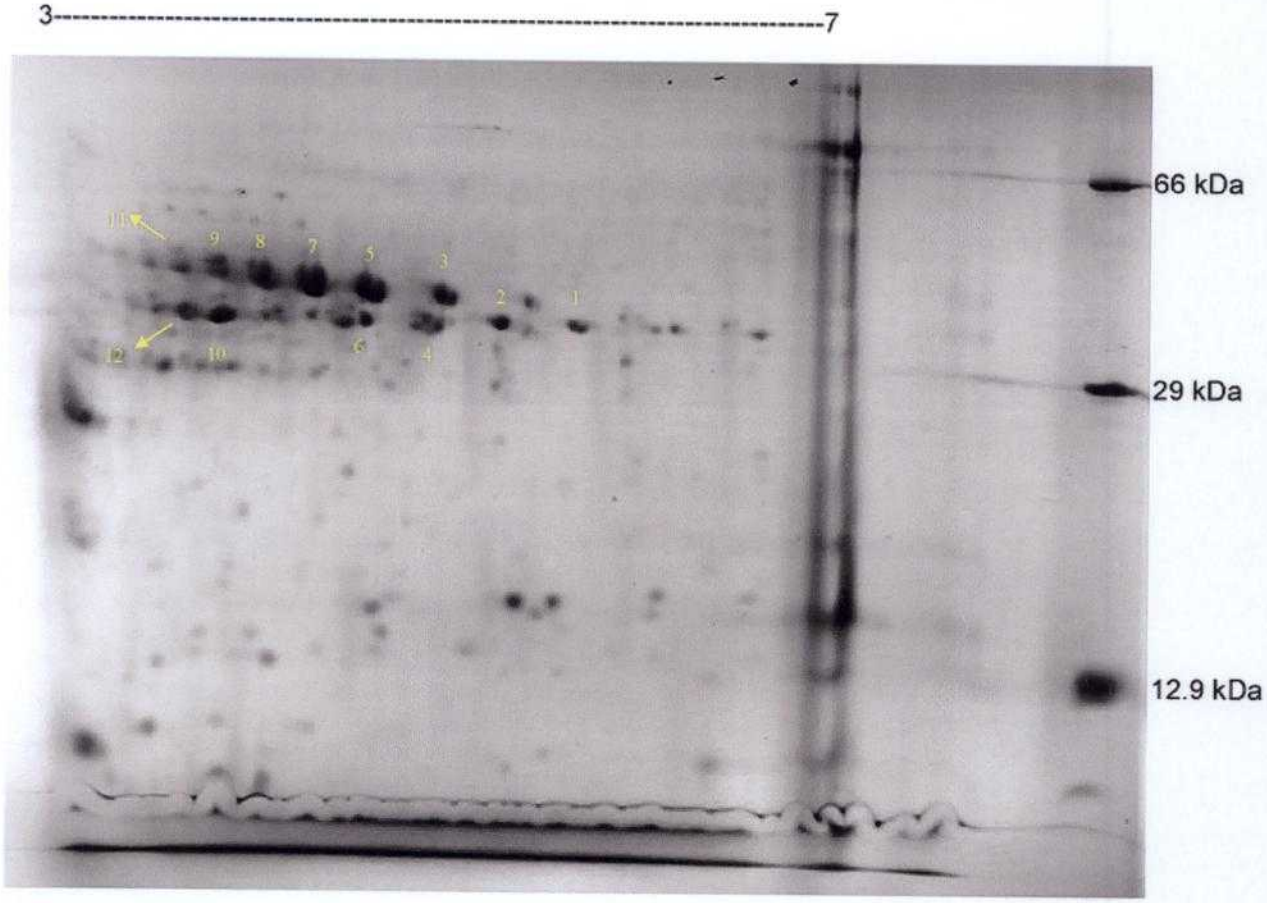


Figura 7. Eletroforese Bidimensional em gel de poliacrilamida a 15% com 1mg de amostra da delta toxina semi-pura (pós gel filtração) aplicada em uma tira de 18 cm com gradiente de pH entre 4 e 7. Spots ácidos com pI entre 4 e 5 e massa de aproximadamente 42 kDa.

4.6. Seleção dos *Spots* e Peptide Mass fingerprint por MALDI-ToF

Os spots foram então extraídos do gel um a um e após passarem por um processo de digestão com tripsina, foi realizada uma análise dos fragmentos peptídicos no espectrômetro de massa (MALDI-ToF) sendo os peptídeos resultantes confrontados com banco de dados do "swissprot" utilizando o software MASCOT. A análise por *Peptide mass fingerprinting* (Figura 8), correlaciona massas peptídicas geradas pela digestão da proteína com as massas peptídicas teoricamente esperadas.

```
Taxonomy: Tropidechis carinatus

Cleavage by Trypsin: cuts C-term side of KR unless next residue is P
Number of mass values searched: 20
Number of mass values matched: 14
Sequence Coverage: 43%

Matched peptides shown in Bold Red

  1 SNSLFEEIRP GNIERECIEE KCSKEEAREV FEDNEKTETF WNVYVDGDQC
 51 SSNPCHYRGT CKDGIGSYTC TCLPNYEGKN CEKVLYQSCR VDNGNCWHFC
101 KRVQSETQCS CAESYRLGVD GHSCVAEGDF SCGRNIKARN KIVNGMDCKL
151 GECPWQAVLI NEKGEVFCGG TILSPIHVLT AAHCINQTKS VKETRRLLSV
201 DKIYVHTKFV PPNYYYVHQN FDRVAYDYDI AIIRMKTPIQ FSENVVPACL
251 PTADFANEVL MKQDSGIVSG FGRIQFKQPT SNTLKVITVP YVDRHTCMLS
301 SDFRITQNMF CAGYDTLPQD ACQGDSGGPH ITAYRDTHFI TGIISWGEGC
351 ARKGKYGVYT KVSKFIPWIK KIMSLK
```

Figura 8. Análise dos fragmentos trípticos por *Mass Fingerprinting* comparados com a trocarina, proteína isolada do veneno de *Tropidechis carinatus*

A análise dos fragmentos trípticos e sua confrontação com o banco de dados sugere alto grau de homologia com a trocarina (Joseph J.S. et al. 1999), um ativador de protrombina do veneno de *Tropidechis carinatus*, tendo sido obtidos 14 fragmentos coincidentes cobrindo 43% da seqüência descrita (Figura 8).

4.7. MALDI-ToF

A análise da amostra semi-pura da delta toxina apresentou os contaminantes esperados, a giroxina representado pelo segundo envelope de massa com aproximadamente 29 kDa, e convulxina representada pelo terceiro envelope de massa, com 60 kDa. A delta toxina apresentou massa em torno de 14 kDa (Figura 9).

A análise da amostra pura por MALDI-ToF aponta para uma alta pureza do material cuja a massa foi estimada em 14074,92 Da (Figura 10), validando o método de purificação utilizado. Acredita-se que o envelope de massa majoritário representa uma subunidade da delta toxina com carga +1 (M=14074,92) sendo os outros dois o Homodímero (M= 28370,068) e o Homotrímero (M= 42799,514).

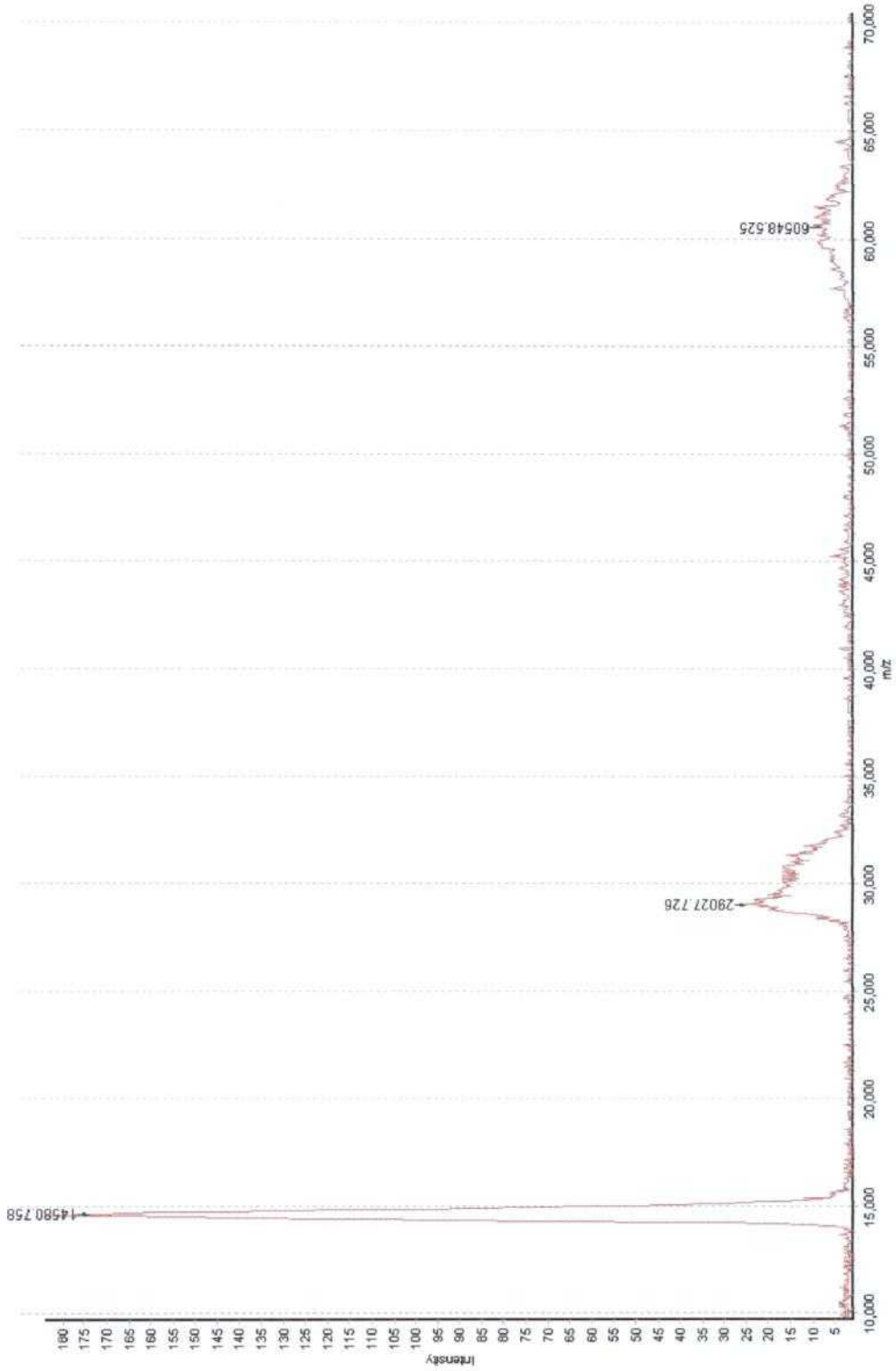


Figura 9. Espectro de massa da delta toxina semi-pura em aparelho MALDI-ToF

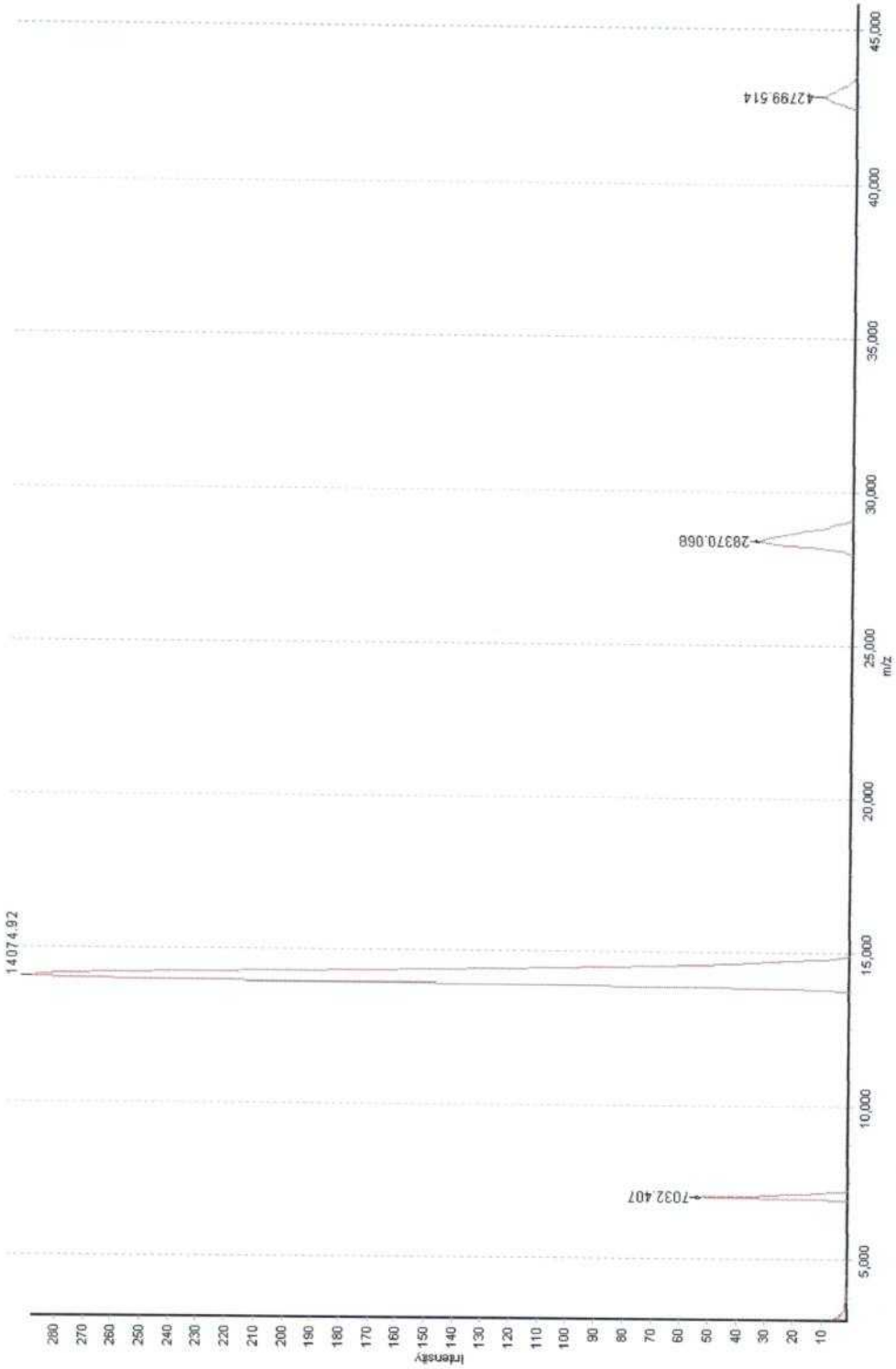
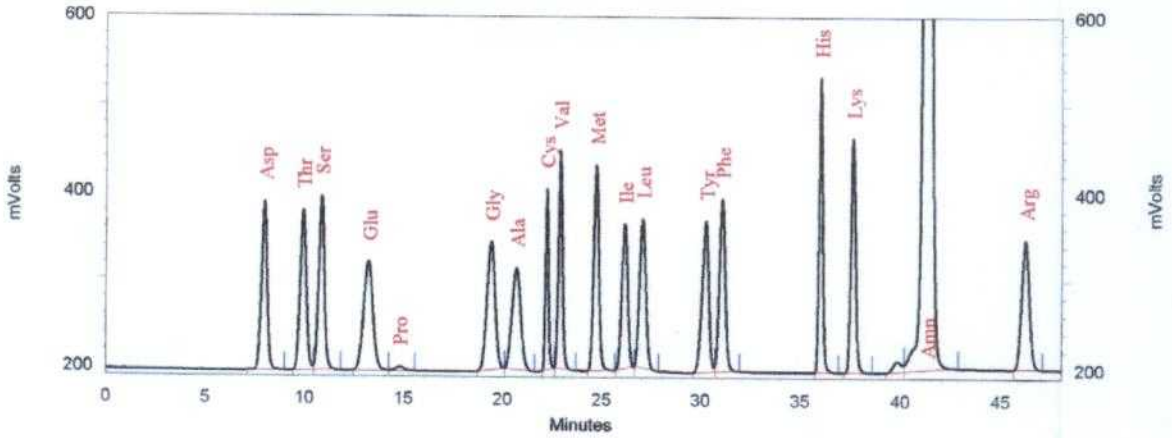


Figura 10. Espectro de Massa da delta toxina pura em aparelho MALD-ToF.

COMISSÃO NACIONAL DE ENERGIA NUCLEAR/SP-IPEN

4.8. Análise de Aminoácidos

Padrão



Delta toxina

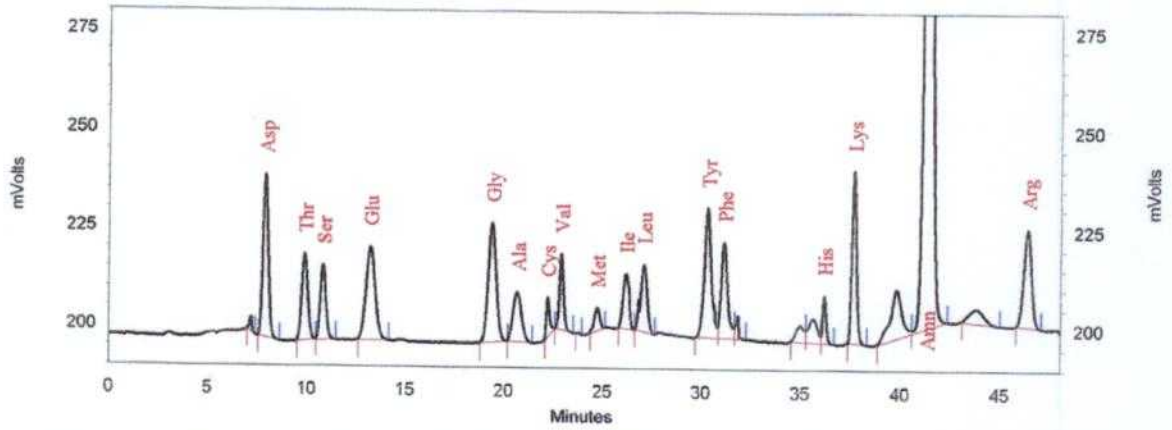


Figura 11. Análise de aminoácidos. Perfil cromatográfico doa aminoácidos do padrão e da delta toxina após derivatização com ninidrina.

Com os dados da análise de aminoácidos (figura 11) e com o cálculo do percentual molar (Tabela 1), foi possível confrontar os resultados com o banco de dados do "swissprot" e confirmar os resultados da análise dos spots do gel 2D.

Os dados gerados apresentaram o mesmo grau de homologia com a trocarina (Joseph J.S. *et al.* 1999), uma serino protease de uma serpente australiana.

Aminoácidos	Área Padrão	Área amostra	Percentual Molar
Asx	3941832	779096	8,7950
Thr	3986475	475041	5,2770
Ser	4089028	385284	4,3975
Glx	4133915	772379	8,7950
Pro	143409		n.d.
Gly	4203395	851890	8,7950
Ala	3398983	387180	5,2770
Cys	2180792	109774	2,1987
Val	3550609	289110	3,5180
Met	4280053	111251	1,1433
Ile	3422005	306589	4,3975
Leu	3781238	406165	4,7493
Tyr	4028273	816718	8,7950
Phe	4067541	556870	6,1565
His	4242955	157162	1,7590
Lys	4292708	689462	7,0360
Amn	25199650	6493464	11,4335
Arg	3906100	663947	7,4758
Pro	980639	1322	n.d.

Tabela 1. Cálculo do percentual molar de cada aminoácido. realizada a partir da área dos picos da amostra de delta toxina e do padrão.

4.9. Agregação Plaquetária

Nos ensaios de agregação plaquetária, a delta toxina mostrou-se pró-agregantes sobre plaqueta lavada (PL). Na figura 11 a delta toxina está representada no primeiro canal em preto, o canal azul e o segundo canal preto mostram a agregaçã[illegible] plaquetas após a adição de colágeno. A delta toxina foi capaz de in[illegible] agregação plaquetária de forma eficiente, pois apresentou resultad[illegible] ante ao do controle positivo.

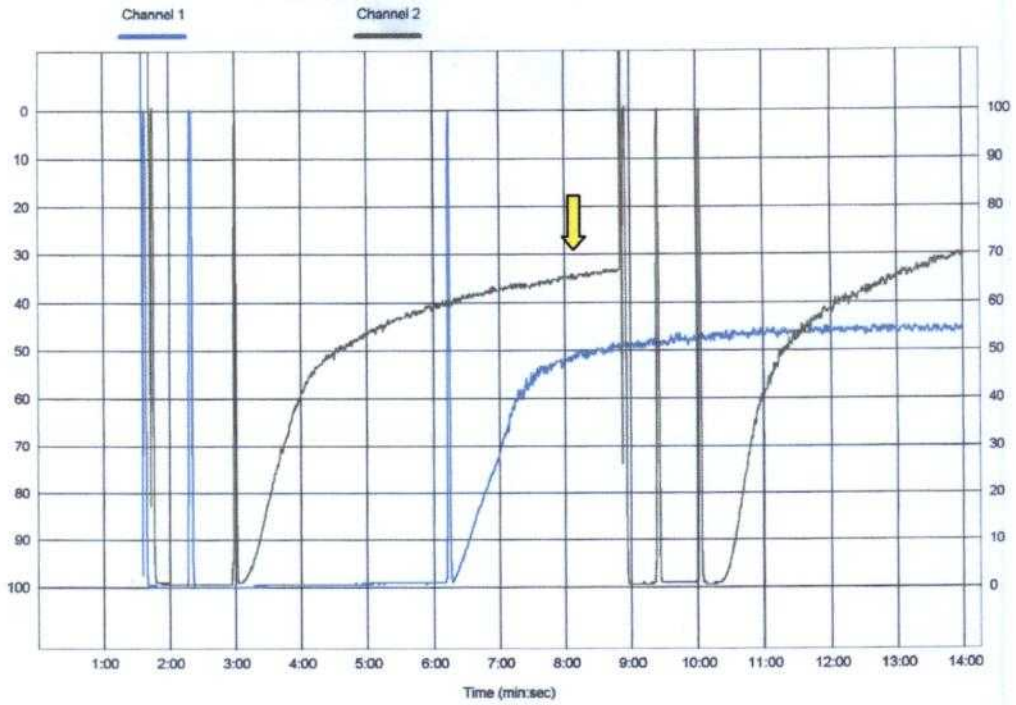


Figura 12. 1° canal preto: 400 μL de PL + 90μL de delta toxina (144 μg/mL);

1° canal azul: 400 μL de PL + 90 μL de PBS + 10μL de colágeno (10 μM) ;

2° canal preto: 400 μL de PL + 90 μL de PBS + 10μL colágeno (10 μM)

Na figura 13 a delta toxina mostrou-se eficiente na agregação plaquetária mesmo em concentrações muito menores, de 2,7 e 0,9 μg/mL, representados nos canais 1 e 2 respectivamente.

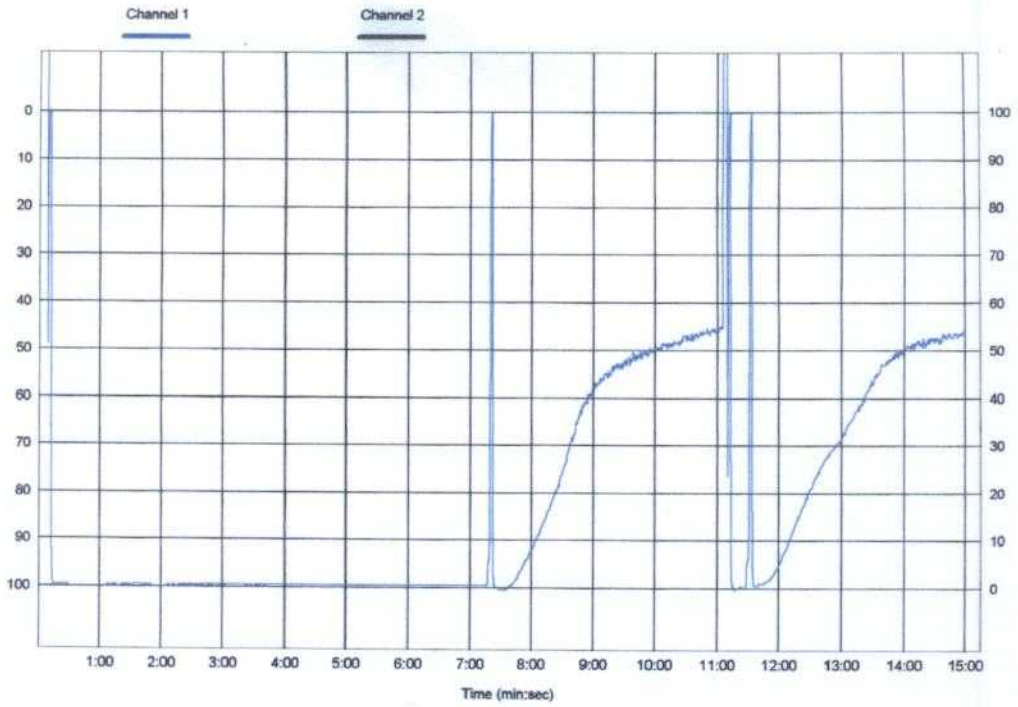


Figura 13. Canal 1 azul: 400 μL de PL + 90μL de delta toxina (2,7 μg/mL)
Cabal 2 azul: 400 μL de PL + 90μL de delta toxina (0,9 μg/mL)

4.9.1. Inibidores de serino, metalo proteinases e lectinas.

Para a caracterização dessa nova toxina que atua de forma agonista na agregação plaquetária, foram realizados experimentos para testar a atividade da delta toxina sobre plaqueta lavada, na presença de inibidores de serino, metalo proteinases e lectina.

400 uL de Plaqueta lavada +	**Agregou**	Não Agregou
90 uL de Delta toxina (18ug)	X	
90 uL de PBS + 10uL de colágeno	X	
90 uL de Delta toxina (PMSF 5mM)		X
90 uL PBS (PMSF 5mM)+ Colágeno		X
90 uL de Delta toxina (EDTA 5mM)	X	
90 uL de PBS (EDTA 5mM)		X
90 uL de Delta toxina (o-phe 5mM)		X
90 uL de PBS (o-phe 5mM) + 10 uL de colágeno		X
90 uL de Delta toxina (D-galac 5mM)	X	
90 uL de Delta toxina (D-galac 16mM)	X	
90 uL PBS (D-galac 5mM)		X
90 uL de Delta toxina (benxamidina 5mM)	X	
90 uL de PBS (benzamidina 5mM) + colágeno	X	
90 uL de Delta toxina (benxamidina 25mM)	X	
90 uL de PBS (benzamidina 25mM) + colágeno	X	

Tabela 2. Ensaio de agregação plaquetária com a delta toxina na presença de inibidores de serino, metalo proteinase e lectina em diversas molaridades.

Com os ensaios de agregação plaquetária na presença de alguns inibidores como o EDTA foi possível observar que esse inibidor não foi eficaz, assim sugerindo que essa proteína não seja uma metalo proteinase. O mesmo aconteceu com um inibidor de lectina, o açúcar d-galactose, sugerindo que a agregação induzida pela toxina seja independente de interação com domínios glicosilados. Da mesma forma, a benzamidina, um inibidor clássico de serino-proteinases, não interferiu na atividade agregante, sugerindo que a atividade sobre plaquetas independe deste mecanismo catalítico.

Já com a 1-10 fenantrolina e com o PMSF não obtivemos resultados confiáveis uma vez que esses inibidores por si só interferem na atividade da plaqueta, inibindo sua agregação, mesmo com a adição posterior do colágeno (Tabela 2).

4.10. Ativador de fator X

No ensaio de ativador de fator X, verificou-se que tanto o veneno total de *C.d. terrificus* como as frações, semi-pura e pura de delta toxina apresentaram atividade ativadora de fator X significante, após 25 minutos de incubação como mostra a Figura 14.

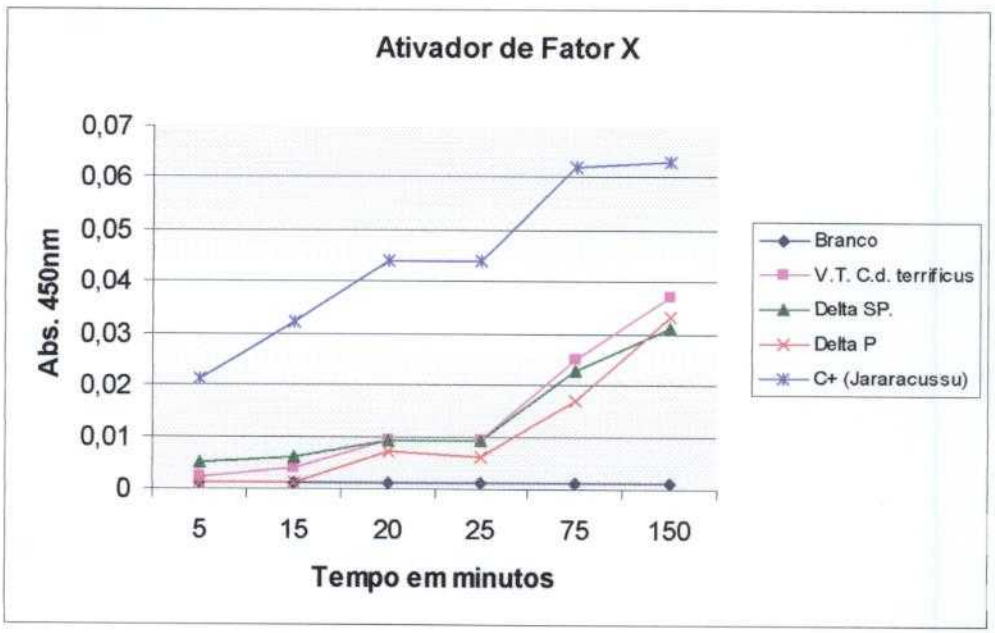


Figura 14. Teste de ativador de Fator X com amostras de delta toxina semi-pura, pura e veneno total de *C.d. terrificus*. Controle positivo com veneno de *B. jararacussu*.

4.11. Ativador de Fator II

Esse ensaio foi realizado para avaliar se a atividade ativadora de fator X era decorrente da ação direta da toxina ou se a mesma ativava fator II, que por sua vez levava a conversão de protrombina em trombina. Como se observa na Figura 15 a delta toxina não ativou o fator II. Amostras de delta toxina semi-pura e veneno total também não apresentaram atividade ativadora de fator II.

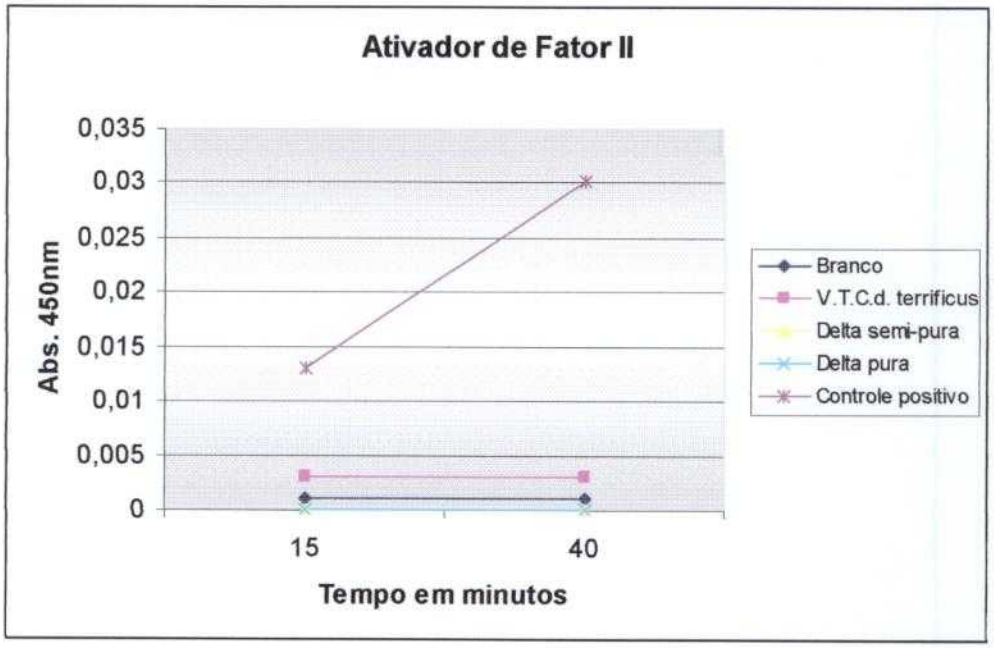


Figura 15. Teste de ativador de Fator II com amostras de delta toxina semi-pura, pura e veneno total de *C.d. terrificus.* Controle positivo com veneno de *B. jararacussu.*

4.12. Western Blotting

A análise por western blot (Figura 16) indicou que o anti-soro comercial foi capaz de reconhecer a delta toxina em sua forma não reduzida e reduzida. Tal fato indica que a toxina é imunogênica e que induz anticorpos capazes de reconhecer tanto epítopos contínuos quanto conformacionais.

Figura 16. Western blotting com o veneno total e a delta toxina pura, em condições não redutoras e redutoras.

5. DISCUSSÃO

O veneno de *Crotalus durissus terrificus*, tem sido amplamente estudado mas ainda possui componentes quase desconhecidos. A composição do veneno crotálico é complexa e constituída de enzimas, toxinas, peptídios e outros componentes (Takeda *et al.*, 1985, Barraviera, 1994).

Por meio da varredura de tampões, no fracionamento do veneno por cromatografia de exclusão molecular, chegou-se a uma condição de resolução máxima que evidenciou um pico entre a convulxina e a giroxina. A existência de um componente nesta posição, como foi sugerido por Vital Brasil em 1980, não havia ainda sido comprovada. A varredura de tampões não só identificou o pico citado como possibilitou a purificação e caracterização de uma nova toxina do veneno de *Crotalus durissus terrificus*.

Os tampões acetato de sódio e citrato de sódio não resultaram em uma boa resolução na separação de proteínas de alto peso molecular. No entanto o tampão formiato de amônio mostrou que a natureza do tampão é de grande importância para uma melhor separação de proteínas de alto peso molecular, pois apresentou uma maior resolução. Acredita-se que tal resultado seja fruto da conjugação de pH e força iônica ideal. Técnicas de purificação por troca iônica e interação hidrofóbica não perm[illegible] o isolamento da toxina.

Para a obten[illegible] da [illegible]teína pura, uma segunda etapa de purificação foi realizada em sistema HPLC. Essa etapa de purificação tem sido usada como alternativa para o isolamento de proteinases (Serrano & Maroun, 2005). Após a identificação [illegible] o tempo de retenção na fase reversa da giroxina e da convulxina

que são os contaminantes após fracionamento em FPLC, tornou-se possível identificar isoladamente o pico correspondente á fração de interesse. De acordo com as condições do gradiente e tempo de eluição, concluiu-se que a proteína é bastante hidrofóbica. Após as passagens de purificação e de liofilização da amostra, pôde-se chegar a uma quantidade muito pequena de proteína pura, representada por 0,2% do peso seco do veneno total. Para efeito de comparação, a trocarina, uma serino proteinase pertencente ao grupo D de ativadores de protrombina, representa 5% do veneno total sendo uma proteína glicosilada (Kini, 2005).

Na análise em eletroforese em gel de poliacrilamida pode-se observar que a delta toxina apresentou massa molecular de cerca de 14 kDa e uma migração anômala, o valor da massa molecular da delta toxina foi compatível com os resultados obtidos na análise em espectrometria de massa, podendo ser essa proteína um homotrímero de massa total de aproximadamente 42 kDa. Paralelamente procedeu-se uma análise da fração semi-pura, por eletroforese bidimensional.

Esse método permite analisar subgrupos específicos de uma toxina, além da possibilidade de análise da complexidade da amostra (Serrano *et al.*, 2005). Com a análise do Gel 2D, a proteína apresentou caráter ácido, e de pI entre 4 e 5 e massa molecular de aproximadamente 42 kDa, revelando "*spots*" muito semelhantes podendo ser isoformas com características de uma proteína glicosilada. Em ensaios de análise de aminoácidos a proteína apresentou características típicas de glicosilação ao formar um "pellet" marrom após ser submetida à hidrólise ácida com HCl 6N. A função da glicosolação em serino

proteinases de venenos ofídicos não é bem conhecida. Recentes estudos com uma protease A de *Bothrops*, uma serino proteinase, composta por 60% de carboidratos do total da massa molecular , indicam que a glicosilação tem efeito estabilizante sobre as proteases, que resistem à hidrólise de proteinases (Jin *et al.* , 2005).

Cerca de 12 "spots", todos ácidos e com massa molecular em torno de 40 kDa, foram selecionados para a digestão com tripsina para a identificação por análise dos fragmentos peptídicos no espectrômetro de massa (MALDI-ToF). A maioria dos "spots" gerou fragmentos similares, sugerindo tratar-se da mesma proteína. Acredita-se que essa similaridade dos "spots" e dos fragmentos gerados possam ser atribuídos a microheterogeneidade decorrente de glicosilação. Tal hipótese é reforçada pelo fato da proteína ter um comportamento anômalo em SDS-PAGE assim como por eluir com arraste em purificação em coluna de troca-iônica.

Proteínas, com atividade na cascata da coagulação, são caracterizadas como ativadores de Fator X, ativadores de protrombina e enzimas thrombine-like, podendo ser então uma serino ou metalo proteinases (Joseph J.S. *et al.* 2002). Todos os "spots" processados por *fingerprint*, quando confrontados com o banco de dados do "swissprot" mostraram alto grau de homologia "até 43% de cobertura" com a trocarina, um ativador de protrombina do veneno de *Tropidechis carinatus* (Joseph J.S. *et al.* 1999). Ao confrontar os dados da análise de aminoácidos com os bancos de dados, obteve-se, mais uma vez, a trocarina como proteína cuja composição era homóloga à da toxina em estudo. Cabe

ressaltar que outra proteína, do veneno do *B. jararaca,* também apresentou homologia quando os fragmentos foram analisados *in silico.*

De posse desses resultados optou-se por testar a capacidade da fração purificada, de ativar fator X e II, usando substratos sintéticos. A cinética da ativação do Fator X foi medida pela atividade amidolítica de fator X formado (Hofmann e Bon, 1987). Os resultados apontaram para uma ativação direta do fator X, uma vez que não houve ativação do fator II, atividade que também não foi detectada no veneno total. Dentre as proteínas procoagulantes de venenos de serpentes, ativadores de trombina são funcionalmente similares ao fator Xa da coagulação, assim como a trocarina, uma serino proteinase pertencente ao grupo D de ativadores de protrombina. (Joseph J.S. *et al.* 1999, Rao & Kini, 2002).

Baseados em relatos de Vital Brazil (1980) sobre a delta toxina ser uma proteína que altera acentuadamente a permeabilidade vascular e causa grande hemoconcentração, testou-se a delta toxina em ensaios de agregação plaquetária. A mesma se mostrou um potente ativador da agregação de forma direta, uma vez que os ensaios foram realizados com plaquetas lavadas, logo na ausência de fatores séricos. Estudos com uma proteína isolada do veneno de *Proatheris superciliaris,* mostraram ser esta uma proteína agonista de agregação plaquetária, de 34 kDa. A proaterocetina ativou a agregação plaquetária na ausência de proteínas plasmáticas, demonstrando que esse efeito não pode ser atribuído a um ativador de fatores de coagulação. A proaterocetina foi caracterizada como uma serino proteinase (Laing et al, 2005).

A maioria dos venenos ofídicos coagulantes é caracterizada como proteinases que ativam especificamente fator X ou protrombina ou convertem

COMISSÃO NACIONAL DE ENERGIA NUCLEAR/SP-IPEN

fibrinogênio em fibrina e são classificados como metalo ou serino proteinases. O grupo D das serino proteinases é estruturalmente e funcionalmente similar ao fator Xa, mas diferentemente do FXa de mamíferos, é constituído de glicoproteínas (Kini, 2005).

Para uma melhor caracterização da delta toxina, procedemos a ensaios posteriores usando inibidores específicos de metalo, serino proteinases e de lectinas. Nossos dados sugerem que , nem a atividade metalo proteinase, nem a serino proteinase, tampouco um domínio lectina estejam envolvidos no processo, uma vez que EDTA, benzamidina e D-galactose não inibiram a atividade da proteína. Metalo proteinases são caracterizadas pela inibição de sua atividade enzimática quando são expostas ao EDTA ou 1,10-Fenantrolina, ocorrendo a quelação do íon Zn^{2+} por esses produtos (Matsui *et al.* 2000). No caso das serino proteinases os inibidores mais comuns são o PMSF (Fenil metil sulfonil fluoreto) e a benzamidina (Matsui *et al.* 2000, Serrano & Maroun, 2005).

Em testes com o PMSF e a 1,10-Fenatrolina os resultados não foram conclusivos, uma vez que nas concentrações utilizadas, o inibidor *per se* inibiu a agregação plaquetária induzida por colágeno. Esses inibidores são frequentemente utilizados em ensaios de coagulação ou atividade amidolítica com substratos sintéticos (Rosing & Tans, 1992; Rao & Kini, 2002).

Por fim, com os resultados do western blot, fica claro que a delta toxina possui propriedades imunogênicas e que induz anticorpos capazes de reconhecer tanto epítopos contínuos quanto conformacionais. Estes dados também sugerem que o soro neutraliza esta atividade.

6. CONCLUSÕES

No presente trabalho, foi isolada uma nova toxina do veneno de *C. d. terrificus*, cuja existência já havia sido aventada, porém nunca demonstrada. De acordo com os dados aqui apresentados concluímos que:

- Trata-se de um ativador específico de fator X.
- A mesma proteína ativa agregação plaquetária em concentrações muito baixas.
- De acordo com a análise em gel 2D trata-se de uma proteína ácida, com massa molecular em torno de 40 kDa.
- Quando analisada por espectrômetro de massa (MALDI), a toxina apresentou um envelope de massa majoritário de 14074,92 Da, levando-nos a crer que se trata de um homotrímero cujos componentes estão unidos por ligações fracas.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1 AEBERSOLD, R; MANN, M. Mass spectrometry-based proteomics. ***Nature***, 422, p. 198-207, 2003.

2 AGUILAR, I., GIRÓN, M.E., RODRÍGUEZ-ACOSTA,A. Purification and characterization of a haemorrhagic fraction from the venom of the Uracosn rattlesnake *Crotalus vegrandis*. ***Biochimica et Biophysica Acta*** 1548 p: 57-65, 2001.

3 ALEXANDER, G.; GRATHUSEN, J.; ZEPEDA, H.; SCHWARTZMAN, R. J.; Gyroxin, a toxin from the venom of *Crotalus durissus terrificus* is a thrombin-like enzyme. ***Toxicon***, 26 p. 953 - 960, 1988.

4 AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH, **Protein Purification Handbook.** Edição AB, Suécia, 1999.

5 AZEVEDO MARQUES, M.M., CUPO, P., HERING, S.E. "Plantas Venenosas e Animais Peçonhentos" - Samuel Schvartsman. Ed. Sarvier.161-167. São Paulo SP. 1992.

6 BAPTISTA, J.A. ***Aspectos da resposta imune frente a antígenos protéicos irradiados com ^{60}Co.*** 2004. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo.

7 BARRAVIERA, B **"Venenos Animais" Uma visão integrada.** Rio de Janeiro, R.J. Editora de Publicação Científica LTDA 1994.cap. 20, 281-295

8 BARRIO, A. A new toxin of Crotalus durissus terrificus venom. Acta. Physiol. Latinoamericana 11 : 224, 1961.

9 BON, C.; CHANGEUX. J. P.; JENG, T.W. & FRAENKEL-CONRAT, H. - Postsynaptic effect of crotoxin and its isolated subunits. ***Eur. J. Biochem***. 99 p. 471 - 481, 1979.

10 BON, C.; RADVANYI, F.; SALOU, B. & FAURE, G. – Crotoxin: a biochemical analysis of its mode of action. ***J. Toxicol.*** – Toxin Reviews 5 p - 438-448, 1986.

11 CASARE, M.S. ***Influência das principais espécies reativas formadas durante o processo de destoxixação de toxinas por radiação ionizante.*** 2003. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo.

12 DELLA CASA, M. S. ***Caracterização estrutural e funcional da insularina, uma nova desintegrina do veneno de Bothrops insularis.*** 2004. Tese (Doutorado) – Instituto de Ciências Biomédicas, São Paulo.

13 DE PAULA, R.A., ***Obtenção e avaliação de anticorpos induzidos por veneno crotálico ou crotoxina irradiada em fonte de ^{60}Co.*** 1995. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo.

14 EDMAN, P.- Sequence determination. ***Mol. Biol. Biochem. Biophys.***, 8: 211-255, 1970.

15 FISCHER, L. ***Gel Filtration Chromatography.*** 2nd edition, Elsevier, Amsterdan, 1990.

16 FUNASA [illegible] de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos. Brasília, 2001.

17 GUYTON & HALL. ***Tratado de Fisiologia Médica***, 9ª e ed. Rio de Janeiro. RJ. Cap. 36, p. 421-426, 1997.

18 HOFMANN, H & BON, C. Blood Coagulation Induced by the Venom of Bothrops atrox. 2. Identification, Purification, and Properties of Two Factor X Activators. ***Biochemistry,*** 26 p.780-787, 1987.

19 JIN, Y.; LU, Q-M.; CHEN, R-Q.; WU, J-B.; XIONG, Y-L. - Molecular characterization of a weak fibrinogen-clotting enzyme from *Trimeresurus jerdonii* venom. ***Toxicon***, 45 p – 353-360, 2005.

20 JOSEPH, J. S., CHUNG, M.C.M., JEYASEELAN, K., & KINI, R.M. Amino Acid Sequence of Trocarin, a Prothrombin Activator from *Tropidechis carinatus* Venom: Its Structural Similarity to Coagulation Factor Xa. ***Blood***, 94,(2) p.621-631. July 15, 1999.

21 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. ***Toxixon*** 40, p- 175-183, 2002

22 KINI, R.M. The intriguing world of prothrombin activators from snake venom. ***Toxicon*** 45 p- 1133-1145, 2005.

23 LAEMMLI, U.K.-Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. ***Nature,*** 227 p.680-685, 1970.

24 LAING, G.D., COMPTON, S.J., RAMACHANDRAN, R., FULLER, G.L.J., WILKINSON, M.C., WAGSTAFF, .C., WATSON, S.P., KAMIGUTI, A.S., THEAKSTON, R.D.G., SENIS, Y.A. Characterization of a novel protein from *Proatheris superciliaris* venom: Proatherocytin, a 34-kDa platelet receptor PAR1 agonist. ***Toxicon*** 46, p- 490-499, 2005.

25 LIN, D.; TABB, D.L.; YATES III, J.R. "Large-scale protein identification using mass spectrometry" ***Biochimica et Biophysica Acta*** 1646 p.1-10, 2003.

26 LIZANO S, LAMBEAU G, LAZDUNSKI M.Cloning and cDNA sequence analysis of Lys(49) and Asp(49) basic phospholipase A(2) myotoxin isoforms from *Bothrops asper*. ***Int. J. Biochem Cell Biol.***33(2) p.127-32, 2001.

27 MATSUI, T., FUJIMURA, Y., TITANI, K. Snake venom proteases affecting hemostasis and thrombosis. **Biochimica et Bioprysica Acta** 1477 p- 146-156, 2000.

28 MARCKLAND F.S. Snake venom and hemostatic system. ***Toxixon*** 36, n 12 p-1749-1800, 1998.

29 MONTEIRO, R.Q, ZINGALI, R.B.-Bothrojaracin, a proexosite I ligand, inhibits factor Va-accelerated prothrombin activation.***Thromb Haemost***. 87(2) p.288-293, 2002.

30 MOURA Gonçalves, J. & LAURA GOUVÊA VIEIRA – Estudos sobre venenos de serpentes Brasileiras. **An. Da Acad. Brasileira de Ciências**. p-141-150, t. XXII n.1, 1950.

31 NAHAS.L; KAMIGUTI, A.S. & BARROS, M.A.R. Thrombin-like and factor X – Activator components of *Bothrops* snake venoms. **Thromb Haemost** 2 (41) p-314-328, 1979.

32 NASCIMENTO, N. ***"Estudo comparativo entre crotoxina nativa e irradiada-Aspectos bioquímicos e farmacológicos"*** 1991 Dissertação (Mestrado) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo.

33 OLIVEIRA, M.R.A.A. ***Hematologia Básica***, American Méd Editora Ltda. São Paulo, SP. cap.4, p-161, 1998.

34 POLETTI, E.F. - ***Síntese, estudos biológicos e conformacionais de análogos da angiotensina II e bradicinina contendo um marcador de [illegible] com estrutura do tipo pirrolidina.*** *2006* Tese (Doutorado) - Universidade Federal de São Paulo - Escola Paulista de Medicina, São Paulo.

35 PRADO-FRANCESCHI, J. & VITAL-BRAZIL, O. - Convulxin, a new toxin from the venom of the South Americam Rattlesnake *Crotalus durissus terrificus*. ***Toxicon*** 19. p – 875-887, 1981.

36 RAO, V.S.; KINI, R.M. – Pseutarin C, a prothrombin activator from Pseudonaja textilis venom: Its structural and functional similarity to mammalian coagulation factor Xa-Va complex. ***Thromb Haemost*** 88. p – 611-619, 2002.

37 RAW, I.; ROCHA, M.C.; ESTEVES, M.I.; KAMIGUTI, A.S. Isolation and characterization of a thrombin-like enzyme from the venom of *Crotalus durissus terrificus*. ***Braz. J. Med. Biol. Res.***19 p.333-338, 1986.

38 RISSI-SILVA, M.E. ***Análise Proteômica do Complexo Salivar da Sanguessuga Haementeria depressa.*** 2004. Tese (Doutorado) – Instituto de Ciências Biomédicas, São Paulo.

39 ROSING, J.; TANS, G. – Structural na funcional properties of snake venom prothrombin activator. ***Toxicon*** 30. p – 1515-1527, 1992.

40 RUCAVADO A, SOTO M, KAMIGUTI AS, THEAKSTON RD, FOX JW, ESCALANTE T, GUTIERREZ JM. - Characterization of aspercetin, a platelet aggregating component from the venom of the snake *Bothrops asper* which induces thrombocytopenia and potentiates metalloproteinase-induced hemorrhage. ***Thromb Haemost.*** 85(4) p.710-5, 2001.

41 SANO-MARTINS, I.S., TOMY, S.C., CAMPOLINA, D., DIAS, M.B., CASTRO, S.C.B., SOLSA E SILVA, M.C.C., AMARAL, C.F.S., REZENDE, N.A., KAMIGUTI, A.S., WARREL, D.A., THEAKSTON, R.D.G. Coagulopathy following lethal and non-lethal envenoming of humans by the South American rattlesnake (*Crotalus durissus*) in Brazil. ***Q.J. Med;*** 94 p. 551-559. 2001.

42 SERRANO, S. M.T., SHANNON, J.D., WANG,D., CAMARGO, A.C.M., FOX, JW. "A multifaceted analysis of viperid snake venoms by two-dimensional gel electrophoresis: An approach to understanding venom proteomics. ***Proteomics,*** 5 p.501-510, 2005.

43 SERRANO, S.M.T., MAROUN R.C., Snake venom serine proteinases: sequence homology vs. Substrate specificity, a paradox to be solved. ***Toxicon***, 45 p.1115-1132, 2005.

44 SILVA, J.A.A. ***Aspectos Estruturais e de Atividade Biológica da Giroxina (enzima trombina símile) do Veneno da Cascavel Brasileira, Crotalus***

durissus terrificus. 2004. Dissertação (Mestrado)-Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo.

45 SILVA M.B., SCHATTNER M., RAMOS C. R. R., JUNQUEIRA DE AZEVEDO I. L. M., GUARNIERI M. C., LAZZARI M. A., SAMPAIO C. A. M., POZNER R. G., VENTURA J.S., HO P.L.. A prothrombin activator from *Bothrops erytromelas* (jararaca-da-seca) snake venom: characterization and molecular cloning. ***Biochem. J.*** 369 p.129-139, 2003.

46 SLOTTA, K. H.; FRAENKEL-CONRAT, H. L. Estudos químicos sobre os venenos ofídicos. **Memórias do Instituto Butantan**, vol. XII p- 505-513, 1938.

47 SLOTTA, K. H.; FRAENKEL-CONRAT, H. Two Active Proteins from Rattlesnake Venom. **Nature**, 3587 p-213. Julho de 1938.

48 STOCKER K.; FISCHER H.; MEIER J.- Thrombin-like snake venom proteinases. **Toxicon**, 20(1) p. 265-273, 1982.

49 STOCKER,K. F.-*Medical of snake venom proteins* CRC press. Composition of snake venoms. P. 34-50. 1990.

50 TAKEDA, A.K.; BARBOSA, S.F.C.; COSTA, L.M. & ADELINO, M.G.F. Fracionamento do veneno de *Crotalus durissus terrificus* por cromatografia de exclusão molecular. **Rev. Inst. Med. Trop.** São Paulo, 27 (3) p – 115 122, 1985

51 TEMPONE AG, ANDRADE HF JR, SPENCER PJ, LOURENCO CO, ROGERO JR, NASCIMENTO N. *Bothrops moojeni* venom kills Leishmania spp. with hydrogen peroxide generated by its L-amino acid oxidase. ***Biochem Biophys Res Commun.*** 280(3) p.620-624, 2001.

52 THEAKSTON, RGD & KAMIGUTI, AS.-A list of animal toxins and some other natural products with biological products. ***Toxicon***, p. 579-651,2002.

53 TOWBIN, H., STAEHELIN, T., & GORDON, J.. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some

COMISSÃO NACIONAL DE ENERGIA NUCLEAR/SP-IPEN

applications. ***Biochemistry Proc. Natl. Acad. Sci.*** *USA*. 76(9): p. 4350-4354, September 1979.

54 VARGAFTIG, B. B ; PRADO FRANSCESCHI, J; CHIGNARD. M.; LEFORT, J.; MARLAS, G. Activation of Guinea-pig platelets induced by convulxin, a substance extracted from the venom of *Crotalus durissus cascavella*. European Journal of Pharmacology, 68 p- 451-464, 1980.

55 VARGAFTIG, B. B.; JOSEPH, D.; WAL, F.; MARLAS, G.: CHIGNARD, M.; CHEVANCE, L. G. Convulxin induced activation of intact and of thrombin degranulated rabbit platelets: specific crossed desensitization with collagen. ***Eur. J. Pharmacol.***, 92 p. 57 - 68, 1983.

56 VITAL BRAZIL, O.; PRADO FRANSCESCHI, J,; EZEQUIEL WAISBICH. Pharmacology of crystalline Crotoxin. I. Toxicity. **Mem. Inst. Butantan** 33(3) p- 973-980, 1966.

57 VITAL BRAZIL, O.; PRADO FRANSCESCHI, J,; EZEQUIEL WAISBICH. Fator neurotóxico na peçonha da *Crotalus durissus terrificus* diferente da crotoxina e da crotamina. Ciência e cultura, vol. 19 n° 4 p- 658665, 1967.

58 VITAL BRAZIL, O.; BARBARA EXCELL. Action of crotoxin and crotamin from the vrnom of Crotalus durissus terrificus (South American rattlesnake) on the frog neuro-muscular junction. Physiological society, p-34 e35, 1970.

59 VITAL-BRAZIL, O. Veneno ofídico neurotóxico. ***Rev. Ass. Med. Brasil,*** 26 (6) p. 218, junho 1980.

60 VITAL-BRAZIL, O.-Pharmacology of crotamine. ***Mem. Inst. Butantan,*** 52 (supl): p.23-24, 1990.

61 WESTERMEIER, R; NAVEN, T. Proteomics in Practice. Weinneim, Wiley-VCH, 2002.

COMISSÃO NACIONAL DE ENERGIA NUCLEAR/SP-IPEN

62 ZAMUNER, S.R, TEIXEIRA, C.F.-Cell adhesion molecules involved in the leukocyte recruitment induced by venom of the snake *Bothrops jararaca*. ***Mediators Inflamm***. 11(6) p.351-357, 2002.

M23366

Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares
Diretoria de Pesquisa, Desenvolvimento e Ensino
Av. Prof. Lineu Prestes, 2242 Cidade Universitária CEP: 05508-000
Fone/Fax(0XX11) 3816 - 9148
SÃO PAULO - São Paulo - Brasil
http: //www.ipen.br

O Ipen é uma autarquia vinculada à Secretaria de Ciência, Tecnologia e Desenvolvimento Econômico e Turismo do Estado de São Paulo, gerida técnica, administrativa e financeiramente pela Comissão Nacional de Energia Nuclear, orgão do Ministério da Ciência e Tecnologia, e associada à Universidade de São Paulo.