

BC/20778
IB/80542



T/UNICAMP

F221_i

MARIA DE FATIMA LOVO FARAH

ISOLAMENTO DE FATORES PROTÉICOS INIBIDORES DOS EFEITOS LETAIS
DO VENENO DE BOTHROPS JARARACA PROVENIENTES DO SORO DO MARSUPIAL
DIDELPHIS ALBIVENTRIS.

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo (a) candidato a)

Maria de Fátima Lovo Farah

e aprovada pela Comissão Julgadora.

Sergio Marangoni
07/12/93

Tese apresentada ao Instituto
de Biologia da Universidade
Estadual de Campinas, para
obtenção do Título de Doutor
em Ciências, área de Genética

ORIENTADOR- Prof. Dr. SERGIO MARANGONI

CAMPINAS - SÃO PAULO
1993

UNIDADE	IB
N.º CHAMADA:	T F221i
V.	Ex.
TOMADO SC/	20778
PROC.	286/94
C	☐
D	☒
PREÇO	CR\$ 8.000,00
DATA	05/02/94
N.º CPD	

CM000 54662-1

BIB: 000072036

1910 1-7-78 1-7-78 1-7-78
 2-0-0-1 1-0-1-1 1-0-1-1
 1-0-1-1 1-0-1-1 1-0-1-1
 1-0-1-1 1-0-1-1 1-0-1-1
 1-0-1-1 1-0-1-1 1-0-1-1

Este trabalho foi realizado com o auxílio (Bolsa de Estudo) concedido pela Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Fundo de Apoio ao Ensino e Pesquisa da UNICAMP (FAEP).

AGRADECIMENTOS

A Universidade Estadual de Campinas e Instituto de Biologia pelo estímulo ao aperfeiçoamento profissional através de seus cursos de Pós-Graduação.

Ao Prof. Dr. Benedito Oliveira, Professor Titular de Bioquímica do Instituto de Biologia da UNICAMP, a quem devo minha introdução na atividade de pesquisa.

Ao Prof. José Camillo Novello, Professor Assistente do Departamento de Bioquímica do Instituto de Biologia da Unicamp pelo auxílio na elaboração e discussão dos experimentos.

Aos funcionários e professores do Departamento de Genética e Evolução pela atenção dispensada através do Curso de Pós-Graduação em Genética.

Aos funcionários e colegas do Departamento de Bioquímica que direta ou indiretamente colaboraram para a realização deste trabalho.

ÍNDICE

	Pag.
RESUMO.....	1
ABSTRACT.....	4
LISTA DE ABREVIATURAS.....	7
1 - INTRODUÇÃO.....	8
2 - MATERIAIS E MÉTODOS	
2.1 - Animais utilizados.....	14
2.2 - Obtenção do soro de <u>D. albiventris</u>	14
2.3 - Imunização de coelhos contra soro de <u>D. albiventris</u> ..	15
2.4 - Dosagem de proteínas.....	16
2.5 - Teste de toxicidade do veneno de <u>B. jararaca</u> - Deter- minação da dose letal ₅₀ em camundongos.....	16
2.6 - Teste da resistência do marsupial <u>D. albiventris</u> ao veneno de <u>B. jararaca</u>	16
2.7 - Filtração em gel de exclusão molecular.....	17
2.8 - Cromatografia de troca iônica.....	18
2.9 - Eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE-SDS).....	19
2.10- Teste de transferência da atividade protetora presente no marsupial <u>D. albiventris</u> , contra o veneno de <u>B.</u> <u>jararaca</u> , para animais heterólogos.....	20
2.11- Determinação da inibição da atividade hemorrágica do veneno de <u>B. jararaca</u> , pelo soro de <u>D. albiventris</u> e frações protéicas.....	21
2.12- Determinação da inibição da agregação plaquetária hu- mana, induzida por trombina, através de proteínas pre- sentes no soro de <u>D. albiventris</u>	21
2.13- Eletroforese de transferência ("blotting").....	24
2.14- Caracterização imunoenzimática ("Immunoblotting")....	25
2.15- Cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC).....	26
2.16- Seqüenciamento de aminoácidos.....	26
3 - RESULTADOS	
3.1- Toxicidade do veneno de <u>B. jararaca</u> - dose letal ₅₀	30
3.2- Resistência de <u>D. albiventris</u> ao veneno de <u>B. jararaca</u> ..	30
3.3- Purificação das frações protéicas do soro de <u>D. albiventris</u> por cromatografia de exclusão molecular..	30
3.4- Análise eletroforética (PAGE-SDS) das frações protéicas do soro de <u>D. albiventris</u> obtidas por exclusão molecular.	31
3.5- Isolamento das frações protéicas do soro de <u>D. albi-</u> <u>ventris</u> por cromatografia de troca iônica e caracte- rização eletroforética (PAGE-SDS).....	34
3.6- Transferência da atividade protetora de <u>D. albi-</u> <u>ventris</u> , contra o veneno de <u>B. jararaca</u>	37

3.7-	Efeito do soro de <u>D. albiventris</u> e frações protéicas sobre a atividade hemorrágica do veneno de <u>B. jararaca</u> ..	37
3.8-	Inibição da agregação plaquetária humana, pelo soro de <u>D. albiventris</u> e frações protéicas.....	38
3.9-	Caracterização imunoenzimática do soro de <u>D. albiventris</u> e fração protéica DA2 por "immunoblotting".....	41
3.10-	Repurificação da fração protéica DA2 por cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC).....	45
3.11-	Determinação da seqüência de aminoácidos da região N-terminal e estudo de homologia seqüencial.....	46
4 -	DISCUSSÃO.....	48
5 -	BIBLIOGRAFIA.....	62

RESUMO

Diferentes animais, incluindo serpentes e alguns mamíferos, são resistentes a venenos ofídicos e, em muitos casos, essa resistência pode ser explicada por proteínas neutralizantes encontradas no soro desses animais.

No presente trabalho, o marsupial D. albiventris, conhecido como gambá-de-orelha-branca, foi testado quanto à resistência direta à ação letal do veneno de Bothrops jararaca. O marsupial foi resistente quando inoculado com uma quantidade de veneno considerada letal para mamíferos suscetíveis, não apresentando qualquer sinal característico do envenenamento. Este resultado levou à investigação do fator responsável pela resistência do marsupial D. albiventris ao veneno de B. jararaca.

Foi possível obter, a partir do soro de D. albiventris, a fração protéica responsável pela ação antiletal ao veneno de B. jararaca, utilizando-se processos de filtração em gel de exclusão molecular em Sephadex G-200 e cromatografia de troca iônica em DEAE-Sephadex A50. A fração protetora, denominada "C" quando isolada por exclusão molecular e "DA2" quando obtida por cromatografia em DEAE-Sephadex A50, foi analisada quanto às suas características físico-químicas e biológicas.

O teste de transferência da atividade protetora, realizado em camundongos, revelou através do soro de D. albiventris e fração protéica protetora isolada que a ação antiletal do marsupial D. albiventris pode ser transferida para animais heterólogos.

A fração protéica protetora isolada por controle eletroforético (PAGE-SDS) apresentou bandas protéicas com massas moleculares estimadas entre 40-60 kDa.

A imunodifusão da fração protéica protetora, na presença do veneno de B. jararaca, não revelou linhas de precipitação, indicando que o fator protetor difere das imunoglobulinas, onde a neutralização é devida a uma reação tipo antígeno-anticorpo.

A ação hemorrágica do veneno de B. jararaca foi inibida, de acordo com o método de injeção na pele realizado em camundongos, pelo soro de D. albiventris e pela fração protéica protetora isolada, revelando que o mesmo fator protéico protetor também apresenta atividade anti-hemorrágica.

O fato de o veneno de Bothrops afetar o sistema hemostático levou à investigação da ação do soro de D. albiventris e frações protéicas isoladas, quanto à eficiência na inibição da agregação plaquetária humana induzida por trombina. Os resultados indicaram que o soro de D. albiventris, mas não os de outros mamíferos testados, e sua fração protetora isolada inibem a agregação plaquetária de modo dose-dependente e de maneira reversível, sugerindo que a defesa natural em D. albiventris esteja relacionada com a prevenção no consumo de plaquetas.

A caracterização imunoenzimática da fração protetora presente no soro de D. albiventris, pela técnica de "immunoblotting", sugere que este fator protéico apresenta baixa imunogenicidade, aumentando a possibilidade de sua utilização na terapêutica de indivíduos picados por serpentes venenosas, evitando o efeito característico da "doença do soro" comumente

ocorrida quando usada a soroterapia com anti-soros de venenos ofídicos produzidos em cavalos.

A repurificação da fração protetora, por cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC), permitiu a obtenção de uma fração protéica purificada cuja seqüência de aminoácidos dos doze primeiros resíduos da região N-terminal apresentou alto grau de homologia, quando comparada com seqüências de proteínas biologicamente relacionadas provenientes de espécies marsupiais já descritas na literatura.

Os resultados apresentados neste trabalho proporcionam a obtenção de uma ferramenta molecular útil para o estudo do mecanismo de ação de venenos ofídicos, sua ação hemorrágica e informações sobre a homologia seqüencial de proteínas estruturalmente e biologicamente relacionadas.

Palavras Chave: Didelphis albiventris - Fator anti-hemorrágico - Resistência Natural

ABSTRACT

Certain animals, including snakes and some mammals, are resistant to snake venoms and, in most cases, this resistance could be explained by neutralizing proteins, found in the blood serum of these animals.

In the present work, the opossum D. albiventris was tested regarding direct resistance to lethal toxicity of Bothrops jararaca venom. When inoculated with a lethal ammount of venom the opossum was resistant. No characteristics signs of envenomnation were observed. These results lead to the investigation about the nature the resistance factor in the serum from the opossum D. albiventris, which inhibits the lethal toxicity of B. jararaca venom.

Fractionation in Sephadex gel filtration and DEAE Sephadex A-50 of D. albiventris serum identified an antilethal protein fraction that inhibits the lethal toxicity of B. jararaca venom. Protective fraction was named "C", when fractioned by Sephadex gel filtration and it was named "DA2", when obtained from chromatography on DEAE Sephadex A-50. These fractions were tested to determine their biological and physicochemical characteristics.

The D. albiventris serum and protective fractions were able to protect mice from the toxicity of the B. jararaca venom.

SDS-PAGE showed heterogeneity of isolated protective fraction and the molecular mass was stimated in the range of 40-60 kDa.

The protective factor do not form perception lines with the venom in an immunodiffusion test. This characteristic lead to the conclusion that the protective factor found in the D. albiventris serum was not immunoglobulin.

The D. albiventris serum and protective fraction inhibited the hemorrhagic activity of the B. jararaca venom, showing that the protective factor presents antihemorrhagic and antilethal activity.

The D. albiventris whole serum, and also the isolated proteic fraction was tested to determine the inhibition of thrombin-induced human platelet aggregation. The results indicated that D. albiventris serum and its protective fraction, but not the sera from others mammals, was able to inhibit thrombin-induced human platelet aggregation in a dose dependent and reversible manner. Thus, it is possible that the natural defense observed in the opossum D. albiventris could be related to the prevention of platelet consumption.

Immunoblotting technics permitted the immunoenzimatic characterization of the protective fraction presents in D. albiventris serum. Results suggest that this proteic factor presents low immunogenecity and can be eventually used, for medical treatment against snake bites, avoiding serum sickness, induced by administration of the horse venom antiserum proteins.

The protective fraction was repurified by HPLC chromatography and a purified protein fraction was isolated. The sequence of the first 12 N-terminal aminoacids was obtained by automated Edman degradation. The alignment of the N-terminal aminoacids

sequence with other biological related proteins shows high homology.

These findings may contribute to a better understanding of the venom mechanism of action and hemorrhagic activity, and also provide information about the relation of biological functions and primary structure of proteins.

Key words: Didelphis albiventris - Antihemorrhagic activity
- Natural resistance

LISTA DE ABREVIATURAS

ADP - adenosina difosfato
AMPc - monofosfato de adenosina cíclico
ATZ- anilinoazolinona
BICP - 5-bromo-4-cloro-3-indolilfosfato
CAPS - 3-[ciclohexilamino]-1-propano-ácido sulfônico
DEAE - dietilaminoetil
DL - dose letal
DTT - ditionitrito
EDTA - ácido etilenodiaminotetraacético
GMPc - monofosfato de guanosina cíclico
HPLC - cromatografia líquida de alto desempenho
NBT - "nitroblue tetrazolium"
NO - óxido nítrico
PAGE-SDS - eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de
dodecilsulfato de sódio
PITC - fenilisotiocianato
PRP - plasma rico em plaquetas
PTH-S-CMCys - feniltioidantoína-S-carboximetil cisteína
TEMED - tetrametiletilenodiamina
TFA - ácido trifluoroacético
TMA - trimetilamina

INTRODUÇÃO

O trabalho pioneiro publicado por Fontana (1781) revelava: "O veneno da víbora não é venenoso para sua própria espécie". Esta afirmativa dava início à investigação científica sobre a imunidade natural presente em muitas espécies animais.

Dados apresentados na literatura revelam que serpentes venenosas e não venenosas são resistentes a venenos ofídicos (Nichol e cols., 1933; Keegan e Andrews, 1942; Essex, 1945; Swanson, 1946; Philpot e Smith, 1950; Bonnet e Guttman, 1971; Omori-Satoh e cols., 1972; Straight e cols., 1976; Ovadia e cols., 1975,1977; Ovadia e Kochva, 1977; Tomihara e cols., 1988). Straight e cols. (1976) verificaram que o plasma sanguíneo de Crotalus atrox e Crotalus adamanteus tinha a capacidade de neutralização não apenas de seus próprios venenos, mas também de venenos de outras espécies, e que os plasmas dessas serpentes eram suficientemente potentes para serem utilizados no tratamento de indivíduos picados por serpente. Ovadia e cols. (1975,1977) descreveram que o soro da Vipera palaestinae contém tanto o fator antineurotóxico como o fator anti-hemorrágico.

Muitos animais de sangue quente também são imunes a venenos ofídicos. Ovadia e Kochva (1977) demonstraram que Herpestes ichneumon (doninha) é altamente resistente ao veneno de Vipera palaestinae. Garcia e Perez (1984) descreveram um fator anti-hemorrágico, isolado do soro de Neotoma micropus (rato do mato), que confere resistência a esse animal à ação tóxica do veneno de Crotalus atrox.

Existe um grande interesse no isolamento de fatores que conferem resistência a venenos ofídicos para estudos de natureza bioquímica e farmacológica.

O isolamento de frações responsáveis pela resistência do animal a venenos de serpente foi descrito a partir de 1956, quando Philpot e Deutsch isolaram, do soro da serpente não venenosa Lampropeltis getulus floridans, uma preparação que inibe proteases do veneno. Clark e Voris (1969) fracionaram do soro da serpente venenosa Crotalus adamanteus uma fração protéica que neutraliza doses letais desse veneno em camundongos.

Também foram isolados fatores responsáveis pela resistência animal a venenos, induzida por soro da serpente venenosa Trimersurus flavoviridis (Omori-Satoh e cols., 1972), da serpente não venenosa Dinodon semicarinatus (Tomihara e cols., 1988), do rato Sigmodon hispidus (Pickyangkul e Perez, 1981), dos marsupiais D. virginiana (Menchaca e Perez, 1981), D. marsupialis, P. opossum e L. crassicaudata (Perales e cols., 1991), do ouriço Erinaceus europaeus (De Witt e Weströn, 1987) e da doninha Herpestes edwardsii (Tomihara e cols., 1987).

A grande dificuldade que recai sobre estudos de proteção se deve principalmente à utilização de diferentes animais e venenos, fazendo que a interpretação dos resultados descritos na literatura seja dificultada pela falta da padronização de critérios experimentais.

Há duas maneiras de determinar a imunidade natural (Domont e cols., 1991): por injeção direta do veneno no animal cuja resistência será testada, ou por transferência do material prote-

tor para outro animal não resistente, analisando assim a ação biológica da fração protetora. No primeiro caso se mede a resistência direta e, no segundo, a resistência passiva, indicando que a resistência de um animal pode ser transferida para outro. A resistência direta de um animal é aceita conceitualmente como a sobrevivência do animal, quando inoculado intraperitonealmente, com uma dosagem de, no mínimo, quatro DL₅₀ previamente determinada em camundongos, e a resistência passiva é aceita como a sobrevivência dos camundongos quando inoculados intraperitonealmente com uma mistura pré-incubada, por 30 min. a 37°C, do material protetor com duas DL₅₀ do veneno.

Os marsupiais são mamíferos que têm despertado grande interesse nos estudos relacionados com resistência de animais a venenos ofídicos. Klauber (1972) descreveu que marsupiais se alimentavam de serpentes e deveriam ser resistentes a seus venenos. Esses animais de hábitos noturnos seriam facilmente atacados por serpentes e, provalvelmente, teriam dificuldade para sobreviver se não tivessem um mecanismo de proteção. Essa característica faz dos marsupiais modelos experimentais úteis para a investigação científica do mecanismo de ação do veneno e sua utilização terapêutica.

O gênero *Didelphis* está representado por três espécies, atualmente conhecidas: *D. virginiana*, *D. marsupialis* e *D. albiventris*. *D. virginiana* é de ampla distribuição na América do Norte. *D. marsupialis* é encontrado desde o Norte e Nordeste do México, estendendo-se por toda a América Central, Norte da América do Sul, Brasil Central e Paraguai. *Didelphis albiventris* está amplamente distribuído na América do Sul (Gardner, 1973)

Os pesquisadores Robert M. Werner e James A. Vick (1977) verificaram a resistência de D. virginiana ao envenenamento por serpentes da família Crotalidae. Esses resultados confirmaram o trabalho publicado por Vellard (1949, 1950), que demonstrava marsupiais da América do Sul como resistentes a venenos crotálicos.

Estudos "in vitro" demonstraram que a atividade proteolítica e hemorrágica do veneno de Crotalus atrox é bloqueada na presença do soro do marsupial D. virginiana (Huang e Perez, 1980).

Foram isoladas frações do soro de D. marsupialis, Philander opossum e Lutreolina crassicaudata que protegem camundongos contra o veneno de B. jararaca. Essas frações isoladas foram caracterizadas eletroforeticamente em gel de poliacrilamida e mostraram a presença de apenas duas bandas protéicas com massas moleculares estimadas de 48.5 kDa e 42.6 kDa. As frações de massa molecular 48.5 kDa foram isoladas por interação hidrofóbica e "western blotting" e submetidas à degradação automática de Edman, para determinação da sequência de aminoácidos N-terminal, revelando homologia sequencial nas três espécies (Perales e cols., 1991).

Catanese e Kress (1992) isolaram do soro de D. virginiana um inibidor de proteinase (OPRIN), relacionado com a resistência desse marsupial aos efeitos das metaloproteinases e toxinas hemorrágicas do veneno de Crotalus atrox, obtendo resultados concordantes com os descritos por Huang e Perez (1980). A sequência de aminoácidos de OPRIN, obtida pelo método do DNA complementar, não mostrou homologia significativa com inibidores

de proteinase conhecidos, mas similaridades com a α B-glicoproteína humana, proteína plasmática, cuja função não é conhecida e está relacionada à super família das imunoglobulinas (Schwick e Haupt, 1981).

O veneno ofídico é uma mistura complexa de toxinas animais e é de difícil neutralização. Sua ação letal é exercida através de enzimas e toxinas, que podem direta ou indiretamente afetar órgãos vitais. Mamíferos picados por serpentes venenosas apresentam manifestações como hemorragia localizada, necrose do tecido, edema e defeitos na coagulação sistêmica (Ohsaka, 1979).

Os venenos crotálicos são ricos em enzimas incluindo proteínases que estão envolvidas em danos patológicos induzidos por suas picadas. Enzimas proteolíticas estão conectadas com atividades biológicas específicas como a hemorragia (Mandelbaum e cols., 1976; Bjarnason e Tu, 1978), sendo aceito que esta atividade hemorrágica contribui para a letalidade dos indivíduos picados (Ovadia, 1978a; Menchaca e Perez, 1981; Pickyangkul e Perez, 1981; Garcia e Perez, 1984). O mecanismo pelo qual os animais resistentes neutralizam a atividade hemorrágica dos venenos ofídicos não está ainda esclarecido.

Marsupiais resistentes aos efeitos letais do envenenamento por serpente mostram pouca ou nenhuma hemorragia localizada, edema ou necrose do tecido depois de receber injeções do veneno em quantidades 5-60 vezes a dose conhecida como letal para mamíferos suscetíveis (Kilmon, 1976; Werner e Vick, 1977).

Pesquisadores como Bjarnason e Tu (1978), Kurecki e Kress (1985) descreveram que a hemorragia, decorrente da picada de serpente, é causada por metaloproteinases do veneno, sugerindo

que o soro de animais resistentes aos efeitos hemorrágicos do veneno deva conter inibidor(es) de metaloproteinase(s). Tanizaki e cols. (1991) purificaram um inibidor de proteinase do soro da serpente B. jararaca, que inibe a atividade hemorrágica do seu próprio veneno. A atividade proteolítica da bothropasina e pro-tease J , ambas metaloproteinases do veneno, foram neutralizadas pelo inibidor. Weissemberg e cols. (1991) isolaram fatores anti-hemorrágicos do soro de C. atrox que neutralizam a atividade proteolítica do veneno de C. atrox, sendo que a capacidade de neutralização das anti-hemorraginas isoladas foi seis vezes mais alta que o anti-veneno polivalente comercial, produzido para uso clínico. Várias anti-hemorraginas foram testadas quanto a sua atividade antiproteolítica e demonstraram inibir a atividade proteolítica das hemorraginas e outras proteinases (Omori-Satoh, 1972; Kress e Catanese, 1985; De Wit e Westrom, 1987).

Este trabalho tem como objetivo o isolamento e a caracterização físico-química do fator protéico presente no soro do marsupial brasileiro Didelphis albiventris, que confere a este animal proteção contra os efeitos letais do veneno de Bothrops jararaca, bem como verificar a homologia seqüencial do mesmo fator com o de outras espécies, a fim de obter informações de caráter evolutivo, e possibilitar a investigação do seu efeito no sistema hemostático.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Animais utilizados

Foram utilizados 6 exemplares (2 fêmeas, 4 machos; pesos de 1 a 4 kg) de Didelphis albiventris, conhecidos como gambás-de-orelha-branca, capturados na região de Campinas.

Os coelhos utilizados para imunização foram espécimes de linhagem não definida ("out bred").

O veneno de Bothrops jararaca foi doado pelo Instituto Butantan de São Paulo.

Os camundongos brancos tipo "swiss" utilizados foram obtidos no Biotério Central da UNICAMP.

Os animais utilizados neste trabalho foram mantidos e manipulados de acordo com os princípios éticos na experimentação animal da COBEA - Colégio Brasileiro de Experimentação Animal.

2.2. Obtenção do soro de Didelphis albiventris

O sangue de D. albiventris foi obtido por punção cardíaca, mantido a 37°C em banho-maria por aproximadamente 30 minutos, sendo em seguida separado o soro por centrifugação em uma centrífuga Sorval RC-2B a 900xg durante 20 minutos a 4°C, distribuído em alíquotas de 1 ml e mantido a -20°C. Os experimentos foram realizados com lotes de soro individuais.

2.3 Imunização de coelhos contra soro de Didelphis albiventris

Os coelhos foram inoculados com soro normal de D. albiventris na concentração final de 10mg proteína/ml. As doses de reforço foram com antígeno, diluído em salina fisiológica na concentração de 10mg proteína/ml. O esquema de imunização empregado foi: primeira inoculação realizada com o antígeno, emulsificado em adjuvante completo de Freund (10mg proteína/animal), injetado por via intramuscular nas duas coxas traseiras; segunda inoculação, realizada 15 dias após a primeira, antígeno com adjuvante de Freund completo via intramuscular em dois locais como na primeira inoculação; na terceira inoculação (quatro semanas após a primeira), administra-se o antígeno em salina fisiológica ("booster") (1,0mg proteína/animal), via intradérmica em quatro pontos previamente depilados com auxílio de uma gilete, localizados no dorso do animal. As injeções intradérmicas são repetidas de 7/7 dias até obtenção de reação local do tipo Arthus.

Foram executadas sangrias a partir de cortes do bordo externo de uma das orelhas do animal. O sangue coletado foi mantido a 37°C em banho-maria por aproximadamente 30 minutos, sendo em seguida centrifugado em uma centrífuga Sorval RC 2-B a 900xg durante 20 minutos, distribuídos em alíquotas de 1ml, e mantidos a -20°C.

2.4 Dosagem de proteínas

A concentração de proteína foi determinada como descrita por Lowry e cols. (1951). Soroalbumina bovina (Sigma, USA) foi usada na determinação da curva padrão. Absorbância foi realizada em comprimento de onda de 280nm, em espectrofotômetro Beckman modelo 25.

2.5 Teste de toxicidade do veneno de Bothrops jararaca - Determinação da dose letal 50 em camundongos

A DL₅₀ determina a quantidade de veneno necessário para matar 50% dos animais testados em 24 horas.

Camundongos "swiss" (18-20g, ambos os sexos), foram inoculados por via intravenosa, com 1,0ml do veneno dissolvido em solução fisiológica tamponada pH 7,4 em quatro doses com intervalos de 1,5. Foram utilizados 6 animais/dose. A DL₅₀ foi determinada após um intervalo de 24 horas, e os cálculos foram determinados segundo método descrito por Weil (1952).

2.6 Teste da resistência do marsupial Didelphis albiventris ao veneno de Bothrops jararaca

Foram utilizadas espécimes de D. albiventris (aproximadamente 3 Kg, ambos os sexos) capturadas nos arredores da cidade de Campinas e mantidos em cativeiro à temperatura ambiente.

A metodologia utilizada foi aquela de Perez e cols.(1978a) com modificações.

Os animais foram inoculados intraperitonealmente com o veneno de Bothrops jararaca dissolvido em solução fisiológica tamponada pH 7,4 em quatro doses, num volume final de 1ml.

Foi utilizada como dose padrão a DL_{50} determinada em camundongos brancos "swiss" ($DL_{50} = 2,5\mu\text{g/g}$). A 1ª dose inoculada nos marsupiais foi de 25 vezes a DL_{50} ($62,5\mu\text{g/g}$) determinada em camundongos. A 2ª dose foi correspondente a 50 vezes a DL_{50} ($125\mu\text{g/g}$) determinada em camundongos. A 3ª dose foi correspondente a 75 vezes a DL_{50} ($187,5\mu\text{g/g}$) determinada em camundongos e a 4ª dose foi correspondente a 100 vezes a DL_{50} ($250\mu\text{g/g}$) determinada em camundongos.

2.7 Filtração em gel de exclusão molecular

Para a filtração em gel, foi utilizada coluna de vidro de procedência da Pharmacia Upsalla (2,5 x 100cm) "empacotada" com Sephadex G-200 (Pharmacia Fine Chemicals) entumescido em tampão tris-HCl 0,1M pH 8,1; o volume útil do gel foi 300ml, sendo aplicados 2,0ml de material, contendo 150mg de proteína, previamente dialisado contra o tampão de equilíbrio da coluna; as frações foram eluidas com o mesmo tampão. A coluna foi calibrada com azul de Dextran, soroalbumina bovina (Sigma, USA) e IgG mielomatosa GOB (isolada no laboratório de Química de Proteínas - IB - UNICAMP). Conhecidos os parâmetros V_o , V_t e V_e , foram determinados os valores de K_{av} para IgG, GOB e albumina, segundo Laurence e Killander (1964), utilizando-se a expressão:

$$K_{av} = \frac{V_e - V_o}{V_t - V_o}$$

Kav: coeficiente de partição entre fase líquida e gel;

Vo: volume total eluido com uma substância que é completamente excluída do gel (volume "morto")

Ve: volume de eluição de cada uma das frações, cujos valores estão compreendidos entre Vo e Vt (volume eluente)

Vt: volume total do leito de gel

2.8 Cromatografia de troca iônica

Foi utilizada a resina de DEAE-Sephadex A 50 equilibrada com tampão acetato de sódio 0,01M pH 3.7.

O soro de Didelphis albiventris foi dializado durante 24 horas contra o tampão de equilíbrio da resina. Após a diálise o soro foi centrifugado a 900xg durante 15 minutos. O sobrenadante foi passado através da coluna de DEAE-Sephadex A 50 (2,0 x 30cm) a 4°C. As frações foram eluídas em gradiente "step wise" sendo os primeiros 200ml em tampão acetado de sódio 0.01M pH 3,7 e as frações seguintes coletadas no mesmo tampão, acrescido de cloreto de sódio 0.15M. As frações foram separadas em um coletor Gilson num volume de 2,5ml por tubo em fluxo descendente de 15ml/hora. A leitura dos eluatos foi realizada por absorção em 280nm num espectrofotômetro (Beckman modelo 25), utilizando-se cubetas de quartzo de 10mm de caminho óptico. As frações obtidas foram dialisadas contra bicarbonato de amônio 5mM por 24 horas, em seguida liofilizadas e estocadas a -20°C.

2.9 Eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE-SDS)

O método utilizado foi essencialmente aquele de Shapiro e cols. (1967) e Weber e Osborn (1969), com modificações.

Preparação do gel

O gel de concentração contendo 5% e o gel de separação contendo 10% de acrilamida foram preparados a partir de uma solução estoque 0,3M de acrilamida e 4mM de bisacrilamida, dissolvidos em água desionizada. Estas soluções foram filtradas em papel de filtro Whatmann nº 1 e mantidos a 4°C em frasco escuro.

O gel de concentração foi preparado a partir de tampão Tris HCl 1M pH 6,8 e o de separação com tampão Tris HCl pH 8,6 ambos com SDS 0,01%.

A cada gel foi acrescentado 0,025ml (v/v) de N, N, N', N' - Tetrametiletilenediamina (Temed) e de uma solução de persulfato de amônio (10%)

Preparação da amostra

As amostras (10 a 50µl de uma solução de aproximadamente 1mg de proteína por ml) foram dissolvidas em tampão Tris-HCl 0,01M pH 6,8, contendo 2% de SDS, 10% de glicerol e 0,0001% de bromofenol. Estas amostras foram analisadas na sua forma não reduzida e reduzida com ditiotreitol na concentração final de 0,1M. As amostras foram imersas em água em ebulição durante dois minutos. Como marcadores foram utilizados fosforilase b (94 KDa), soro-

albumina bovina (67 KDa), ovalbumina (43 KDa), anidrase carbônica (30 KDa), inibidor de tripsina da soja (20,1 KDa) e α -lactoalbumina (14,4 KDa). A eletroforese foi realizada, utilizando-se aparelhagem BioRad, tampão Tris-HCl 0,025M, glicina 0,1M e SDS 0,1% sendo aplicado uma diferença de potencial de 20V por 1 hora.

Coloração

Proteínas foram coradas com "Coomassie Brilliant Blue" R-250 (Sigma, USA) dissolvido em água/metanol/ácido acético (45:10:35, V/V) por 15 minutos e então descorados em água/metanol/ácido acético (45:10:35, V/V).

2.10 Teste de transferência da atividade protetora presente no marsupial Didelphis albiventris, contra o veneno de Bothrops jararaca, para animais heterólogos

Foram inoculados grupos de 06 camundongos "swiss" (18-20g, ambos os sexos) via intraperitonal com duas DL 50 do veneno de B. jararaca dissolvido em solução fisiológica tamponada pH 7,4 e misturado com o soro de D. albiventris (300 μ g/g animal) e frações protéicas obtidas por cromatografia de exclusão molecular (70 μ g/g animal) e troca iônica (20 μ g/g animal) num volume final de 0,1 ml. A mistura soro e frações séricas com veneno foram incubadas a 37°C por 30 minutos em banho-maria. O veneno bruto foi injetado como controle positivo e a solução salina foi injetada como controle negativo. Os resultados foram observados após 24 horas e expressos como o número de mortes sobre o total de camundongos.

2.11 Determinação da inibição da atividade hemorrágica do veneno de Bothrops jararaca, pelo soro de Didelphis albiventris e frações protéicas.

A atividade hemorrágica do veneno de Bothrops jararaca foi determinada segundo o método de injeção na pele descrito por Kondo e cols. (1960) e modificado por Owby e cols. (1984). Amostras de 0,5-5 μ g de veneno foram dissolvidas em 0,1ml de solução salina fisiológica tamponada pH 7,4 e injetadas por via intradérmica em locais depilados na região ventral de camundongos "swiss" (18-20g, ambos os sexos). Após 2 horas os animais foram sacrificados com éter e a pele rebatida. A área hemorrágica foi determinada medindo-se os diâmetros cruzados obtendo-se a média.

Para a determinação da inibição da atividade hemorrágica a mínima dose hemorrágica do veneno foi incubada com o soro de D. albiventris (120 μ g) e frações protéicas (12 μ g) e inoculadas em camundongos de acordo com o esquema descrito acima. Amostras controle foram utilizadas para determinação dos resultados.

2.12 Determinação da inibição da agregação plaquetária humana induzida por trombina através de proteínas presentes no soro de D. albiventris

A determinação da inibição da agregação plaquetária humana induzida por trombina através de proteínas presentes no soro de D. albiventris, foi realizada em colaboração com o Departamento de Farmacologia da Universidade Estadual de Campinas.

2.12.1 Preparação das plaquetas lavadas

O sangue de voluntários isento de drogas há pelo menos 15 dias foi coletado por punção venosa em recipiente plástico, contendo citrato de sódio 3,8% (concentração final de citrato, 0,38%). O plasma rico em plaquetas (PRP) foi preparado por centrifugação a 200xg por 12 minutos à temperatura ambiente. As plaquetas foram coletadas e lavadas por centrifugação a 900xg por 8 minutos a temperatura ambiente na presença de iloprost (300ng/ml).

O sobrenadante foi removido e as plaquetas ressuspensas em 15ml de tampão de Krebs oxigenado (95% O₂ / 5% CO₂) livre de cálcio. Iloprost (300ng/ml) foi outra vez adicionado, e as plaquetas foram centrifugadas a 900xg por 8 minutos a temperatura ambiente. O sobrenadante foi aspirado e o precipitado ressuspenso em solução de Krebs livre de cálcio (Radomski e Moncada, 1983). O conteúdo plaquetário foi determinado automaticamente (Coulter Coulter model T 890, Hiheah, Fla., USA) e ajustado para 1×10^8 células/ml. Indometacina (10 μ M) e cálcio (1mM) foram adicionados à suspensão plaquetária final

2.12.2. Quantificação da agregação plaquetária

A suspensão de plaquetas lavadas (500 μ l) foi incubada a 37°C por 1 minuto em um agregômetro "Payton dual-channel aggregometer" (Born e Cross, 1963) com centrifugação contínua a 900xg na presença de 50 μ l de soro do marsupial (0,028 - 7,4 mg proteínas/ml) ou de suas frações protéicas (0.1-2 mg proteínas/ml) e então estimulados com trombina (200-400mU/ml).

Alterações na absorbância foram observadas por 5 minutos depois da adição de trombina. O soro de outras espécies (homem, coelho, cachorro, rato e bovino) foram testados de maneira similar. Curvas controle foram feitas com uma suspensão de plaquetas lavadas (500 μ l) e 50 μ l de solução de Krebs seguida de estimulação por trombina.

2.12.3 Quantificação dos nucleotídeos cíclicos plaquetários

Concentrações de GMPc e AMPc foram quantificadas através de um "tritiated radioimmuno assay kit" (Tovey e cols., 1974). Plaquetas lavadas (2×10^8 cels/ml) foram pré-incubadas (15 min) com teofilina (1 mM). Cinquenta microlitros de solução de Krebs ou uma diluição apropriada do soro de marsupial ou suas frações foi adicionada a 500 μ l de suspensão plaquetária pré-aquecida e seguida de incubação por 1 minuto (37°C). A reação foi determinada adicionando-se TCA (10% w/v, 0.5ml). As cubetas foram imediatamente removidas, misturadas vigorosamente por 30 segundos e mantidas em gelo por 30 minutos. As amostras foram lavadas apenas uma vez com 1ml de tri-n-octilamina (1 M em 1,1,2 -triclorotri-fluoroetano), a parte aquosa foi removida, seca por N₂ a 60°C e estocada a -20°C. Antes dos experimentos, as amostras secas foram redissolvidas em 0,05M tris-HCl pH 7,4 e os níveis de nucleotídeos cíclicos determinados. Todas as determinações foram feitas em duplicata.

2.12.4 Determinação do tempo de trombina do plasma humano e do tempo de coagulação do fibrinogênio humano

O tempo de trombina foi determinado adicionando-se trombina (0,5 -1V/100 μ l) a uma mistura de plasma humano (100 μ l) e soro de D.albiventris (100 μ l) ou solução salina (100 μ l) a 37°C. A concentração de trombina bovina escolhida foi aquela com que o plasma humano coagulou até 11-15s sob condições controle.

Trombina bovina (10v/ml) foi pré-incubada por 1 minuto a 37°C com salina ou soro diluído, adicionado-se então o fibrinogênio humano (300 mg/ml) e determinando-se o tempo de coagulação.

2.12.5 Estatística

Resultados são expressos como a média $\pm$ s.e.m. para n experimentos. Comparações estatísticas foram feitas pela média de "Student's t-test" comparados. Valores de $p < 0.05$ foram considerados significativos.

2.13 Eletroforese de transferência ("Blotting")

O soro de D. albiventris e frações protéicas foram submetidas à técnica de "blotting" (Matsudaira, 1987) seguida de transferência eletroforética permitindo que proteínas separadas em gel de poliacrilamida possam ser transferidas e imobilizadas em membranas de nitrocelulose. As bandas transferidas são passíveis de análise por auto-radiografia, imunodeteção, e eluídas para análise de aminoácidos ou sequência de cadeia

polipeptídica.

As amostras protéicas foram transferidas, após corrida eletroforética em gel de poliacrilamida 10% (PAGE - SDS) para membrana "polyvinylidifluoride" (Problot, Applied Biosystems, USA) em tampão CAPS preparado com 2,2g de 3-ciclohexilamino-1-ácido-propanossulfônico e 900ml de água, titulado a pH 11 com NaOH e diluído até 1000ml com metanol. A membrana e o gel de poliacrilamida foram colocados para equilibrar em tampão CAPS por 5 minutos. Em suporte especial e com auxílio da aparelhagem foi feita a transferência a 400V por 50 minutos. As proteínas transferidas foram coradas com 0,1% de "coomassie brilliant blue R-250" em solução 50% de metanol por 5 minutos. Depois de secas as bandas foram recortadas e guardadas em tubos "ependorf" a -20°C.

2.14 Caracterização imunoenzimática ("Immunoblotting")

O soro de D. albiventris e frações protéicas foram fracionados por PAGE - SDS, gradiente 10-20%, e transferidos para membranas de nitrocelulose (Biorad -0,45 μ) segundo Towbin e cols. (1979). Os antígenos presentes nas membranas de nitrocelulose foram então submetidos à caracterização imunoenzimática.

Após bloqueio com leite em pó desnatado (Molico-Nestlé) a 5% em tampão Tris-salina (Tris 10mM e NaCl 0,15M, pH 8,0, Triton X 100 5%) por 16 horas, as membranas foram então recortadas e incubadas com o soro de coelho anti-soro de D. albiventris e soro normal (1:200 em solução bloqueadora-TBS 0.05% triton) por 2 horas em agitação. Em seguida as tiras foram lavadas com Tris-

salina exaustivamente e incubadas por 2 horas com o conjugado imunoenzimático, soro de cabra anti IgG de coelho marcado com fosfatase alcalina (Biorad) diluído 3000 vezes. O excesso do conjugado foi removido com um ciclo de lavagens e os antígenos foram revelados com o substrato cromógeno NBT (Nitroblue tetrazolium - Sigma, USA) e BICP (5-bromo-4-cloro-3-indolilfosfato - Sigma, USA) sendo a reação interrompida com água.

2.15 Cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC)

Foi utilizado equipamento Waters HPLC modelo PDA/991, equipado com duas bombas modelo 510, com injetor automático de amostra U6K e coluna SP 5PW nas dimensões 0,39 x 30cm. A cromatografia para repurificação da fração protéica ativa DA2, foi realizada mediante um gradiente linear de 0-1.0 M de cloreto de sódio em 100 mM de acetato de sódio pH 4.1 por 60 minutos. As amostras foram monitoradas a 220nm.

2.16 Seqüenciamento de aminoácidos

A fração protéica 500pmol obtida da repurificação do material protéico DA2 por HPLC foi ressuspensa em ácido trifluoroacético a 0,1% e submetida à degradação automática de Edman (Edman and Begg, 1967) em um seqüenciador de proteínas e peptídeos, "Applied Biosystems 477A"

O seqüenciador automático de proteínas e peptídeos usa a técnica de degradação de Edman para remover e identificar

aminoácidos a partir da porção N-terminal de um polipeptídeo.

Após ativação de um filtro, composto de papel e fibra de vidro, a amostra foi covalentemente unida a esse suporte, e em seguida colocada na câmara de reação. Depois de cada ciclo degradativo, o aminoácido N-terminal é removido da cadeia polipeptídica na forma derivada de anilintiazolinona (ATZ). O ATZ aminoácido é automaticamente transferido para uma segunda câmara de reação, onde ocorre a conversão para um derivado mais estável, na forma de feniltioidantoína do correspondente aminoácido (PTH). O PTH aminoácido é transferido para um sistema de cromatografia líquida de alta pressão, onde a identificação é realizada em comparação à uma cromatografia de um padrão de PTH aminoácidos. O seqüenciador utilizado foi o modelo 477A, que utiliza, para a identificação dos PTH aminoácidos, um sistema de HPLC modelo 120A, ambos da "Applied Biosystem".

Os reagentes e solventes são transferidos para a câmara de reação e conversão por controle automático através de um micro processador , permitindo seqüências automáticas em alta sensibilidade entre 10-500 picomoles de proteínas ou peptídeos. Os reagentes utilizados foram: R1, 5% fenilisotiocianato (PITC) em n-heptano; R2, 12,5% trimetilamina (TMA) em água; R3, ácido trifluoroacético (TFA), com 0,0025 de DTT; R4, 25% TFA em água com 0,01% DTT; R5, acetonitrila, com 0,001% DTT; S1, n-hepteno; S2, etilacetato; S3, 1-clorobutano; S4, 20% acetonitrila em água.

2.16.1 Ativação do filtro

Um filtro de fibra de vidro foi tratado com Bio-Brene, que fica adicionado ao filtro. Esta ativação foi realizada na câmara

de reação de seqüenciador, onde foram programados dois ciclos de reação para a completa ativação e para eliminar o excesso de reagentes, os quais poderiam interferir durante as etapas da degradação de Edman. A amostra, quando adicionada ao filtro, fica imobilizada e pronta, para iniciar o seqüenciamento. A capacidade máxima é de cerca 30ul. Quando necessário aplicou-se maior volume e secou-se o filtro com nitrogênio após cada aplicação.

2.16.2 Ciclo de Reação

As etapas da degradação de Edman denominadas acoplamento, as quais consistem na união do PITC com o aminoácido da cadeia polipeptídica e na etapa de clivagem para a formação do ATZ aminoácido ocorrem na câmara de reação, que consiste em dois blocos de vidro, internamente aos quais está uma pequena câmara com filtro ativado. Todas as etapas de reação ocorreram no ciclo chamado Normal-1, que tem um período de duração de 43 minutos e 32 segundos. O reagente R2 (TMA) proporciona o pH básico (9 - 9,5) para que o PITC acople ao aminoácido N-terminal do peptídeo, R3, que consiste de TFA, usado para clivar o aminoácido unido ao PITC do resto da cadeia polipeptídica, produzindo o derivado anilino-tiazolina (ATZ) do aminoácido. Após a etapa de clivagem, a proteína é deixada com um novo amino terminal pronto para o próximo ciclo de degradação. Os reagentes utilizados foram os da Applied Biosystems.

2.16.3 Ciclo de Conversão

Nessa etapa da degradação de Edman, o ATZ aminoácido é

transferido da câmara de reação pelo solvente S3 para a câmara de conversão. A ATZ é um derivado instável, sendo desejável sua conversão para um isômero mais estável, que é a feniltioidantoína do correspondente aminoácido (PTH aminoácido). A câmara de conversão consiste em um tubo cônico com um volume interno de 1ml, para onde são enviados os reagentes químicos necessários para o ciclo de conversão, sendo mantida a temperatura constante de 62°C por um período de duração de 44 minutos e 1 segundo.

2.16.4 Identificação dos PTH Aminoácidos

Após completado o ciclo de conversão, uma alíquota do PTH aminoácido é transferida para o coletor de frações, e pode ser contada para confirmar a presença de PTH-S-CMCYs (feniltioidantoína-S-carboximetil) em HPLC, para identificação dos aminoácidos, a qual é feita em comparação com uma análise padrão de PTH aminoácidos.

3 . RESULTADOS

3.1 Toxicidade do veneno de Bothrops jararaca - dose letal 50

A determinação da DL_{50} intra-venosa do veneno de B. jararaca em camundongos forneceu um valor de 2,5 $\mu\text{g/g}$ de animal.

3.2 Resistência de Didelphis albiventris ao veneno de Bothrops jararaca

O marsupial D. albiventris foi testado quanto à sua resistência aos efeitos letais do veneno de B. jararaca tendo sobrevivido às injeções do veneno em doses até 100 vezes maior que a DL_{50} determinada em camundongos, que foi de 2,5 $\mu\text{g/g}$ de animal.

3.3 Purificação das frações protéicas do soro de Didelphis albiventris por cromatografia de exclusão molecular

Com a finalidade de isolamento do fator protetor contra venenos ofídicos, o soro de D. albiventris foi submetido ao fracionamento em uma coluna de Sephadex G 200.

A Figura 1 apresenta o perfil da cromatografia de exclusão molecular do soro de D. albiventris. Foram eluídas três frações correspondentes aos picos A, B e C em tampão tris-HCl 0,1M

pH 8,1, tampão de equilíbrio da coluna. A fração correspondente ao pico A foi eluída em volume de exclusão molecular característico de IgM (900 KDa). O material eluído no pico B apresentou volume de eluição típico de IgG (150 KDa) e o pico C foi eluído em volume de exclusão da albumina (67 KDa).

3.4 Análise eletroforética (PAGE-SDS) das frações protéicas do soro de D. albiventris obtidas por exclusão molecular

A análise em gel de acrilamida das formas nativa e reduzida do soro e frações protéicas de D. albiventris é apresentada na Figura 2.

Na forma nativa as proteínas do soro total de D. albiventris(1) e das frações cromatográficas A (2) e B (3), devido a sua alta massa molecular, se apresentaram principalmente como bandas espessas na interface gel de concentração-gel de corrida. Outras bandas de menor intensidade são observadas nestas amostras. A fração cromatográfica C (4) apresenta bandas protéicas intensamente coradas na região de massa molecular entre 43-67 kDa.

Na forma reduzida podem ser observadas bandas com maior intensidade de cor nas frações B (7) e C (8). Na fração B (7) duas bandas intensamente coradas aparecem com massa molecular ao redor de 67 kDa. Destacam-se na fração C (8) duas bandas com massa molecular aparente ao redor de 43 kDa em relação aos marcadores de massa molecular.

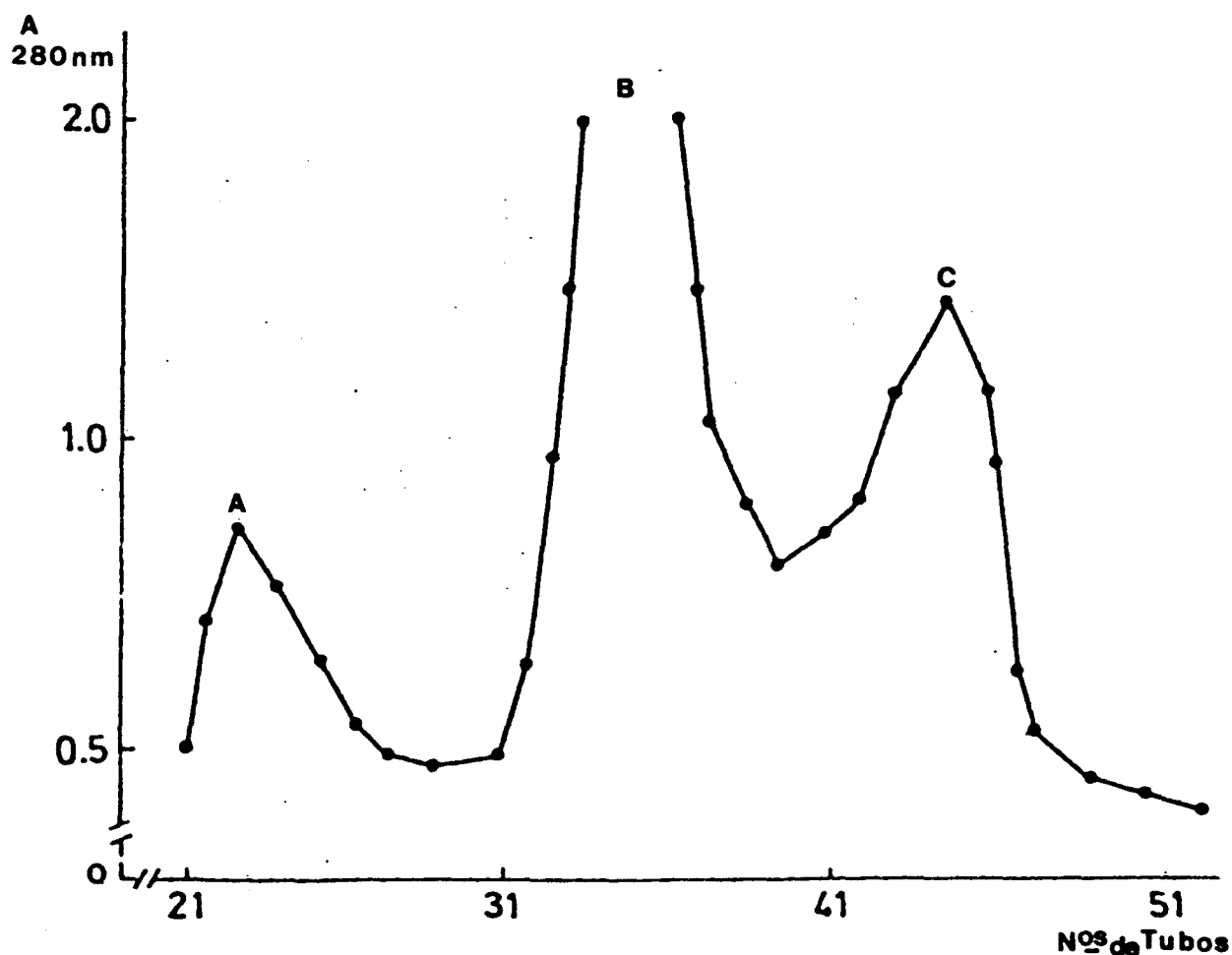


Figura 1- Perfil da eluição do soro de D. albiventris fracionado em Sephadex G-200. O soro (150 mg, 2 ml) foi aplicado em uma coluna (2,5x100cm) de Sephadex pré-equilibrada com tampão tris-HCl (0,1M, pH 8.1). A eluição foi realizada com fluxo descendente de 12 ml/hora a 4°C. As frações (3 ml) foram coletadas e determinada absorbância a 280 nm. Foram eluídas as frações correspondentes aos picos A, B e C.

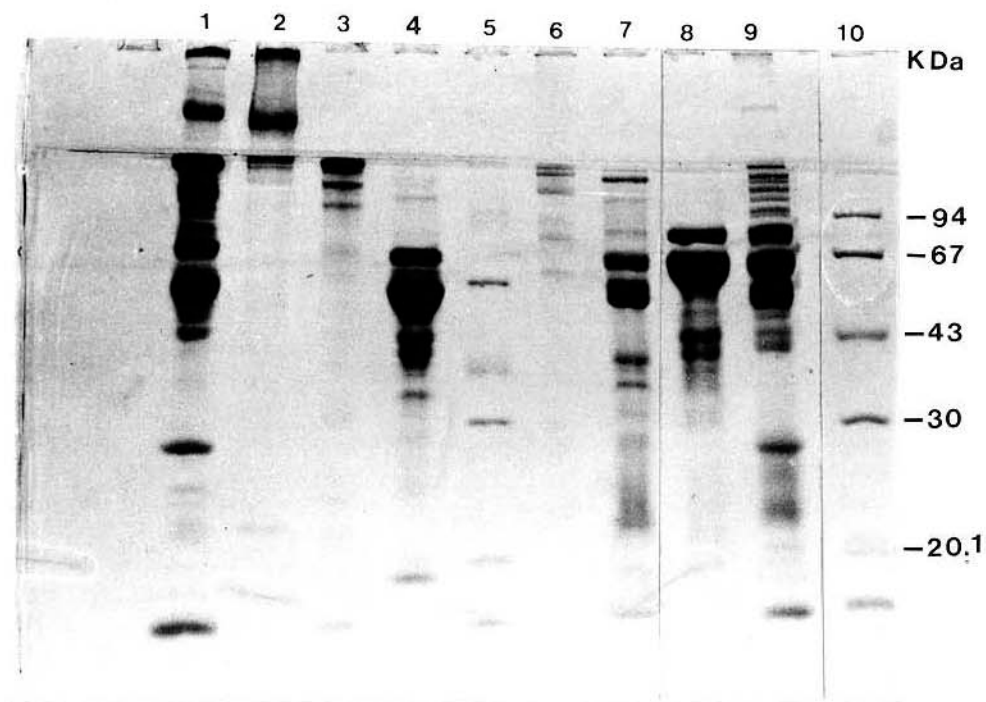


Figura 2- Eletroforese em gel do poliacrilamida a 10% com SDS, do soro de Didelphis albiventris e frações protéicas obtidas por filtração em gel, antes e depois de redução com DTT 0,1M. As amostras não reduzidas foram aplicadas em: (1) soro total de D. albiventris; (2) fração A; (3) fração B; (4) fração C e (5) padrões de massa molecular. Após redução as frações A, B, C, soro total e padrões de massa molecular foram aplicados em (6), (7), (8), (9) e (10), respectivamente. Os padrões de massa molecular (Pharmacia, Sweden) são: fosforilase b (94 kDa), soroalbumina bovina (67 kDa), ovalbumina (43 kDa), anidrase carbônica (30 kDa), inibidor de tripsina da soja (20.1 kDa) e α -lactalbumina (14.4 kDa).

3.5 Isolamento das frações protéicas do soro de D. albiventris por cromatografia de troca iônica e caracterização eletroforética (PAGE-SDS)

Com o objetivo de uma melhor racionalização das etapas de purificação, o soro de D. albiventris foi submetido à cromatografia de troca iônica em DEAE-Sephadex A 50.

A Figura 3 mostra o perfil cromatográfico do soro de D. albiventris em resina de DEAE-Sephadex A-50. Foi utilizado um gradiente de eluição "step wise", que possibilitou a obtenção de dois picos denominados DA1 (1º pico) e DA2 (2º pico). O pico DA1 foi obtido em tampão acetato de sódio 0,01M, pH 3,7 e o pico DA2 foi eluído com o mesmo tampão acrescido de cloreto de sódio 0,15M.

As frações DA1 e DA2 foram submetidas à análise eletroforética em gel de poliacrilamida (PAGE-SDS) como apresentada na Figura 4. A fração DA1 apresenta, nas formas nativa (4) e reduzida (7), bandas coradas mais intensamente na região correspondente à massa molecular aproximada de 67 kDa. A fração DA2, nas formas nativa (1 e 2) e reduzida (5), apresenta duas bandas de diferentes massas moleculares, estimadas entre 43-50 kDa em relação aos padrões de massa molecular (3, 6 e 8).

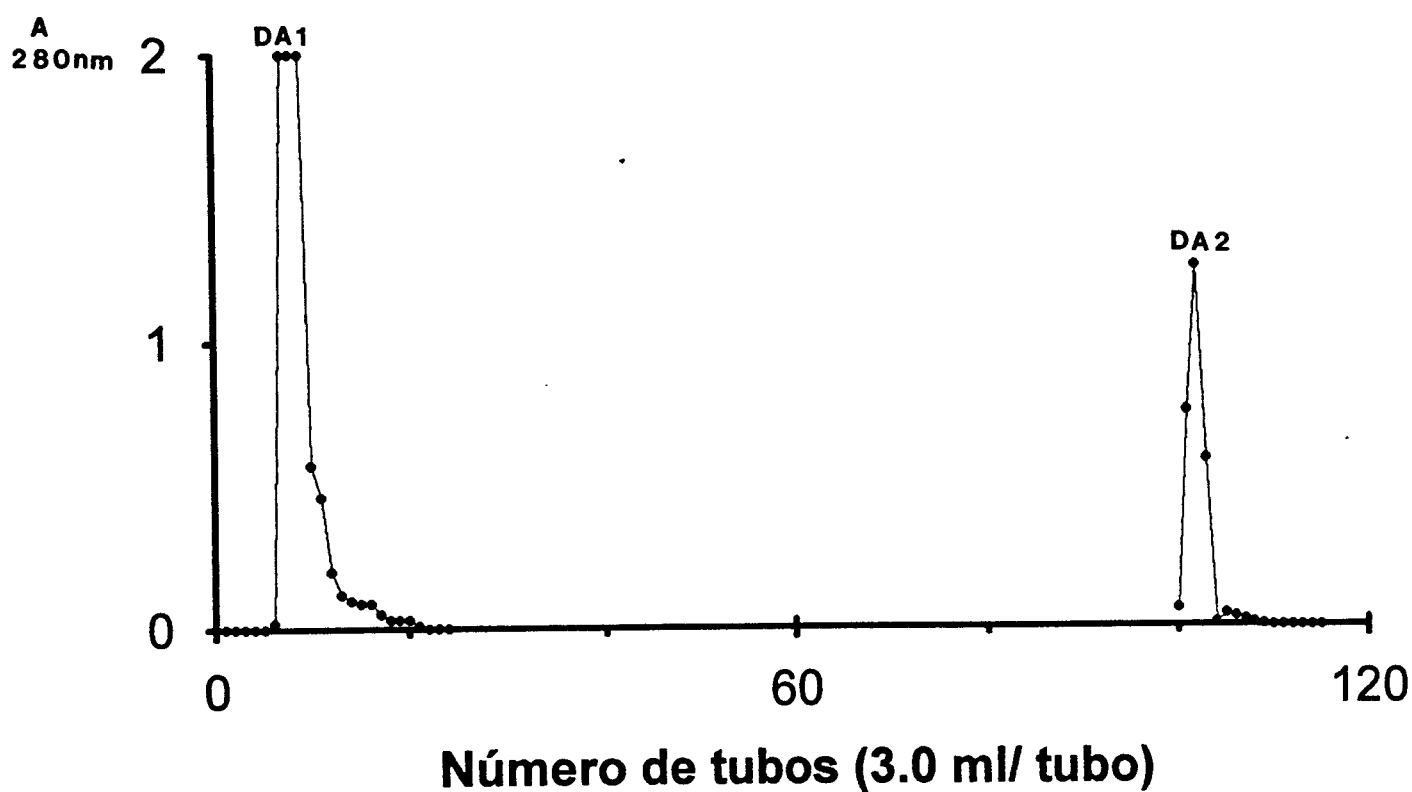


Figura 3- Cromatografia de troca iônica do soro de D. albiventris em coluna (2,0 x 30cm) de DEAE-Sephadex A-50, equilibrada com tampão acetato de sódio 0,01M pH 3,7. Foi utilizado um gradiente de eluição "step wise", que possibilitou a obtenção do pico DA1 no tampão de equilíbrio da resina e do pico DA2 que foi eluído no mesmo tampão mais cloreto de sódio 0,15M.

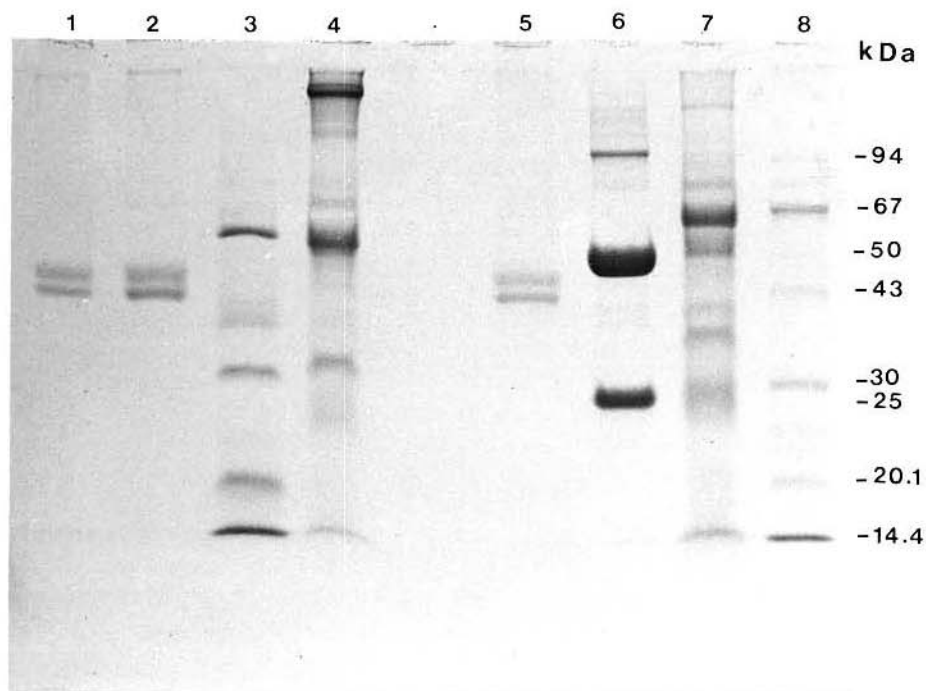


Figura 4- Eletroforese em gel de poliacrilamida a 10% com SDS, das frações protéicas obtidas por cromatografia de troca iônica do soro de D. albiventris, antes e depois de redução com DTT 0,1M. Foram utilizadas como padrões de massa molecular as proteínas fosforilase b (94 kDa), soroalbumina bovina (67 kDa), ovalbumina (43kDa), anidrase carbônica (30 kDa), inibidor de tripsina da soja (20 kDa) e α lactalbumina (14.4 kDa) de procedência "Pharmacia, Sweden", e a proteína IgG mielomatosa JJO reduzida (obtida no laboratório de Química de Proteínas, IB, UNICAMP). As amostras não reduzidas foram aplicadas em: (1 e 2) fração DA2; (3) padrões de massa molecular e (4) fração DA1. Depois de reduzidas, as amostras foram aplicadas em: (5) fração DA2; (6) IgG JJO-cadeia leve, 25kDa e cadeia pesada, 50kDa; (7) fração DA1 e (8) padrões de massa molecular.

3.6 Transferência da atividade protetora de D. albiventris contra o veneno de B. jararaca para camundongos

Para analisarmos a transferência da atividade protetora (resistência passiva) presente no soro de D. albiventris contra a ação letal do veneno de B. jararaca, foi realizado o teste de transferência de proteção (Tabela I), inoculando-se camundongos com o soro e frações protéicas. Como controle positivo foi utilizado o veneno bruto de B. jararaca (2 DL₅₀) e como controle negativo solução salina.

A ação protetora contra os efeitos letais do veneno de B. jararaca foi observada nas amostras do soro de D. albiventris, fração C (obtida por filtração em gel de exclusão molecular) e fração DA2 (obtida por cromatografia de troca iônica).

As amostras DA1 (obtida por cromatografia de troca iônica) e frações A e B (obtidas por filtração em gel de exclusão molecular) não apresentaram atividade protetora contra o veneno de B. jararaca.

3.7 Efeito do soro de Didelphis albiventris e frações protéicas sobre a atividade hemorrágica do veneno de Bothrops jararaca

Com o objetivo de verificarmos a existência de uma ação anti-hemorrágica no soro de D. albiventris e frações purificadas, foi realizado o teste para a determinação da inibição da atividade hemorrágica do veneno de B. jararaca (Fig. 5), de acordo com o método da injeção na pele realizado em camundongos.

A mínima dose hemorrágica do veneno bruto (Fig. 5a) foi utilizada como controle positivo. Em 5b temos a fração protéica DA1 que não apresentou efeito inibidor. O efeito inibidor da fração protéica DA2 e do soro total de D. albiventris sobre a atividade hemorrágica do veneno de B. jararaca é mostrado na Figura 5c,d respectivamente.

3.8 Inibição da agregação plaquetária humana induzida por trombina pelo soro de D. albiventris e suas frações protéicas

Trombina (200U/ml) produziu agregação máxima (100%) e irreversível de plaquetas lavadas em 5 minutos. O soro de D. albiventris, mas não o soro bovino, inibiu a agregação de plaquetas humanas induzida por trombina, de modo dose-dependente (Fig.6). Soro de coelho, cão , rato e humano, na mesma concentração, não inibem a agregação de plaquetas humanas lavadas induzida por trombina (n=3 para cada soro). Altas concentrações de trombina (400-800U/ml) reverteram a inibição plaquetária induzida pelo soro de D. albiventris (Fig. 6). O soro de D. albiventris não desagregou a agregação induzida por trombina (n=3), não inibiu a agregação plaquetária em PRP (n=3) induzida por ADP (10 μ M), adrenalina (10 μ M) ou colágeno (1 μ g/ml). Apenas a fração protetora de D. albiventris foi capaz de inibir significativamente a agregação de plaquetas humanas induzida por trombina (Fig. 7).

Tabela I- Teste de proteção do soro de D.albiventris e suas frações protéicas contra o veneno de B. jararaca

Amostra	Concentração $\mu\text{g/g}$ animal	Veneno ¹	Mortes/total de ² animais em 24 h
Soro D. alb.	300	2 D1 50 ³	0/6
Fração DA1	20	2 D1 50	6/6
Fração DA2	20	2 D1 50	0/6
Fração A	70	2 D1 50	6/6
Fração B	70	2 D1 50	6/6
Fração C	70	2 D1 50	0/6
Solução Salina	-	2 D1 50	6/6
Solução Salina	+	-	0/6

1-O veneno de B.jararaca foi dissolvido em solução salina tampoadada pH 7,4 e misturado com o soro de D. albiventris e frações proteicas num volume final de 0,1ml.

2-Grupos de seis camundongos foram inoculados intraperitonealmente com cada amostra. O veneno bruto foi inoculado como controle positivo e solução salina como controle negativo.Os resultados foram observados após 24 horas e expressos como o número de mortes sobre o total de camundongos.

3- 2 D1 50 = 2x1 D1 50 (2,5 $\mu\text{g/g}$ animal)

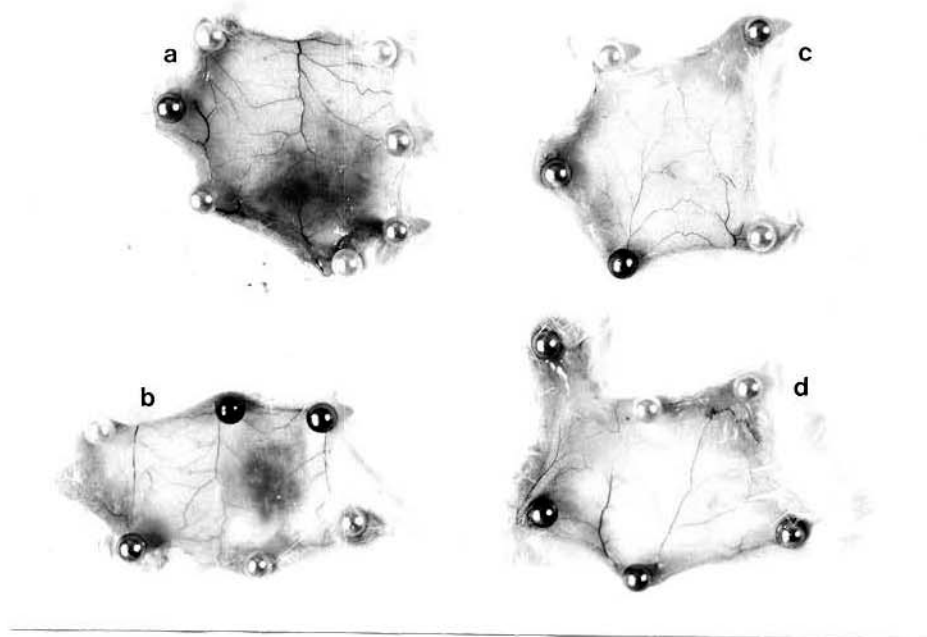


Figura 5- Efeito do soro de D. albiventris e frações protéicas sobre a atividade hemorrágica do veneno de Bothrops jararaca.

A mínima dose hemorrágica ($2\mu\text{g}$) do veneno de B. jararaca foi dissolvida em 0,1ml de salina acrescidas das amostras e injetada em camundongos por via intra-dérmica. As manchas observadas após 2 horas representam a atividade hemorrágica. Foram inoculados em: (a) veneno B. jararaca; (b) veneno de B. jararaca incubado com fração DA1 do soro de D. albiventris; (c) veneno de B. jararaca incubado com fração DA2 do soro de D. albiventris e (d) veneno de B. jararaca incubado com o soro total de D. albiventris

3.8.1 Dosagem dos nucleotídeos cíclicos plaquetários

A inibição da agregação plaquetária humana induzida pelo soro de D. albiventris não foi acompanhada por um aumento significativo nos níveis de cAMP e cGMP plaquetário (Tabela II).

3.8.2 Determinação do tempo de trombina do plasma humano e do tempo de coagulação do fibrinogênio

O tempo de trombina do plasma humano não foi afetado por incubação simultânea com o soro de D. albiventris ($13 \pm 0.9s$ e $12 \pm 0.6s$ na ausência e presença do soro do marsupial respectivamente, $n=6$). Em contraste, o tempo de coagulação do fibrinogênio foi prolongado significativamente seguido da incubação com trombina mais o soro de D. albiventris fresco ou liofilizado. Nenhuma diferença foi observada no tempo de coagulação quando trombina foi incubada com o soro fresco humano, de rato ou bovino (Tabela III).

3.9 Caracterização imunoenzimática do soro de Didelphis albiventris e fração protéica DA2 por "immunoblotting"

As frações protéicas do soro de D. albiventris e a fração isolada DA2 foram submetidas à caracterização imunoenzimática pela técnica de "immunoblotting". Este experimento foi realizado para verificarmos o grau de antigenicidade da fração protéica DA2 isolada do soro de D. albiventris.

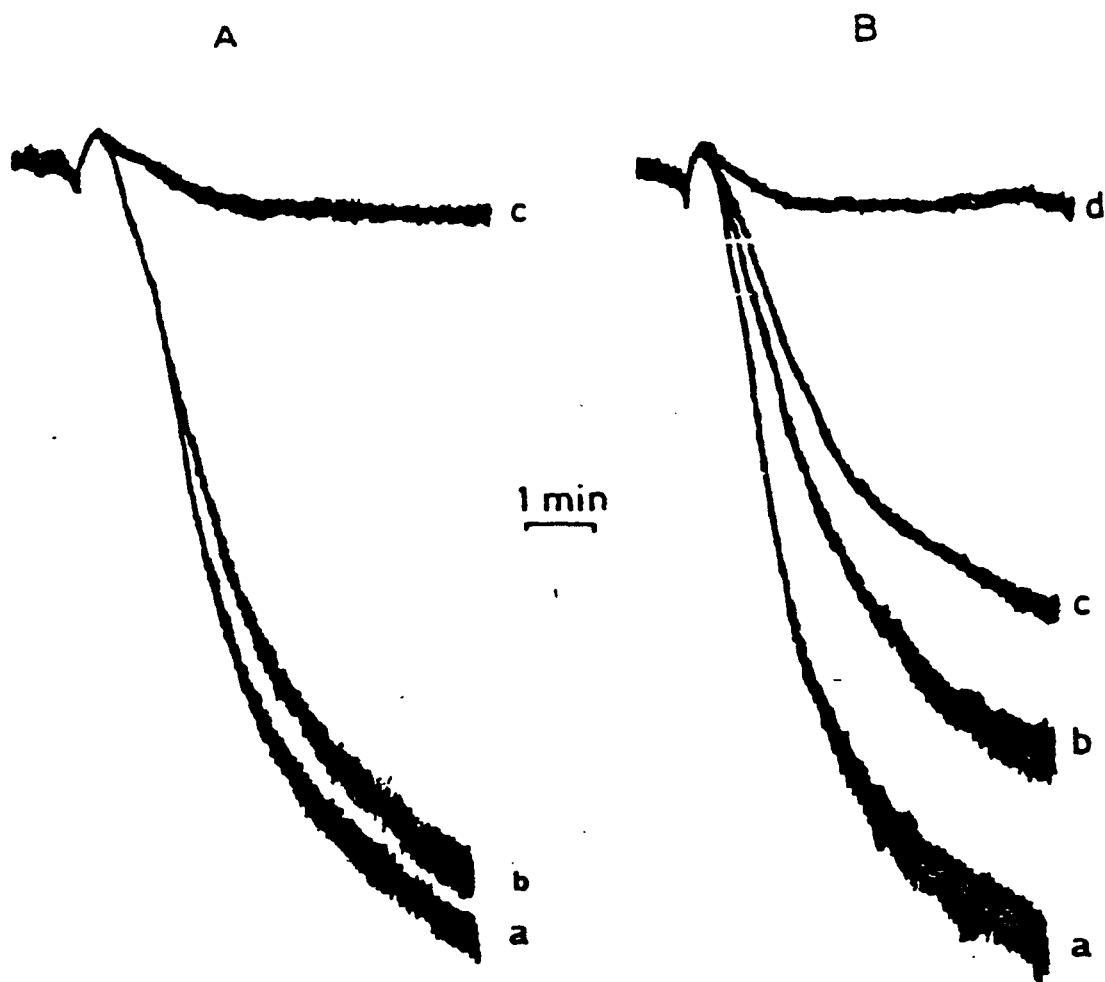


Figura 6- Inibição da agregação de plaquetas humanas. Em A temos o soro de D. albiventris que inibe a agregação de plaquetas humanas lavadas induzida por trombina. Plaquetas lavadas (10^8 /ml) foram pré incubadas com o soro do marsupial por um minuto e então estimuladas por trombina. (a) - trombina (200 U/ml), (b) - trombina (200 U/ml) + soro bovino (2 mg/ml), (c) - trombina (200 U/ml) + soro de D. albiventris (1.8 mg/ml). Em B o soro de D. albiventris de modo dose dependente inibe a agregação de plaquetas humanas lavadas induzida por trombina. (a) - trombina (200 U/ml), (b) - trombina (200 U/ml) + soro de D. albiventris (0.12 mg/ml), (c) - trombina (400 U/ml) + soro de D. albiventris (1.8 mg/ml), (d) - trombina (200 U/ml) + soro de D. albiventris (1.8 mg/ml)

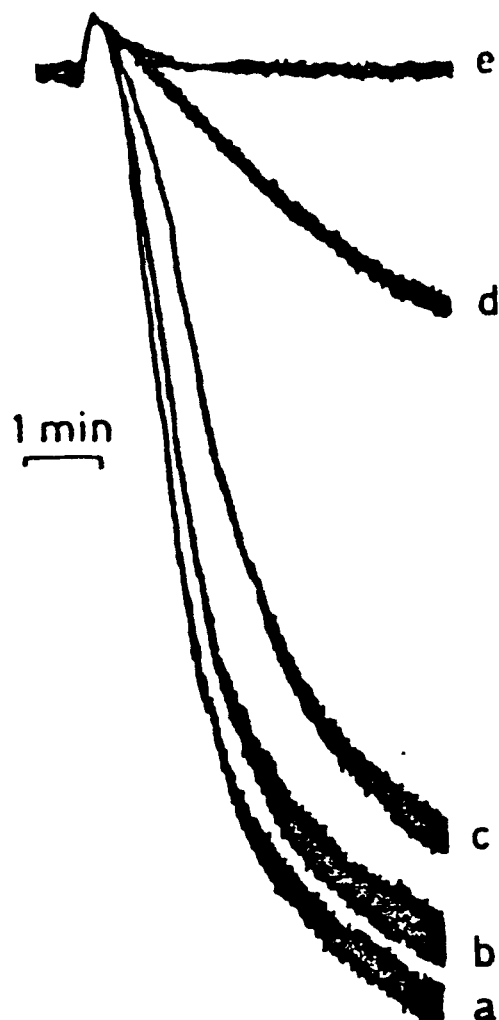


Figura 7-Inibição da agregação de plaquetas humanas. A fração C obtida por cromatografia de exclusão molecular do soro de D. albiventris, mas não A e B, inibem agregação de plaquetas humanas lavadas induzida por trombina. Plaquetas lavadas ($10^8/\text{ml}$) foram pré incubadas com o soro do marsupial por um minuto e então estimuladas por trombina. (a) - trombina (200 U/ml), (b) - trombina (200 U/ml) + fração A (1 mg/ml), (c) - trombina (200 U/ml) + fração B (1 mg/ml), (d) - trombina (200 U/ml) + fração C (1 mg/ml), (e) - trombina (200 U/ml) + soro de D. albiventris (1.8 mg/ml).

Tabela II- Níveis de AMP e GMP cíclico de plaquetas humanas lavadas seguidas da incubação com tampão de Krebs, nitroferrocianeto de sódio, iloprost, soro de D. albiventris e fração C.

Estimulador	Concentração	Níveis de Nucleotídeos Cíclicos (pmol/10 ⁸ células)	
		cGMP	cAMP
Tampão de Krebs	50μl	1.6±0.2	102.8±8.3
Nitroferrocianeto de Sódio	100μM	5.2±1.3*	n.d.
Iloprost	100ng/ml	n.d.	251.5±56.4*
soro <u>D. albiventris</u>	1.8mg/ml	1.5±0.2	109.3±38.6
Fração C	1mg/ml	1.6±0.2	112.0±45.5

Média ±s.e.m., n=6.n.d. - não determinado

* p < 0.05 comparado com o controle (Krebs)

Tabela III- Tempo (segundos) de coagulação do fibrinogênio humano induzida por trombina

Pré-incubação	Tempo de Coagulação	Variação
Salina	36.3±1.7	31-40
Soro <u>D. albiventris</u> liof. (10mg/ml)	57.5±4.2*	50-74
Soro <u>D. albiventris</u> fresco (10mg/ml)	64.2±3.0*	55-75
Soro <u>D. albiventris</u> fresco (1mg/ml)	39.7±1.5	35-45
Soro humano fresco (10mg/ml)	41.8±2.4	34-50
Soro de rato fresco (10mg/ml)	39.0±1.2	35-43
Soro bovino fresco (10mg/ml)	39.2±1.5	35-45

Média ±s.e.m., n=6.

* p < 0.001 comparado ao controle (Salina)

A Figura 8 demonstra que no soro total de D. albiventris foram reveladas bandas de coloração intensa, enquanto que na fração DA2 isolada as bandas apresentaram-se pouco coradas, sugerindo baixa imunogenicidade. O controle negativo da reação foi feito com soro de coelho colhido antes da imunização (soro normal).

3.10 Repurificação da fração protéica DA2 por cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC) e análise eletroforética (PAGE-SDS)

A fração protéica protetora DA2, obtida por cromatografia de troca iônica do soro de D. albiventris, foi submetida à repurificação por cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC) com o objetivo da obtenção de material livre de contaminantes a ser usado para caracterização molecular.

A análise cromatográfica (Fig. 9A) apresenta o desdobramento da fração DA2 em dois picos principais (I e II) que foram dializados contra bicarbonato de amônio 50 mM, liofilizados e submetidos a controle eletroforético (Fig. 9B). O material contido no pico II não apresentou quantidade suficiente para ser detectado. A análise eletroforética mostra na fração protéica DA2 (2) duas bandas protéicas com massas moleculares estimadas entre 40-50 kDa; no material protéico purificado, pico I (1), a banda correspondente àquela superior de DA2 com massa molecular estimada ao redor de 50 kDa. Em (3) está IgG JJO reduzida como marcador de massa molecular (cadeia pesada -50kDa; cadeia leve-25kDa). Em (4) temos a fração DA1. Em (5) temos os marcadores de massa molecular.

3.11 Determinação da sequência de aminoácidos da região

N-terminal e estudo de homologia seqüencial.

A sequência de aminoácidos da região N-terminal da fração I obtida por repurificação de DA2 em HPLC, foi realizada por degradação automática de Edman de 500 pMol de proteína nativa obtida por repurificação em HPLC (cromatografia líquida de alto desempenho), onde foram determinados os primeiros 12 resíduos como se segue: L K A M D P T P P L W I.

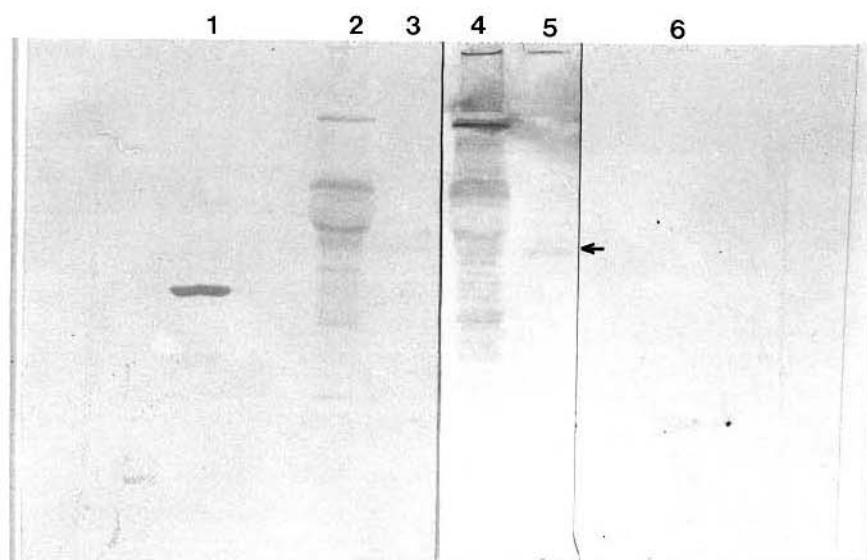


Figura 8- Caracterização imunoenzimática por "immunoblotting" do soro de D.albiventris e fração protéica isolada DA2. A membrana de nitrocelulose apresenta as bandas coradas com "coomassie blue" (1-3) e reveladas pelo substrato cromógeno NBT e BCIP (Sigma, USA) (4-6). Nos poços (1) e (6) estão os marcadores de massa molecular "Pharmacia, Sweden", em (2) e (4) o soro total de D. albiventris e em (3) e (5) a fração protéica isolada DA2.

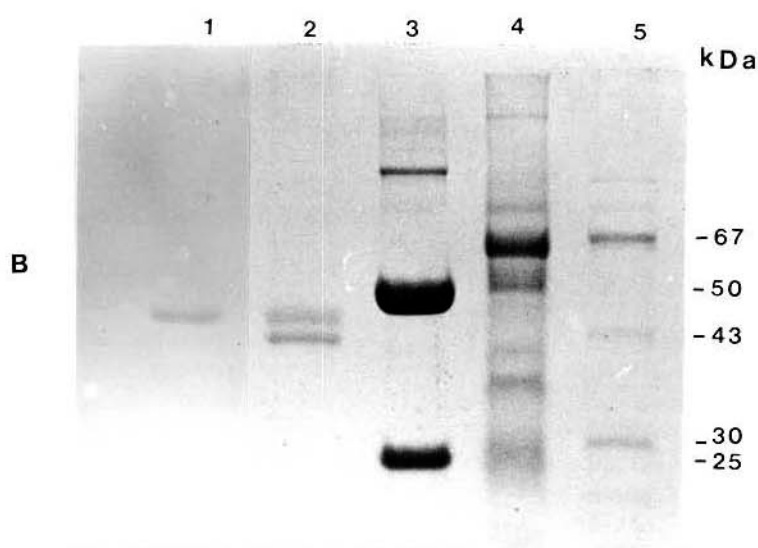
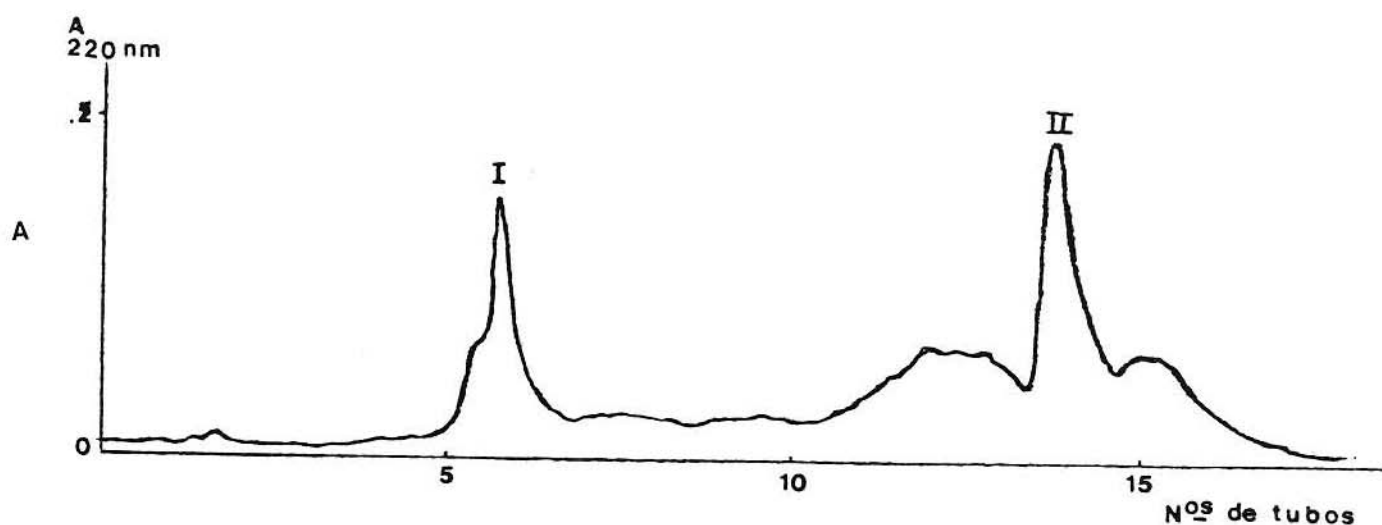


Figura 9- Cromatografia em HPLC da fração proteica DA2. Em 9A são mostrados os picos I e II que foram eluídos mediante um gradiente de concentração linear por 60 min. de 0-1.0 M de cloreto de sódio em 100 mM de acetato de sódio pH 4.1. As amostras foram monitoradas a 220 nm. Em 9B é mostrado o controle eletroforético (PAGE-SDS): 1-pico I; 2-fração DA2; 3-IgG JJO reduzida; 4-fração DA1; 5-marcadores de massa molecular

DISCUSSÃO

Diferentes animais, incluindo serpentes e alguns mamíferos, são resistentes a venenos ofídicos e, em muitos casos, essa resistência pode ser explicada por proteínas neutralizantes encontradas no soro desses animais (Ovadia, 1978b; Weissenberg e cols., 1991; Catanese e Kress, 1992).

De acordo com sua história evolucionária, os marsupiais representam uma lacuna na classe Mammalia, divergindo dos mamíferos em um estágio anterior. O marsupial é considerado um membro primitivo da classe Mammalia, que evoluiu para sua forma atual no período cretáceo.

Os marsupiais têm recebido atenção especial como modelo experimental nas investigações científicas (Jurgelski, 1974) e, demonstrando resistência a venenos ofídicos, apresentam-se como animais experimentais a serem utilizados para estudos relacionados com o mecanismo de ação do veneno e terapêutica no tratamento de indivíduos picados por serpentes.

No trabalho aqui apresentado, foi isolada a fração protéica do soro do marsupial Didelphis albiventris responsável pela ação protetora e/ou anti-hemorrágica contra o veneno da serpente Bothrops jararaca, sendo caracterizada através de suas propriedades químicas e biológicas. Os experimentos foram realizados com lotes de soro individuais e, os resultados apresentaram o mesmo padrão, independentemente da idade, sexo ou procedência dos marsupiais.

O veneno de B. jararaca utilizado neste trabalho foi submetido ao teste de toxicidade através da determinação da DL₅₀ em camundongos, fornecendo o valor de 2,5µg/g animal, resultado con-

sistente com aqueles apresentados por Bücherl (1963).

O marsupial brasileiro Didelphis albiventris foi testado quanto à resistência direta à ação letal do veneno de Bothrops jararaca e sobreviveu, não apresentando qualquer sinal característico do envenenamento, como hemorragia, necrose do tecido, edemas e defeitos na coagulação sistêmica, quando inoculado intraperitonealmente com uma quantidade 100 vezes maior que a DL₅₀ determinada em camundongos. Estes dados fornecem suporte para que Didelphis albiventris possa ser incluído na literatura como mais uma espécie resistente a venenos de serpentes do gênero Bothrops, pois está dentro dos parâmetros apresentados por Domont e cols. (1991), que descrevem a resistência direta de um animal a venenos ofídicos como a sobrevivência do animal quando inoculado intraperitonealmente com, no mínimo, quatro DL₅₀ do veneno letal previamente determinada em camundongos e por Perez e cols. (1978a), que considera o rato do mato Neotoma micropus resistente ao veneno de Crotalus atrox quando o animal sobreviveu à injeção intraperitoneal do veneno numa dose 140 vezes maior que a requerida para causar a morte de camundongos controle.

Foi possível obter, a partir do soro de D. albiventris, a mesma fração protéica responsável pela ação antiletal ao veneno de B. jararaca, utilizando-se processos de cromatografia em gel de exclusão molecular (fração C) e de troca iônica (fração DA2).

A cromatografia de exclusão molecular do soro de D. albiventris mostrou consistentemente o desdobramento do soro em três grupos protéicos, os quais foram submetidos a controle eletroforético e posteriormente, no teste com camundongos, quanto

à resistência passiva daquele marsupial contra o veneno de B. jararaca. O pico C obtido na análise cromatográfica (Figura 1) por controle eletroforético (Fig. 2) mostrou bandas protéicas com massas moleculares entre 40 e 60 kDa. Essa fração protéica foi a responsável pela atividade protetora em camundongos expostos ao veneno (Tabela I), o que está de acordo com os resultados apresentados por Garcia e Perez (1984), que utilizaram essa mesma metodologia para a purificação de um fator anti-hemorrágico do soro de Neotoma micropus que confere a esse animal resistência ao veneno da serpente Crotalus atrox.

A cromatografia de troca iônica (Fig. 3) do soro de D. albiventris permitiu a obtenção das frações DA1 e DA2. O teste de proteção realizado em camundongos (Tabela I) mostra que somente a fração DA2 apresenta atividade protetora contra o veneno de B. jararaca. A eletroforese (PAGE-SDS) desse fator protetor (Fig.4), DA2 mostra duas bandas protéicas, com massas moleculares entre 40 e 50 kDa, característica semelhante ao complexo antibotrópico encontrado no soro de D. marsupialis por Perales e cols. (1991). Esses resultados obtidos para o fator protéico protetor, DA2 de D. albiventris vão ao encontro daqueles apresentados por Tanizaki e cols. (1991), que isolaram o inibidor de proteinase do plasma de B. jararaca que inibe a atividade hemorrágica e proteolítica do seu próprio veneno. A massa molecular desse inibidor foi estimada (PAGE-SDS) ser de 54kDa e, quanto à sua pureza, analisada por eletroforese em gel de poliacrilamida, mostrou apenas uma banda na condição desnaturante e heterogeneidade (duas bandas) em condição nativa, sugerindo a existência de iso-inibidores. Resultados semelhantes foram descritos por

Weissemberg e cols.(1991), que isolaram fatores anti-hemorrágicos do soro de C. atrox, que neutralizam a atividade proteolítica do veneno dessa serpente. Esses fatores anti-hemorrágicos são glicoproteínas homólogas com massas moleculares entre 65kDa-80kDa e que diferem em seus resíduos de carboidratos.

A fração protéica protetora isolada do soro de D. albiventris, quando analisada por imunodifusão na presença do veneno de B. jararaca, não forma linhas de precipitação, resultado semelhante àqueles encontrados em outros fatores protetores isolados (Omori-Satoh e cols., 1972; Ovadia, 1978; Pichyangkul e Perez, 1981; Weissemberg e cols., 1991). Esta característica, juntamente com o padrão de eluição em Sephadex G-200 e DEAE Sephadex A-50, leva à conclusão de que esse fator protetor natural pode ser denominado como "albumin-like" ou fração globulina e não imunoglobulina, cuja neutralização é uma reação tipo antígeno-anticorpo.

Os resultados apresentados na Tabela I indicam que ação protetora do soro de D. albiventris e das frações protetoras isoladas contra a ação letal do veneno de B. jararaca é transferível a animais heterólogos, como o camundongo, podendo então ser utilizada para estudos do mecanismo de ação dos venenos ofídicos.

O soro de D. albiventris e a sua fração protéica protetora, além de possuírem atividade antiletal contra o veneno de B. jararaca, também são capazes de inibir sua ação hemorrágica (Fig.5), sugerindo que aquele inibidor tenha uma ampla especificidade. Resultados similares foram encontrados para os fatores anti-

hemorrágicos de outros animais resistentes a venenos ofídicos, onde o mesmo fator que confere resistência também apresenta ação anti-hemorrágica (Omori-Satoh e cols, 1972; Ovadia, 1978b; Garcia e Perez, 1984; Tomihara e cols., 1990; Weissemberg e cols., 1991; Tanizaki e cols., 1991; Catanese e Kress, 1992).

Resta saber como o soro e frações purificadas de animais resistentes inibem não apenas a atividade hemorrágica, mas também a toxicidade letal do veneno, sendo que a ação antiletal e/ou anti-hemorrágica do soro e frações de animais resistentes são muito mais potentes que o anti-soro de cavalos hiper-imunizados com o veneno bruto. Estudos dessa natureza podem contribuir para a utilização desses fatores protéicos purificados como adjuvantes no tratamento de indivíduos picados por serpentes venenosas e/ou acometidos de doenças hemorrágicas, como proposto por Perez e cols.(1978) e Weissemberg e cols. (1991).

O veneno de *Bothrops* afeta o sistema hemostático, podendo causar severa hemorragia ou oclusão vascular trombótica (Kamiguti, 1988), o que levou à investigação do soro de D. albiventris e frações protéicas, que tem atividade protetora contra o veneno de B. jararaca, no que se refere à eficiência na inibição da agregação plaquetária induzida por trombina humana.

Os resultados descritos (Condino-Neto e cols., 1992) indicam claramente que o soro de D. albiventris e sua fração protéica protetora, mas não os de outros mamíferos testados, inibem a agregação plaquetária humana induzida por trombina de modo dose-dependente e de maneira reversível (Fig. 6).

O aumento do AMPc plaquetário causa inibição da agregação plaquetária (Mills, 1922; Mills e Smith, 1971), devido à remoção

do cálcio do citosol durante a ativação das plaquetas (Kaser-Glanzmann e cols., 1977), diminuição da atividade de quinase da cadeia leve da miosina (Conti e Adelstein, 1981) e inibição da formação de diacilglicerol estimulado por trombina (Billah e cols., 1979). O aumento do GMPc plaquetário também inibe a função plaquetária (Chiang e cols., 1976) por causa do seqüestro de cálcio (Busse e cols., 1987) e por redução da regulação da fosfodiesterase AMPc (Maurice e Haslam, 1990). O óxido nítrico (NO) inibe a agregação plaquetária via mecanismo GMPc dependente (Radomski e cols., 1987). Plaquetas também geram óxido nítrico e L-arginina: modo de ação do NO como um mecanismo "feedback" negativo para regular agregação plaquetária (Radomski e cols., 1990). Entretanto, nenhuma diferença significativa no conteúdo de nucleotídeos foi observada depois da incubação de plaquetas humanas lavadas com soro de D. albiventris e sua fração protetora, indicando que a inibição de agregação plaquetária é devida a outro mecanismo e não ao aumento de nucleotídeos cíclicos.

Produtos ciclooxygenases, como a prostaglandina endoperoxidase (Hamberg e cols., 1974) e tromboxane A₂ (Hamberg e cols., 1975) causam ativação plaquetária. Entretanto a agregação das plaquetas humanas induzidas por trombina é independente da atividade ciclooxygenase (Smith e Willis, 1971). Uma vez que, usamos plaquetas tratadas com indometacina, a inibição da atividade ciclooxygenase pode ser excluída como um mecanismo possível para a inibição da agregação plaquetária induzida por soro.

A demonstração de que a inibição da agregação plaquetária humana induzida por soro de D. albiventris e fração protetora

foram reversíveis por altas concentrações de trombina indica que ela é muito diferente daquelas proteínas que causam danos nas plaquetas, como observado com altas concentrações do inibidor de esfingosina, proteína Kinase C (Krishnamurthi e cols., 1989). A inibição específica observada para agregação de plaquetas humanas lavadas induzidas por trombina poderia dever-se a presença, em PRP, de proteínas que poderiam ligar e/ou inativar a fração protetora do soro de D. albiventris.

O soro de D. albiventris aumenta significativamente o tempo de coagulação do fibrinogênio humano induzido por trombina, colaborando com observações prévias que o soro de marsupial apresenta um efeito anti-trombina (Perez e cols., 1978b). Os resultados apresentados, nos quais o soro de D. albiventris não tem efeito na agregação plaquetária em PRP e no tempo de trombina do plasma humano, sugerem que a(s) proteína(s) responsável(is) pela ação anti-trombina poderia(m) ser "neutralizada(s)" por plasma humano. Curiosamente, as proteínas presentes na fração protetora do soro de D. albiventris têm massa molecular compatível com as proteínas anti-trombinas conhecidas como anti-trombina III (Seegers e cols., 1954) e co-fator heparina II (Bringinshaw e Shamberg, 1974a, b). A habilidade de inativar trombina, pelas proteínas presentes no soro de D. albiventris, requer uma investigação mais criteriosa para que se verifique sua possível homologia com as proteínas anti-trombina III ou co-fator heparina II.

O envenenamento por Bothrops jararaca em modelos experimentais causa disseminação da coagulação intravascular (Rothschild e Almeida, 1972). Então, é possível que a defesa natural observa-

da no marsupial D. albiventris poderia estar relacionada com a prevenção no consumo de plaquetas, aqui demonstrada como a inibição da agregação plaquetária e o aumento no tempo de fibrinogênio humano. A identificação de proteínas que enfraquecem a agregação plaquetária humana induzida por trombina deve constituir uma ferramenta útil para a compreensão dos mecanismos de resposta plaquetária.

O soro de D. albiventris e sua fração protetora DA2 foram caracterizados imunoenzimaticamente pela técnica de "immunoblotting" como mostrado na Figura 8. A utilização desta técnica teve como objetivo a observação do grau de antigenicidade da fração protetora DA2, o que pôde ser determinado devido ao alto nível de sensibilidade que esta metodologia permite. No soro total de D. albiventris foram reveladas bandas de coloração intensa enquanto na fração protetora DA2 as bandas apresentaram-se pouco coradas, sugerindo baixa imunogenicidade. Este resultado pode significar vantagens no preparo e aplicação deste fator protetor como coadjuvante no tratamento de indivíduos picados por serpentes venenosas, uma vez que sendo pouco antigênico, evitaria problemas como a "doença do soro". Estas observações merecem ser investigadas criteriosamente, visando à sua aplicação na área terapêutica.

A fração protéica protetora, DA2, foi repurificada por cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC), permitindo a obtenção do material purificado (pico I, Fig. 9A,B), que apresenta massa molecular correspondente à banda superior (48.5 kDa), presente nas frações antibotrópicas de D. marsupialis, P. opossum e L. crassicaudata, que foram isoladas por "western

blotting", sendo também determinadas suas seqüências de aminoácidos N-terminal (Perales e cols. 1991).

A seqüência de aminoácidos da região N-terminal do pico I purificado de DA2 mostra a presença de um único resíduo na posição N-terminal indicativo do grau de pureza, permitindo a comparação seqüencial dos primeiros doze resíduos de aminoácidos com seqüências de proteínas homólogas descritas na literatura (Fig.10).

O estudo da homologia seqüencial indica que:

1. Os primeiros cinco resíduos são invariáveis para todas as espécies marsupiais.

2. Os primeiros doze resíduos são invariáveis para D. albi ventris, D. marsupialis e L. crassicaudata, diferindo de P. opossum e D. virginiana ("OPRIN") nas posições seis (prolina) e nove (prolina), o que sugere estarem estas duas espécies mais distantes filogeneticamente das outras. Em P. opossum, prolina na posição seis e nove foi trocada por treonina e ácido glutâmico, respectivamente, envolvendo troca entre pirimidinas e purinas. Em D. virginiana, as prolinas das posições seis e nove foram substituídas, respectivamente, por treonina e arginina.

A Figura 11 mostra as substituições de bases nitrogenadas, supostamente ocorridas durante a evolução, dos aminoácidos presentes na região N-terminal das frações protéicas protetoras de diferentes marsupiais.

Em D. virginiana e P. opossum a troca de prolina (posição 6) por treonina deve ter ocorrido na primeira base nitrogenada do códon. Citosina (pirimidina) foi trocada por adenina (purina) e a troca de prolina (posição 9) por arginina (D. virginiana)

provavelmente ocorreu na segunda base do códon onde citosina (pirimidina) foi trocada por guanina (purina).

Em P. opossum houve ainda a troca do aminoácido prolina (posição 9) por ácido glutâmico, o que sugere substituições das duas primeiras bases nitrogenadas (citosinas 1,2 por guanina e adenina respectivamente) do códon. Essa dupla troca, mais a ocorrida na posição 6, permite sugerir que aquele marsupial seja o mais distante filogeneticamente entre os animais comparados. Essas trocas são reflexos de mutações de ponto cujo significado expressa a distância evolucionária entre as proteínas de diferentes espécies.

As proteínas homólogas, aquelas que executam a mesma função biológica em espécies diferentes, geralmente têm cadeias polipeptídicas com alto grau de homologia seqüencial. Muitas posições na seqüência de aminoácidos de proteínas homólogas são ocupadas pelo mesmo aminoácido em todas as espécies, mas em outras posições pode haver uma variação considerável de uma para outra espécie, indicando polimorfismo molecular.

A semelhança na seqüência de aminoácidos de proteínas homólogas é chamada homologia seqüencial. Ela sugere que as espécies portadoras de tais proteínas homólogas devem ter uma origem evolutiva comum. Assim, as seqüências de proteínas homólogas fornecem dados sobre a evolução molecular dessa família de proteínas e se surgiram de um ancestral comum, que sofreram modificações à medida que as diferentes espécies divergiram durante a evolução.

		1	10
DA2	<u>D. albiventris</u>	L K A M D P T P	P L W I...
F IV	<u>D. marsupialis</u>	L K A M D P T P	P L W I...
F IV	<u>L. crassicaudata</u>	L K A M D P T P	P L W I...
F IV	<u>P. opossum</u>	L K A M D T T P	E...
OPRIN	<u>D. virginiana</u>	L K A M D T T P	R L W I...

Figura 10- Estudo de homologia sequencial da fração DA2 obtida do soro de Didelphis albiventris e outras frações protéicas com ação protetora contra venenos ofídicos. DA2, fração protéica do soro de Didelphis albiventris (este trabalho); FIV D. marsupialis, fração ativa do soro de Didelphis marsupialis; FIV L. crassicaudata, fração ativa do soro de Lutreolina crassicaudata; FIV P. opossum, fração ativa do soro de Philander opossum (Perales e cols., 1991); OPRIN, inibidor de proteinase do marsupial D. virginiana (Catanese e Kress, 1992).

Posição 6 <u>D. virginiana</u> <u>P. opossum</u>			Posição 9 <u>P. opossum</u>			Posição 9 <u>D. virginiana</u>		
Prolina	C	C U		C	C U		C	C U
	.			.	.		.	
	.	C		.	.		.	C
	.	A		.	.		.	A
	.	G		.	.		.	G
	.			.	.		.	
	.			.	.		.	
	.			.	.		.	
	.			.	.		.	
	.			.	.		.	
	.			.	.		.	
Treonina	A	C U	Acido	.	.	Arginina	C	G U
		C	Glutâmico	G	A A			C
		A			G			A
		G						G

Figura 11- Substituições de bases nitrogenadas, supostamente ocorridas durante a evolução dos aminoácidos presentes na região N-terminal das frações protéicas com atividade protetora contra venenos ofídicos. Em Philander opossum a prolina na posição seis e nove foi trocada por treonina e ácido glutâmico, respectivamente. Em D. virginiana, as prolinas das posições seis e nove foram substituídas, respectivamente, por treonina e arginina

As seqüências N-terminais das frações protetoras, provenientes de marsupiais, comparadas neste trabalho indicam que essa região da cadeia polipeptídica não deve ter uma função fundamental no exercício da proteção, pois as substituições dos aminoácidos prolina sugerem modificações conformacionais no esqueleto polipeptídico devido à especial geometria da ligação peptídica prolil.

Como vimos, os resultados apresentados sugerem que a fração protetora de D. albiventris, comparada com outras frações protetoras obtidas de diferentes espécies resistentes aos venenos ofídicos, agrupa-se em uma família de proteínas farmacologicamente relacionadas com a atividade de inibidores de proteinases. Entretanto, o inibidor de proteinase "OPRIN" (Opossum Proteinase inhibitor), uma glicoproteína isolada do soro de D. virginiana (Catanese e Kress, 1991), apresenta homologia seqüencial com α 1B-glicoproteína humana, uma proteína plasmática de função não conhecida, com seqüência de aminoácidos similar a proteínas da super família de imunoglobulinas (Schwick e Haupt, 1981), mas que apresenta similaridade com a região N-terminal dos fatores de proteção descritos na Figura 10. Certamente mais dados estruturais serão necessários para definir a que família de proteínas pertencem esses fatores protetores.

As metodologias empregadas neste trabalho permitiram o isolamento e a caracterização físico-química de um fator protéico presente no soro do marsupial Didelphis albiventris, que confere a este animal proteção contra os efeitos letais e ação hemorrágica do veneno de Bothrops jararaca.

O soro de D. albiventris e a fração protetora isolada inibem a agregação plaquetária humana induzida por trombina, sugerindo que a defesa natural nessas espécies está relacionada com a prevenção no consumo de plaquetas. A identificação de uma proteína que enfraquece a agregação plaquetária humana induzida por trombina deve constituir uma ferramenta útil para a compreensão dos mecanismos de resposta plaquetária. Os dados aqui apresentados ainda fornecem suporte necessário para estudos de homologia seqüencial, permitindo correlacionar a estrutura com a expressão da atividade biológica, caracterizando assim uma nova ferramenta molecular para os estudos dos mecanismos envolvidos na ação hemorrágica dos venenos ofídicos e da ação terapêutica no tratamento de indivíduos picados por serpentes venenosas.

BIBLIOGRAFIA

- Billah, M.M.; Lapetina, E.C. and Cuatrecasas, P. (1979)-Phosphatidylinositol-specific phospholipase C of platelets: association with 1,2-diacylglycerol kinase and inhibition by cyclic AMP. *Biochem Biophys Res Commun*, 90:92-95
- Bjarnason, J.B. and Tu, A.T. (1978)-Hemorrhagic toxins from western diamondback rattlesnake (Crotalus atrox) venom: isolation and characterization of five toxins and the role of zinc in hemorrhagic toxin. *Biochemistry*, 17:3395-3404.
- Born, G.V.R. and Cross, M.J. (1963)-The aggregation of blood platelets. *J. Physiol (London)*, 168:178-195
- Bonnett, D.E. and Guttaman, S.I. (1971) - Inhibition of moccasin (Aqkistrodon piscivoris) venom proteolytic activity by the serum of the Florida King snake (Lampropeltis getulus florida). *Toxicon*, 9:417-419
- Bringinshaw, G.F. and Shanberge, J.N. (1974a)-Identification of two distinct heparin co-factors in human plasma separation and partial purification. *Arch Biochem Biophys*, 161:683-689
- Bringinshaw, G.F. and Shanberge, J.N. (1974b)-Identification of two distinct heparin co-factors in human plasma: II inhibition of thrombin and activated factor X. *Thromb Res*, 4:463-468
- Bücherl, W. (1963)- In "Die Giftschlangen der Erde" p.67. Eds. Behring Mitt.N.G. and Elwert Marburg
- Busse, R.; Luckhoff, A. and Bassenge, A. (1987)-Endothelium-derived relaxing factor inhibits platelet activation. *Naunyn Schromiedeberg's Arch Pharmacol*, 336:566-571
- Catanese, J.J. and Kress, L.F. (1992) - Isolation from opossum serum of a metalloproteinases inhibitor homologous to human α 1 B-Glycoprotein. *Biochemistry*, 31:410-418
- Clark, C.W. and Voris, K.H. (1969)- Venom neutralization by rattlesnake serum albumin. *Science*, 164:1402-1404

- Chiang, J.M.; Dixit, S.N. and Kang, A.H. (1976)-Effect of cyclic 3,5-guanosine monophosphate on human platelet function. J. Lab. Clin. Med. 88:215-21
- Condino-Neto, A.; Landucci E.C.T.; Farah, M.F.L.; Annichino-Bizzarhi, J.; Perez, A.; Hyshog, S.; Marangoni, S.; Oliveira, B. and Nucci, G. (1992) - The inhibition of Thrombin-Induced human platelet aggregation by proteins present in serum from the opossum Didelphis albiventris. Trombotic and Haemorrhagic Disorders, 6(2):41-46.
- Conti, M.A. and Adelstein, R.S. (1981) - The relationship between calmodulin binding and phosphorylation of smooth muscle myosin kinase by the catalytic subunit of 3',5' cAMP-dependent protein kinase. J. Biol. Chem., 256:3178-3181.
- Domont, G.B.; Perales, J. and Moussatché (1991) - Natural anti-snake venom proteins. Toxicon, 29:1183-1194
- De Witt, C.A. and Weström, B.R. (1987) - Venom resistance in the hedgehog (Erinaceus europaeus) purification and identification of macroglobulin inhibitors as plasma antihemorrhagia factors. Toxicon 25:315-323
- Essex, H. E. (1945) - Certain animal venoms and their physiologic action. Physiol. Rev., 25:148-151
- Edman, P. and Begg, G. (1967) - A protein sequenator. Eur. J. Biochem., 1:80-91
- Fontana, F. (1781) - Traité sur le venin de la Vipère. Florence, p. 23; apud Phisalix, M. (1922)
- Garcia, V.E. and Perez, J.C. (1984) - The purification and characterization of an antihemorrhagic factor in woodrat (Neotoma micropus) serum. Toxicon, 22(1):129-138
- Gardner, A.L. (1973)- The systematics of the genus Didelphis (Marsupialia: Didelphidae) in North and Middle America. Spec. Publ. Mus. Texas Tech. Univ. 4:1-81.
- Hamberg, M.; Svensson, J.; Wakabayashi, T. and Samveisson, B. (1974)-Isolation and structure of two prostaglandin endoperoxide that cause platelet aggregation. Proc Natl Sci USA 71:345-352

- Hamberg, M. Svensson, J. and Samuelsson, B. (1975)-Thromboxanes-a new group of biological active compounds derived from prostaglandin endoperoxides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72:2994-3001
- Huang S. and Perez, J.C. (1980) - Comparative study on hemorrhagic and proteolytic activities of snake venoms. *Toxicon*, 18: 421-426
- Jurgelski, W. (1974)-The opossum (D. virginiana Kerr) as a biomedical model. *Lab Anim. Sci.* 24:375-379.
- Kamiguti, A.S. (1988) - Bothrops venoms. Action on blood coagulation. In: *Anais do XII Simpósio Anual da ACIESP sobre Toxinas Proteicas*, Vol II, 35-42.
- Kaser-Glanzmann, R.; Jakabova, M. and George, J.N. (1977)-Stimulation of calcium uptake in platelet membrane vesicles by adenosine cyclic. 3.5-monophosphate and protein kinase. *Biochim Biophys Acta* 466:429-434
- Krishnamurthi, S.; Patel, Y. and Kakkar, V.V. (1989)-Weak inhibition of protein kinase C coupled with various non-specific effects make sphingosine an unsuitable tool in platelet signal transduction studies. *Biochem Biophys Acta* 1010:158-164
- Keegan, H.L. and Andrews, T.F. (1942) - Effects of crotalid venom on North American snakes. *Copeia*, 4:251-253
- Klauber, L.M. (1972) - Susceptibility, resistance and immunity to rattlesnake venom. In: *Rattlesnakes*, pp. 883-891, (Klauber, L.M., Ed.). Los Angeles: University of California Press.
- Kilmon, J.A. (1976) - High Tolerance to snake venom by the Virginia opossum, Didelphis virginiana. *Toxicon* 14:337-340
- Kondo, M.; Kondo, S.; Ikezawa, I.; Assakura, M.T. (1960)- Studies on the quantitative method for determination of hemorrhagic activity of Habu snake venom. *Japan J. Med. Sci. Biol.*, 13: 43-51

- Kress, L.F. and Catanese, J.J (1985)-Isolation of an inhibitor of snake venom metalloproteinases from opossum serum. Fed. Proc. 44:1431-1438.
- Kurechi, T. and Kress, L.F. (1985)- Purification and partial characterization of the hemorrhagic factor from the venom of Crotalus adamanteus (eastern diamond-back rattlesnake). Toxicon, 23:657-668
- Laurence, T.C. and Killander, J. (1964) - A theory of gel filtration and its experimental verification. J. Chromat., 14: 304-316
- Lowry, O.H.; Rosebrough, N.J.; Farr, L.A. and Randall, R.S. (1951) - Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem., 193:265-275
- Mandelbaum, F.R., Reichl, A.P. and Assakura, M.T. (1976) - Some physical and biochemical characteristics of HF2, one of the hemorrhagic factor of the venom of B. jararaca. In: Animal, Plant and Microbial toxins, Vol 1, pp 111-121 (Osaka, A, Hayashi, K. and Sawai, Y, Eds.) London: Plenum Press.
- Matsudaira, P. (1987)-Sequence from picomole quantities of proteins electroblotted on to polyvinylidene difluoride membranes. J. Biol. Chem. 262:10035-10038.
- Maurice, D.H. and Haslam, R.J. (1990)-Molecular basis of the synergistic inhibition of platelet function by nitrovasodilators and activators of adenylate cyclase inhibition of cyclic AMP breakdown by cyclic GMP. Mol Pharmacol 37:671-681
- Menchaca, J.M. and Perez, J.C. (1981) - The purification and characterization of an antihemorrhagic factor in opossum (Didelphis virginiana) serum. Toxicon 19:623-632
- Mills DCB (1982)-The role of cyclic nucleotides in platelets. In Kebanian JW. Nathanson JA. (eds) Handbook of Experimental Pharmacology. Vol 58 (II). Springer. Berlin Heidelberg New York, p 723
- Mills, D.C. and Smith, J.B. (1971)-The influence on platelet aggregation of drugs that affect the accumulation of adenosine 3,5-cyclic monophosphate in platelets. Biochem J 121:185-196

- Nichol, A.A.; Douglas, V. and Peck, L. (1933) - On the immunity of rattlesnakes to their venom. *Copeia*, 4:211-213
- Omorí-Satoh, T.; Sadahiro, S.; Ohsaka, A. and Murata, R. (1972) - Purification and characterization of an antihemorrhagic factor in the serum of Trimeresurus flavoviridis, a crota-
lid. *Biochim. Biophys. Acta*, 285:414-426
- Ovadia, M., Moav, B. and Kochva, E. (1975) - Factors in the blood serum of Vipera palaestinae neutralizing fractions of its own venom. *Toxicon*, 13:113-116.
- Ovadia, M. and Kochva, E. (1977) - Neutralization of Viperidae and Elapidae snake venoms by sera of different animals. *Toxicon*, 15:541-547
- Ovadia, M.; Kochva, E. and Moav, B. (1977) - The neutralization mechanism of Vipera palaestinae neurotoxin by a purified factor from homologous serum. *Biochim. Biophys. A. Acta*, 491:370-386
- Ovadia, M. (1978 a) - Isolation and characterization of three hemorrhagic factors from the venom of Vipera palaestinae. *Toxicon*, 16:479-487
- Ovadia, M. (1978 b) - Purification and characterization of an antihemorrhagic factor from the serum of the snake Vipera palaestinae. *Toxicon*, 16:661-672
- Ohsaka, A. (1979) - Hemorrhagic, necrotizing and edema-forming effects of snake venoms. *Handbk Exp. Pharmacol.*, 52:480-546
- Owby, C.L.; Colberg, T.R. and Odell, G.V. (1984) - A new method for quantitating hemorrhage induced by rattlesnake venoms: Ability of polyvalent antivenoms. *Toxicon*, 22 (2): 227-233
- Perales, J.; Moussatché, H.; Oliveira, B.; Marangoni, S.; Landucci, E.C.T. and Domont, G.B. (1991) - Anti-snake venom proteins from Didelphidae. X International Congress of animals and plants toxins. Singapore
- Perez, J., Haws, W. and Hatch, C. (1978a) - Resistance of woodrats (Neotoma micropus) to Crotalus atrox venoms. *Toxicon*, 16:198-200.

Perez, J., Haws, W., Garcia, V.E. and Jennings, B.M. (1978b) - Resistance of warm-blooded animals to snake venoms. *Toxicon*, 16: 375-383.

Pickyangkul, S. and Perez, J.G. (1981) - Purification and characterization of a naturally occurring antihemorrhagic factor in the serum of the hispid cotton rat (Sigmodon hispidus). *Toxicon* 19:205-215

Philpot, V.B. and Smith, R.G. (1950) - Neutralization of pit viper venom by king snake serum. *Proc. Soc. Exp. Bio. Med.* 75:521-523

Philpot, Jr., V.B. and Deutsch, H.F. (1956) - Inhibition and activation of venom proteases. *Biochem. Biophys. Acta* 21: 524-530

Phisalix, M. (1922) - *Animaux Venimeux et Venins*, pp. 744-759. Paris: Mason & Cie. Editeurs.

Radomski, M.W. and Moncada, S. (1983) - An improved method for washing human platelets with prostacyclin. *Thromb Res* 30:383-389

Radomski, M.W.; Palmer, R.M.J. and Moncada, S. (1987) - Comparative pharmacology of endothelium-derived relaxing factor nitric oxide and prostacyclin in platelets. *Br J Pharmacol* 92:181-187

Radomski, M.W.; Palmer, R.M.J. and Moncada, S. (1990) - An L-arginine nitric oxide pathway present in human platelets regulates aggregation. *Proc Natl Acad Sci USA* 87:5193-5197

Rothschild, A.M. and Almeida, J.A. (1972) - Role of bradykinin in the fatal shock induced by *Bothrops jararaca* venom in the rat. In De Vries A. Kochva E (eds) *Toxins of animal and plant origin*. Vol 2. Gordon and Breach. London. pp 721-728

Schwick, H.G. and Haupt, H. (1981) - Purified human plasma proteins of unknown function. *Japan. J. Med. Sci. Biol.* 34:299-327.

Seegers, W.H.; Johnson, J.F. and Fell, C. (1954) - An anti-thrombin related to prothrombin activation. *Am J Physiol* 176:97-103

- Smith, J.G. and Wills, A.L. (1971)-Aspirin selective inhibits prostaglandin production in human platelets. *Nature* 231:325-237
- Shapiro, A.L.; Vinuela, E. and Marzel, Jr., J.V. (1967) - Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS polyacrilamide gels. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 28 (5): 815-820
- Straight, R.; Glenn, G.L. and Snyder, C.C. (1976) - Antivenom activity of rattlesnake blood plasma. *Nature* 261:259-260
- Swanson, P.L. (1946) - Effects of snake venoms on snakes. *Copeia* 4:242-249
- Tanizaki, M.M., Kawasaki, H., Suzuki, K. and Mandelbaum, F.R. (1991)- Purification of a proteinase inhibitor from the plasma of Bothrops jararaca(jararaca). *Toxicon*, 29:673-681.
- Tovey, K.C.; Oldham, K.G. and Whilan, J.A.M. (1974)-A simple direct radioimmunoassay for cAMP in plasma and other biological samples using an improved competitive binding technique. *Clin Chem Acta* 56:221-234
- Tomihara, Y.; Yonaha, K.; Nozaki, M.; Yamakawa, M.; Kamura, T. and Toyama, S. (1987) - Purification of the antihemorrhagic factors from the serum of a mongoose (Herpestes edwardsii). *Toxicon*, 25:685-689
- Tomihara, Y.; Yonaha, K.; Nozaki, M.; Yamakawa, M.; Kawamura, Y.; Kamura, T. and Toyama, S. (1988) - Purification of an antihemorrhagic factor from the of the non-venomous snake (Dinodon semicarinatus). *Toxicon*, 26:420-423
- Tomihara, Y., Kawamura, Y., Yonaha, K., Nozaki, M., Yamakawa, M. and Yoshida, C. (1990) - Neutralization of hemorrhagic snake venoms by sera of Trimereserus flavoviridis (Habu), Herpestes edwardsii (mongoose) and Dinodon semicarinatus (Akamata). *Toxicon*, 28:989-991.
- Towbin, H.; Staehelin, T. and Gordon, J. (1979) - Electrophoretic transfer of proteins from polyacrilamida gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76:4350-4354.

- Vellard, J. (1949) - Investigaciones sobre inmunidad natural contra los venenos de serpentes. I Publner Plus. Hist. Nat., Lima Ser A, Zool. 1, 1
- Vellard, J. (1950) - Investigaciones sobre inmunidad natural contra los venenos de serpentes II. Publnes Mus. Hist. Nat., Lima Ser A, Zool. 4, 1
- Weber, K. and Osborn, M. (1969) - The reability of molecular weight determination by dodecyl sulfate - polyacrilamide gel electrophoresis. J. Biol. Chem 244 (16):4406-4412
- Werner, R.M. and Vick, J.A. (1977) - Resistance of the opossum (Didelphis virginiana) to envenoenomation by snakes of the family Crotalidae. Toxicon, 15:29-33
- Weil, C.S. (1952) - Tables for convenient calculation of median-effective doses (LD50 or ED50) and instruction for their use. Biometrics, 8:249-263
- Weissenberg, S., Ovadia, M., Fleminger, G and Kochva, E. (1991) - Antihemorrhagic factors from the blood serum of the western diamondback rattlesnake Crotalus atrox. Toxicon, 29:807-818
- Weinstein, S.A., Lafaye, P.J. and Smith, L.A. (1990) - Observation on a venom neutralizing albumin fraction isolated from the serum of the northern copperhead Agkistrodon contortrix mokasen. Toxicon, 28:629-633.LS2