



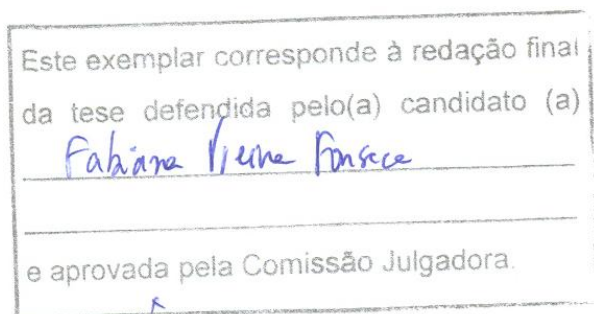
UNICAMP

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA – DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA**



Fabiana Vieira Fonseca

**Isolamento e Caracterização de um novo conjunto de
serinoproteases com atividade trombina-like e de L-aminoácido
oxidase do veneno de *Crotalus durissus cascavella***



Tese apresentada ao Instituto de
Biologia da Universidade Estadual
de Campinas para obtenção do
título de Mestre em Biologia
Funcional e Molecular – Área de
Bioquímica

Orientador: Prof. Dr. Marcos Hikari Toyama

Campinas - SP

2005

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP**

F733i

Fonseca, Fabiana Vieira

Isolamento e caracterização de um novo conjunto de serinoproteases com atividade trombina-like e de L-aminoácido oxidase de veneno de *Crotalus durissus cascavella* / Fabiana Vieira Fonseca. -- Campinas, SP: [s.n.], 2006.

Orientador: Marcos Hikari Toyama.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. *Crotalus cascavella*. 2. Serina proteinases. 3. Veneno. 4. Agregação plaquetária. I. Toyama, Marcos Hikari. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

(rcdt/ib)

Título em inglês: Isolation and characterization of a new serine proteases group with thrombin-like and L-amino acid oxidase activity from *Crotalus durissus cascavella* venom.

Palavras chaves em inglês: *Crotalus cascavella*; Serine proteinases; Venom; Platelet aggregation.

Área de concentração: Bioquímica.

Titulação: Mestre em Biologia Funcional e Molecular.

Banca examinadora: Marcos Hikari Toyama, José Camillo Novello, Luís Otávio Saggion Beriam.

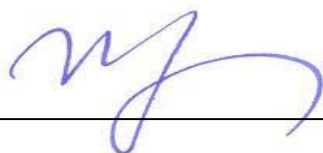
Data da defesa: 21/02/2006.

Campinas, 21 de Fevereiro de 2006.

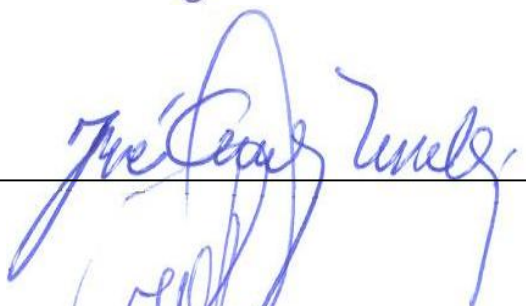
BANCA EXAMINADORA

TITULARES

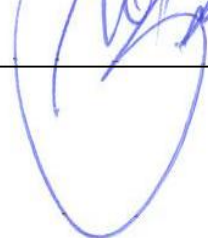
Prof. Dr. Marcos Hikari Toyama
(Orientador)



Prof. Dr. José Camillo Novello

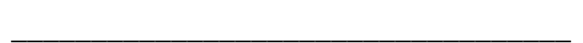


Prof. Dr. Luís Otávio Saggion Beriam



SUPLENTES

Prof. Dr. Tomomasa Yano



Prof. Dr. Ricardo Aparicio



À Deus, aos meus irmãos
e aos meus pais

dedico

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Marcos Hikari Toyama, da UNESP - Campus São Vicente pela amizade, incentivo e orientação imprescindíveis.

Ao Prof. Dr. Edson Antunes do Departamento de Farmacologia, pela acolhida em seu laboratório, pela amizade, pelo apoio e colaboração na realização deste trabalho.

Ao Prof. Sérgio Marangoni pelas sugestões na realização deste trabalho.

Ao Rafael Prada Morganti pela amizade e colaboração nos experimentos de agregação plaquetária.

A Dra. Daniela Oliveira Toyama pela amizade e valiosas sugestões.

À doutoranda Mirela Batista Coelho pela amizade, pelo apoio e valiosas sugestões.

Ao Paulo Baldasso pela competência e apoio técnico.

A todos os amigos do Departamento de Bioquímica, especialmente do LAQUIP, pelo carinho, amizade e pela convivência durante esse período.

Aos docentes, funcionários e pós-graduandos do Departamento de Bioquímica do Instituto de Biologia UNICAMP que direta ou indiretamente, colaboraram para a realização deste trabalho.

A CAPES, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, pelo imprescindível apoio financeiro.

ÍNDICE

Índice de Figuras	viii
Abreviações	x
Abreviações para aminoácidos	xii
Resumo	xiii
Abstract	xv
1. INTRODUÇÃO	01
1.1 O veneno crotálico	01
1.1.1. Crotoxina	03
1.1.2. Giroxina	08
1.1.3. Crotaminas	12
1.1.4. Convulxina	14
1.2. Venenos de serpentes e Homeostase sangüínea	15
1.3. Fatores Protéicos do Veneno de Serpentes e Agregação Plaquetária	18
1.3.1. Lectinas	20
1.3.2. Metaloproteases-Desintegrinas	23
1.3.3. Serinoproteases	24
1.3.4. Fosfolipase A ₂	26
2. OBJETIVO	28
3. MATERIAIS E MÉTODOS	29
3.1. Venenos e reagentes	29
3.2. Purificação do veneno de <i>Crotalus durissus cascavella</i>	29
3.2.1. Purificação de Proteínas	29
A. Purificação de Crotoxina e de suas subunidades	29
B. Purificação de LAO (L-aminoácido oxidase)	31
3.2.2. Ensaio enzimáticos	34
A. Atividade PLA ₂	34
B. Atividade amidolítica “Trombina-like”	35
C. Atividade LAO	36
3.2.3. Eletroforese em PAGE-SDS	37
3.2.4. Eletroforese em 2D	38
3.2.5. Análise por Espectrometria de Massas por Maldi-Tof (MS)	39
3.2.6. Análise de aminoácidos	40
3.2.7. Determinação da sequência N-terminal	40
3.2.8. Atividade Fibrinogenolítica	41
3.2.9. Atividade de agregação plaquetária	42
A. Preparo da solução de plaquetas	42
B. Medida da Agregação plaquetária	43
3.3.0. Atividade coagulante no plasma	44
4. RESULTADOS	45
4.1. Caracterização da uma protease “Trombina-like” presente no veneno total de <i>Crotalus</i>	45

<i>durissus cascavella</i>	
4.1.1. Isolamento de proteínas “ Trombina-like”	45
4.1.2. Cinética enzimática da protease “Trombina-like”	49
4.1.3. Atividade Fibrinogenolítica de protease “Trombina-like”	50
4.1.4. Atividade amidolítica da serinoprotease “Trombina-like”	51
4.1.5. Análise de aminoácidos da protease “Trombina-like”	52
4.1.6. Determinação da seqüência N-terminal da protease “Trombina-like”	53
4.1.7. Agregação plaquetária induzida pela serinoprotease “Trombina-like”	54
4.2. Caracterização de uma L-aminoácido oxidase (LAO) presente no veneno total de	57
<i>Crotalus durissus cascavella</i>	
4.2.1. Isolamento de LAO	57
4.2.2. Cinética enzimática de Casca LAO	59
4.2.3. Determinação da seqüência N-terminal de Casca LAO	60
4.2.4. Agregação plaquetária induzida Casca LAO	61
5. DISCUSSÃO	63
6. CONCLUSÕES	70
7. APÊNDICES	71
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	72

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Percentual de acidentes ofídicos de acordo com os diferentes gêneros (Bothrops, Crotalus, Micrurus, e Lachesis) nos anos de 1986, 1996 e 2003; segundo o Ministério da Saúde.	02
Figura 2. Degradação do fibrinogênio	09
Figura 3. Estrutura da LAO de <i>Calloselasma rhodostoma</i> e os produtos originados pela reação da LAO com o L-amino ácido, em verde têm peróxido de hidrogênio, amônia e o α -cetoácido	10
Figura 4. Mecanismo da coagulação sangüínea	16
Figura 5. Esquema estrutural das Lectina tipo C	22
Figura 6. Domínios estruturais das metaloproteases-desintegrina	24
Figura 7: Esquema de Purificação	33
Figura 8. Perfil cromatográfico da purificação do veneno de <i>Crotalus durissus cascavella</i> . (A). As frações: convulsina, giroxina, crotoxina e crotamina. (B). Atividade PLA ₂ , atividade L-aminoácido oxidase e atividade coagulante das frações. (C). Atividade PLA ₂ e serinoprotease.	47
Figura 9. (A) Perfil cromatográfico da fração F20 obtida por cromatografia em HPLC. (B) F202 foi então repurificada em HPLC. (C) Eletroforese SDS-PAGE da fração F202	48
Figura 10. Gráfico duplo-recíproco de Lineweaver-Burk	49
Figura 11: SDS-PAGE do fibrinogênio reduzido após a incubação com a fração F202 purificada da fração “Trombina-like” do veneno total de <i>C. d. cascavella</i>	50
Figura 12: Efeito dos inibidores de serinoprotease PMSF (5 mM), TLCK (0,5 mM), TPCK (0,5 mM) e SBTi (10 µg) sob a fração F202 purificada da fração “trombina-like” de <i>C. d. cascavella</i>	51
Figura 13: Análise de aminoácidos da fração F202 purificada da fração “Trombina-like” do veneno total de <i>C. d. cascavella</i>	52
Figura 14: Comparação da seqüência N-terminal da fração F202 com outras serinoproteases “trombina-like”	53

Figura 15: Efeito da crotoxina total e suas subunidades, PLA₂ e crotapotina, na agregação plaquetária usando doses de 20 µg. 54

Figura 16: Curva de dose-resposta da fração F202 purificada da fração “Trombina-like” do veneno total de *C. d. cascavella* na agregação plaquetária usando sistema de plasma rico em plaquetas (PRP) 55

Figura 17: Indução da agregação plaquetária pela fração F202 purificada da fração “Trombina-like” presente no veneno total de *C. d. cascavella*, utilizando tanto PRP (A) como PL (B) 56

Figura 18: (A) Perfil cromatográfico de Deae Protein Pack da fração Casca LAO encontrada na fração giroxina do veneno total de *C. d. cascavella*. (B) Recromatografia em coluna de fase reversa (HPLC) de Casca LAO 58

Figura 19: (A) Determinação do Km e V_{máx} de Casca LAO; (B e C) efeito do pH na atividade enzimática 59

Figura 20: Sequência N-terminal de Casca LAO purificada do veneno total de *Cascavella durissus cascavella* 60

Figura 21: (A) Efeito de Casca LAO na preparação de PRP a diferentes concentrações (10, 5, 1 e 0,5 µg/ml). (B) Efeito da catalase (catalase 0,1 mg/ml), indometacina (Indo, 1 x 10⁻⁵M) e aspirina (Aspirina, 1 x 10⁻⁵ M) e o controle de Casca LAO (10 µg/ml) 62

ABREVIACES

μ (micro) Fator de multiplicaco 10^{-06} m

μ – Bondapak C 18 Coluna de HPLC com n-octadecyl como base da fase estacionária

AA – cido araquidônico

ADAM 17- fator de necrose tumoral

ADP – adenosina difosfato

BApNA- substrato para Tripsina

CAM- molécula de adeso molecular

cDNA- marcador de DNA

CHAPS- detergente no inico

DTT – ditionitrito

DEAE – cromatografia de troca iônica

EDTA – cido etilenodiaminotetracido

FAD - flavina adenina dinucleotídeo

FMN – flavina mononucleotídeo

FVa- Fator V a

GP1b - glicoproteína 1b

GP Ia/IIa – glicoproteína Ia/Integrina Ia

GPIIb/IIIa – glicoproteína IIb/IIIa

GPIb-IX-V – glicoproteína Ib – IX - V
HPLC – cromatografia líquida de alta eficiência
kDa – kilodalton
KGD – domínio com sequência aminoácidos lisina – glicina – ácido aspártico
LAO EC1.4.3.2 – L –aminoácido oxidase
nm – (nanômetro). Fator de multiplicação 10^{-09}
OPD – o-fenilenediamina
PAGE – eletroforese em gel de poliacrilamida
PL – Plaqueta Lavada
PLA₂ - fosfolipase A ₂
pI – ponto isoelétrico
PPP – plasma pobre em plaquetas
PRP – plasma rico em plaquetas
PMSF – fenilmetilsulfonilfluorido
RNA – Ácido Ribonucléico
RVV-V – ativador de fator V do veneno de víbora de Russeul
RGD – domínio com sequência de aminoácidos arginina – glicina – ácido aspártico
SDS – dodecil sulfato de sódio
Superdex G-75 – Gel de filtração composto por matriz de dextrano e agarose
SBTi - inibidor de tripsina de soja
TFA – ácido trifluoroacético
TRIS – hidroximetil aminometano
TLCK – 1cloro 3 tosilamido 7-amino-2 heptanona
TPCK –1cloro 3 tosilamido 4- fenil –2 butanona
v/v – volume por volume
V máx – velocidade máxima

ABREVIACOES PARA AMINOACIDOS

AMINOACIDOS	ABREVIACOES (3 LETRAS)	SÍMBOLO
Alanina	Ala	A
Arginina	Arg	R
Asparagina	Asn	N
cido aspártico	Asp	D
Cisteína	Cys	C
Glutamina	Gln	Q
cido glutâmico	Glu	E
Glicina	Gly	G
Histidina	Hys	H
Isoleucina	Iso	I
Leucina	Leu	L
Lisina	Lys	K
Metionina	Met	M
Fenilalanina	Phe	F
Prolina	Pro	P
Serina	Ser	S
Treonina	Thr	T
Triptofano	Trp	W
Tirosina	Tyr	Y
Valina	Val	V

Nomenclatura IUPAC

RESUMO

O uso de toxinas isoladas de venenos como ferramentas moleculares na compreensão de diversos eventos fisiológicos e patológicos tem sido comprovadas por vários trabalhos na literatura. A serpente *Crotalus durissus cascavella* é encontrada nas áreas de caatinga do nordeste do Brasil, desde o Maranhão até norte do estado de Minas Gerais, e apesar de pouco estudada sua picada constitui um importante problema da saúde pública (Martins et al, 1998).

A agregação platequetária é bem caracterizada para a convulxina isolada do veneno de *Crotalus durissus cascavella* e *Crotalus durissus terrificus*. O objetivo principal do projeto foi avaliar a atividade de agregação plaquetária induzida por outras frações biológicas e farmacologicamente importantes do veneno total de *Cotalus durissus cascavella*, que neste projeto foram a crotoxina e giroxina.

Através de uma combinação de varias metodologias em HPLC como exclusão molecular, troca iônica e de fase reversa conseguimos isolar os principais constituintes da crotoxina (PLA₂, crotapotina e as proteínas “trombina-like”) e a L-aminoácido oxidase a partir da giroxina. Durante o fracionamento do veneno total em coluna de HPLC de exclusão molecular foram detectados dois picos de atividade serino protease, um na fração giroxínica e outro na fração crotoxínica, sendo que na fração crotoxínica encontrou-se uma nova protease até então não caracterizada e na fração giroxínica foram monitoradas a atividade L-aminácido oxidase. Através da cromatografia em HPLC de troca iônica em DEAE 5PW obteve-se a fração L-aminoácido oxidase cujo grau de homogeneidade molecular foi confirmado por HPLC de fase reversa. Da fração crotoxínica foram obtidos três grupos principais de proteínas (PLA₂, crotapotinas e proteases) e da fração proteolítica foram isoladas três isoformas principais

denominadas de F201, F202 e F203, sendo a fração F202, a fração majoritária. F202 foi obtida com maior homogeneidade molecular com massa molecular de 28kDa e mostrou uma alta quantidade de ácido aspártico, ácido glutâmico e outros aminoácidos importantes como histidina, cisteína e lisina. Esta proteína mostrou alta especificidade para BApNA e mostrou um comportamento Michaelis-Menten com $V_{\text{máx}}$ estimado em 5,64 $\mu\text{M}/\text{min}$ e um K_m de 0,58mM para este substrato. Neste trabalho foi investigada a habilidade desta proteína em degradar fibrinogênio e observou-se que F202 clivou ambas as cadeias α e β . A atividade enzimática assim como a agregação plaquetária foi inibida fortemente com a incubação com TLCK, um inibidor específico para serinoproteases. O N-terminal da sequência de aminoácidos de F202 mostrou alta homologia com outras proteínas “trombina-like”, mas foi significantemente diferente da “trombina-like” isolada da fração giroxina.

Crotalus durissus cascavella apresenta uma fração menos estudada denominada giroxina que tem sido descrita como uma proteína “trombina-like” como relatado por Raw et al. (1986) e Alexander et al. (1988). Neste trabalho foi demonstrado que a giroxina é uma fração heterogênea composta de uma “trombina-like” e proteína LAO, a qual parece estar envolvida em várias atividades.

ABSTRACT

The use of the isolated toxins from poisons as molecular tools in the understanding of diverse physiological and pathological events has been proved by some works in literature. The serpent *Crotalus durissus cascavella* is found in the areas of Caatinga Northeast of Brazil, since Maranhão until North of the state of Minas Gerais, and in spite of it hasn't been studied a lot, its bite constitutes an important problem to the public health (Martins et al, 1998).

The platelet aggregation is well characterized to the isolated convulxin of the poison of *Crotalus durissus cascavella* and *Crotalus durissus terrificus*. The main objective of the project was to evaluate the activity of platelet aggregation induced by gyroxin and crotoxin that are biological and pharmacological important fractions of the total poison of *Cotalus durissus cascavella*.

Through a combination of various methodologies in HPLC -as molecular exclusion, ionic exchange and the reverse phase- we managed to isolate the main constituent of the crotoxin (PLA₂, crotapotin and the thrombin-like proteins) and the L-amino acid oxidase from the gyroxin. During the fragmentation of the total poison in column of HPLC of molecular exclusion two peaks of serine protease were found: one in the gyroxin fraction and another one in the crotoxin fraction. In the crotoxin fraction a new protease in not characterized yet and in the gyroxin fraction was found the L-amino acid activity oxidase. Through the chromatography in HPLC of ionic exchange in DEAE 5PW that allowed to the

attainment of the fraction L-amino acid oxidase whose degree of molecular homogeneity was confirmed by HPLC of reverse phase. From the crotoxin fraction three main groups of proteins (PLA₂, crotopotin and proteases) were isolated, and from the named proteolytic fraction three isoforms of F201, F202 and F203, noticing that the F202 fraction is the major one. The fraction F202 showed a high quantity of aspartic acid, glutamic acid and others amino acids very important as histidine, cysteine and lysine and so more molecular homogeneity could be obtained and with molecular mass of 28kDa. This protein whose behavior Michaelis-Menten with V_{máx} measured in 5,64 µM/min and one Km de 0,58 mM to this substratum showed high specificity to BapNA. In this work was investigated the ability of this protein in degrading the fibrinogen and was observed that the F202 made the cleavage into both chains α and β . The enzymatic activity as well as the platelet aggregation were strongly inhibited with the incubation with TLCK, a specific inhibitor to serine protease. The N-terminal of the amino acid sequence of F202 showed the high homology with other proteins thrombin-like, but it was significantly different from thrombin-like isolated from the gyroxin fraction.

Crotalus durissus cascavella presents a fraction less studied named gyroxin that has been described as a protein thrombin-like as related by Raw et al. (1986) and Alexander et al. (1988). In this work was demonstrated that the gyroxin is a composed heterogeneous fraction of one thrombin-like and protein LAO, and this seems to be involved in some activities

1. INTRODUÇÃO

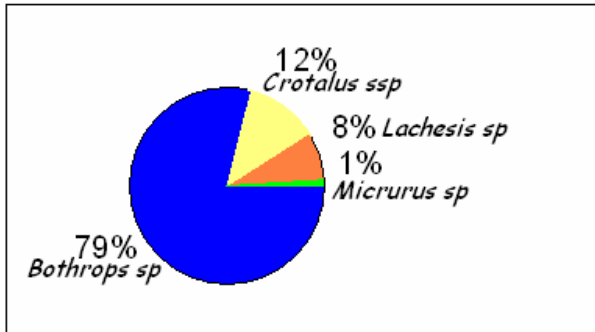
1.1 O veneno crotálico

Define-se veneno total como uma mistura complexa de proteínas, peptídeos, carboidratos, lipídios e íons metálicos, com proteínas e peptídeos representando aproximadamente 90% do veneno seco (Bieber, 1979). A função primária do veneno total é imobilizar e matar as presas (Karlsson, 1979). No Brasil existem várias espécies de serpentes peçonhentas, onde podemos destacar quatro gêneros principais de serpente: gênero *Bothrops*, *Crotalus*, *Lachesis* e *Micrurus*. Dentre estes gêneros destacam-se o gênero *Bothrops* e *Crotalus*, que são considerados os mais importantes do ponto de vista epidemiológico (Figura 1). O veneno botrópico é clinicamente caracterizado como um veneno de natureza proteolítica, coagulante e hemorrágica (Boletim Epidemiológico, Funasa, 1998), já o veneno do gênero *Crotalus* é caracterizado como um veneno neurotóxico.

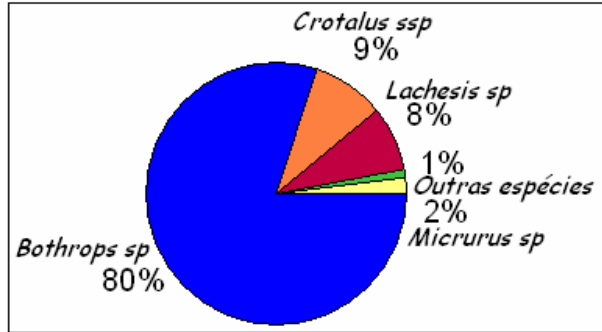
No Brasil a espécie predominante de serpente do gênero *Crotalus* é a *Crotalus durissus*, que é composta por várias subespécies encontradas em todo território nacional, onde podemos destacar a *Crotalus durissus terrificus* (cascavel), *Crotalus durissus cascavella* (maracambóia), *Crotalus durissus collilineatus* (cascavel), *Crotalus durissus marajoensis* (cascavel original da Ilha de Marajó) e *Crotalus durissus cumanensis*. Apesar do grande número de subespécies de *Crotalus durissus* a mais bem estudada é a *Crotalus durissus terrificus*. As principais frações já caracterizadas para o veneno total de *Crotalus*

durisussus terrificus foram: convulxina, giroxina, crotoxina e crotamina. Dentro destas a fração mais importante é a crotoxina, que representa aproximadamente 47% a 55% de todo o veneno em massa seca. (Martins et al., 2002; Toyama et al., 2003)

Ministério da Saúde: 1986



Ministério da Saúde: 2003



Ministério da Saúde: 1996

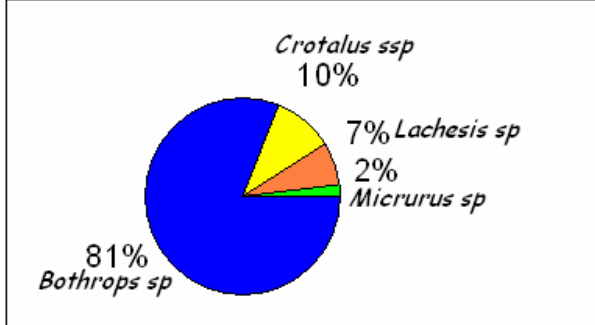


Figura 1: Percentual de acidentes ofídicos de acordo com os diferentes gêneros (*Bothrops*, *Crotalus*, *Micruruss* e *Lachesis*) nos anos de 1986, 1996 e 2003, segundo o Ministério da Saúde.

1.1.1 Crotoxina

A crotoxina foi primeiramente isolada, com o uso de técnicas de precipitação em sulfato de amônio, em 1938 por Slotta e Frankel-Conrat. Ela tem sido descrita como uma proteína heterodimérica, constituída de duas cadeias polipeptídicas: uma PLA₂, (subunidade básica), componente fracamente neurotóxico, quando usado de forma isolada em preparações de junção neuromuscular de ratos ou camundongos, com massa molecular ao redor de 14-15 kDa, com um ponto isoeletrico de 7,8-8,6. E a crotapotina (subunidade ácida), um polipeptídeo constituído por três cadeias denominadas de cadeias A, B e C, unidas tanto por pontes dissulfeto intracadeia como intercadeia, com massas moleculares ao redor de 4,0, 3,5 e 1,5 kDa, respectivamente (Toyama et al., 2003; Oliveira et al., 2003), que não mostra nenhuma atividade neurotóxica, com uma massa molecular ao redor de 9kDa.

Experimentos conduzidos por Hendon e Frankel-Conrat, 1971 e Hawgood e Santana, 1979, mostraram que, quando as duas frações são colocadas juntas em uma proporção equimolar, observam-se dois resultados: diminuição da atividade enzimática PLA₂ do componente básico e aumento da atividade farmacológica.

Experimentos realizados por Rübsamen et al. (1971) e por Breithaupt (1976), foram os primeiros a mostrar este efeito sinergista. A função da crotapotina parece ser a de impedir a ligação de fosfolipase A₂ em várias estruturas, orientado-a principalmente para as membranas pré e pós-sinápticas da junção neuromuscular (Bon et al., 1979 e Vital

Brazil, 1982). Nakazone (1978) mostrou que a proporção de crotapotina para fosfolipase A_2 é de 1:1 em relação molar: uma molécula de PLA_2 para uma de crotapotina.

A crotoxina é a principal fração do veneno de *Crotalus durissus terrificus* e bloqueia a transmissão de impulsos nervosos na junção neuromuscular (Vital-Brazil, 1966) da qual decorrem as paralisias motoras apresentadas pelos pacientes. A junção neuromuscular é uma região especializada da fibra muscular, onde o impulso nervoso, ao atingir a terminação nervosa pré-sináptica, determina a sua despolarização e liberação do neurotransmissor acetilcolina. A acetilcolina liberada combina-se com os receptores nicotínicos pós-sinápticos. Esta ligação está relacionada ao potencial da placa terminal, que induz a contração muscular, ao atingir o limiar de excitabilidade, desencadeia o potencial de ação muscular que se propaga ao longo dos túbulos “T”. Para explicar a inibição da contração muscular pela crotoxina tem sido proposto um mecanismo de ação molecular envolvendo atividade pré-sináptica (Vital Brazil, 1966) e pós-sináptica (Bon et al., 1979). Na ação pré-sináptica, a crotoxina genericamente inibe a liberação do neurotransmissor acetilcolina (Vital Brazil & Excell, 1971; Chang & Lee, 1977). Na ação pós-sináptica atua bloqueando a resposta a acetilcolina através da estabilização do receptor de acetilcolina a um estado inativo (Bon et al., 1979). Existem atualmente dois modelos para explicar a interação da crotoxina com membranas pré-sinápticas: o modelo da dissociação e o do complexo ternário transiente. No primeiro modelo, quando a crotoxina se aproxima do seu receptor na membrana celular, a crotapotina se dissocia da PLA_2 e esta última se liga então ao receptor. No segundo modelo, a crotoxina

primeiramente se liga ao seu receptor de membrana e só então ocorre à dissociação de seus componentes com liberação da crotapotina, enquanto a PLA₂ permanece ligada ao receptor (Delot & Bon, 1993). O termo “molécula chaperone” ou simplesmente “chaperon” foi primeiramente empregado por Faure & Bon. (1988). Para eles a crotapotina teria a função de prevenir a ligação não específica da PLA₂ com outros receptores biologicamente importantes e que não estão envolvidas em suas atividades fisiológicas bem como farmacológicas (Bon et al., 1979).

A crotoxina isolada por Slotta & Fraenkel-Conrat (1938), apesar de mostrar-se homogênea e constituída por uma mistura de PLA₂ e crotopatina é, na realidade, composta por uma mistura de várias isoformas, as quais estão presentes em diferentes lotes de venenos coletados de várias serpentes. A presença destas isoformas de crotoxina resulta das diferentes combinações de suas subunidades. Estudos eletroforéticos e cromatográficos demonstraram a existência de muitas isoformas de crotoxina. A presença de várias isoformas no veneno de uma única espécie indica a existência de vários genes codificantes para essas fosfolipases neurotóxicas. Essas isoformas parecem ser resultantes ou de modificações pós-traducionais, que ocorrem sobre uma única forma de RNA mensageiro, ou na expressão de diferentes RNAs mensageiros (Faure & Bon, 1988; Faure et al., 1994).

Recentemente com uso de técnicas de purificação mais eficientes, Oliveira et al. (2003) e Toyama et al. (2003) mostraram que as crotoxinas de *Crotalus durissus terrificus* são constituídas por uma mistura de duas ou mais isoformas de crotapotinas e três a

quatro isoformas de PLA₂, que foram identificadas por técnicas enzimáticas e de sequenciamento de proteínas. Análises mais acuradas destes resultados mostraram que, além das crotapotinas e PLA₂, a crotoxina é constituída por uma mistura heterogênea de frações, que devido a sua baixa concentração na fração crotoxínica, ainda não foram caracterizadas. Toyama et al. (2003) também mostraram que a PLA₂ isolada da crotapotina é capaz experimentalmente de induzir uma atividade neurotóxica em preparações isoladas de junção neuromuscular de biventer cervis de pintainho. Desta forma, a PLA₂ de fato é o componente responsável pela atividade neurotóxica da crotoxina, mas a crotapotina não teria neste caso nenhuma atividade, uma vez que, tanto na presença como na ausência da crotapotina a resposta neurotóxica é a mesma (Toyama et al., 2003).

Landucci et al. (1995) mostraram que, em condições experimentais, de aplicação *in vivo* através da injeção intraperitoneal ou por via oral, a crotopatina também possui atividade antiinflamatória. Embora esta não aconteça devido à liberação de corticosteróides endógenos ou inibição da atividade de ciclo-oxigenase. Acredita-se que a crotapotina poderia interagir com PLA₂ extracelulares gerados durante o processo inflamatório, levando a uma redução da atividade hidrolítica destes últimos. Além de ter um efeito neurotóxico, a crotoxina é também miotóxica e afeta diretamente as células do músculo esquelético (Gopalakrishnakone et al., 1981). Evidências clínicas claramente indicam que o envenenamento por *Crotalus durissus terrificus* é caracterizado por uma miotoxicidade sistêmica, demonstrada pela presença de mioglobínúria, mioglobulinemia e

por um drástico aumento no nível sérico de creatina quinase, lactato desidrogenase e aspartato aminotransferase (Azevedo-Marques et al., 1982). Os sinais clínicos evidentes da ação miotóxica são dores musculares generalizadas (mialgias), urina que apresenta uma cor avermelhada ou de tonalidade mais escura (mioglobínúria) - manifestação clínica mais evidente da necrose de musculatura esquelética (rabdomiólise) -. Desde que a crotoxina representa uma grande porcentagem deste veneno, é provável que essa miotoxicidade se dê pela ação da crotoxina nas células musculares. A PLA₂ induz danos nos músculos de ratos, enquanto a crotapotina é destituída de efeito miotóxico (Kouyoumdjian et al., 1986), mas ela potencializa a atividade miotóxica da PLA₂. A patogênese do dano causado ao músculo esquelético depois da injeção intramuscular de crotoxina foi estudada por Gopalakrishnakone et al. (1981), que constataram que, quatro horas depois da administração da toxina, há evidências histológicas e ultraestruturais de mionecroses; entre 24 e 48 horas, há um proeminente infiltrado inflamatório composto principalmente de macrófagos localizados dentro do espaço demarcado pela lâmina das células musculares necrosadas.

A crotoxina (15 a 50 µg/ml) produz ainda uma agregação de plaquetas humanas lavadas de modo dose-dependente e irreversível, e induz a liberação de tromboxano B₂. Embora a agregação plaquetária *in vivo* possa causar falha renal e mionecrose devido à isquemia (Laducci et al., 1994), Cardoso & Mota (1997). Estudando o efeito da crotoxina no sistema imune, verificaram que o veneno da *Crotalus durissus terrificus* bem como seu componente crotoxina tem um efeito inibitório na resposta humoral, mas não na resposta

celular imune. Pouco se sabe sobre o efeito do veneno de serpentes no sistema imune. Estudos estão sendo feitos para verificar como o veneno total ou seu principal componente poderiam modular a supressão da resposta imune.

Apesar de bem caracterizada, a crotoxina apresenta-se como uma fração de natureza polifuncional, constituída por várias frações biologicamente ativas, constituídas por várias isoformas.

1.1.2. Giroxina.

A giroxina inicialmente isolada do veneno total de *Crotalus durissus terrificus* foi caracterizada como uma fração farmacologicamente ativa capaz de induzir, em condições experimentais, giros aleatórios nos animais inoculados ao longo do seu eixo longitudinal, acompanhado de um pequeno quadro de convulsões. O isolamento e caracterização mais acurados desta fração permitiram o isolamento da enzima serinoprotease de natureza glicolípida com uma massa molecular de 46-50kDa. As proteases presentes no veneno total podem causar efeitos danosos, como hemorragia. Venenos de serpentes das famílias Crotalidae e Viperidae contêm um ou mais fatores hemorrágicos chamados hemorraginas. Estas moléculas são caracterizadas como metaloproteases que contêm zinco e apresentam um domínio de protease e, em algumas delas, domínios adicionais. Essas proteases agem degradando proteínas que compõem a membrana basal subjacente das células endoteliais dos capilares. (Hati et al. 1999).

Os venenos de serpentes das famílias Crotalidae e Viperidae, além das hemorraginas, contêm muitas outras proteases, como aquelas que atuam na cascata de coagulação sangüínea (Kornalik, 1990). No Brasil, os estudos a respeito destas proteases com ação na coagulação sangüínea têm sido realizados principalmente com as serpentes peçonhentas do gênero *Bothrops* e *Crotalus*.

Várias enzimas isoladas de venenos de serpentes possuem atividade tipo trombina; que clivam as moléculas de fibrinogênio encontradas no plasma, transformando-as diretamente em fibrina (Smolka et al., 1998). O agente principal do sistema fibrinolítico é a plasmina, a qual possui capacidade de degradação da rede de fibrina. (Figura 2).

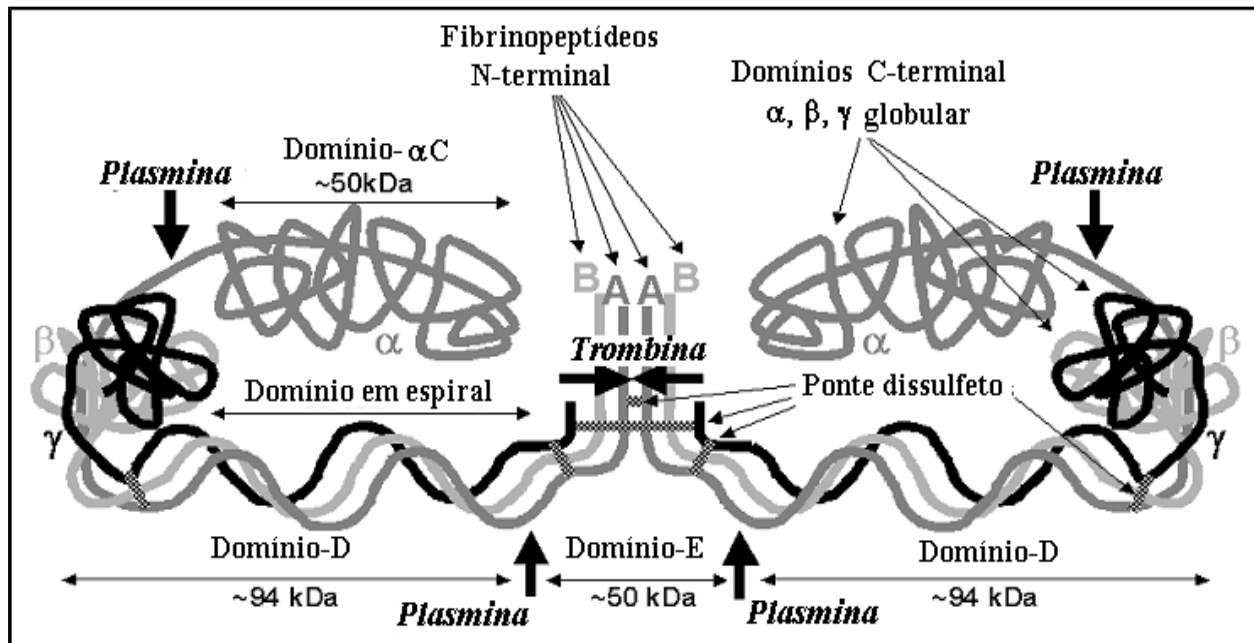


Figura 2. Degradação do fibrinogênio.

Junto a fração protease presente na Giroxina, existe L-aminoácido oxidase também eluída.

As L-aminoácido oxidase LAO (EC1.4.3.2) são flavoenzimas que catalisam a deaminação oxidativa de um L-aminoácido a um α -cetoácido com a co-produção de amônia e peróxido de hidrogênio (Figura 3).

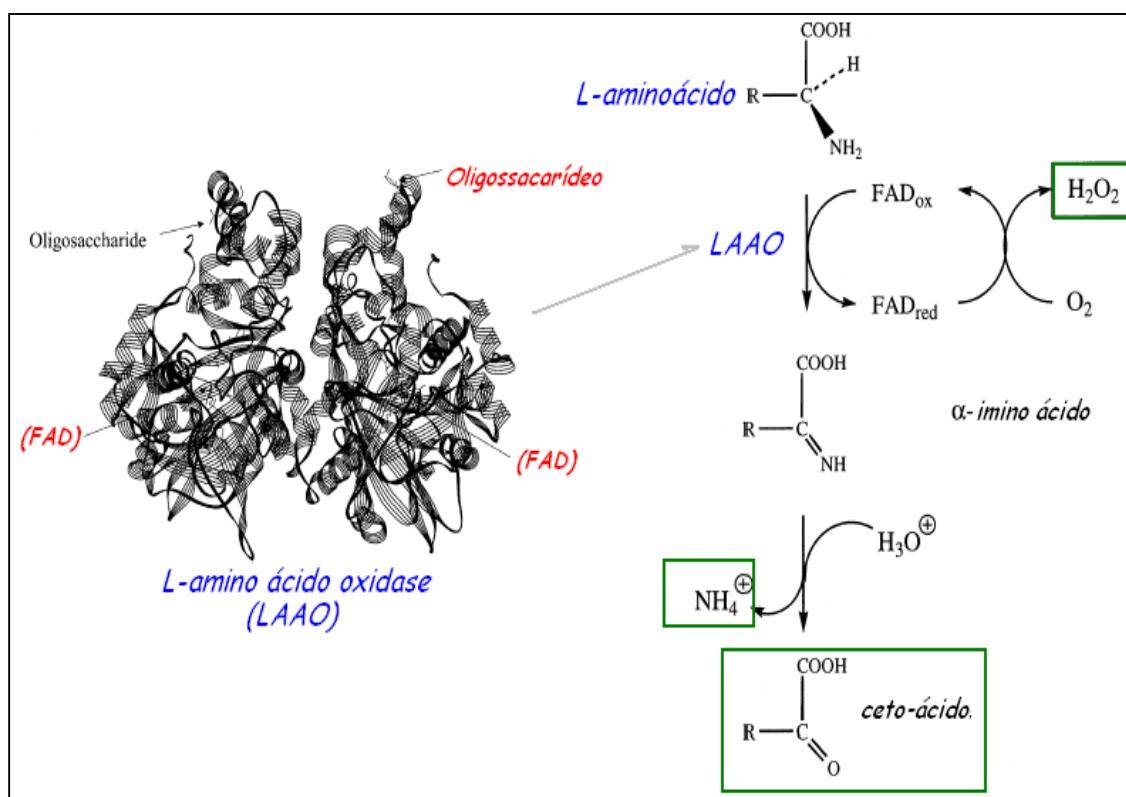


Figura 3. Estrutura da LAO de *Calloselasma rhodostoma* e os produtos originados pela reação da LAO com o L-amino ácido.

Estas enzimas estão presentes em quantidade significativa dentro do veneno total de algumas serpentes e são consideradas por vários pesquisadores como importantes fatores tóxicos do veneno (Pawelek et al., 2000). Elas mostram várias atividades farmacológicas e fisiológicas até o momento pouco conhecidas ou estudadas, sendo que uma delas é a agregação plaquetária. Mais recentemente estas enzimas mostraram potente atividade bactericida e apoptótica (Suhr e Kin, 1996 e Ali et al., 2000). Dados obtidos experimentalmente indicam que estas toxinas também são capazes de estimular e potencializar a secreção de insulina em células β isoladas de rato.

As LAOs são enzimas relativamente fáceis de serem isoladas de venenos de serpentes, mais fáceis que seus similares encontrados em bactérias. Vários estudos demonstram que estas enzimas são relativamente estáveis, e podem sofrer “renaturação” por um tratamento térmico a pH 5,0 ou pela diminuição dos valores de pH próximo a 4,5, apesar de serem inativadas reversivelmente pela liofilização ou pelo uso de tampões em pH próximo da neutralidade. Desta forma, estas propriedades vêm tornando estas enzimas alvos de vários estudos, não somente enzimáticos, mas estruturais, fisiológicos e farmacológicos (Du e Clemetson, 2002). As L-aminoácido oxidases de serpentes são usualmente homodímeros - proteínas com grupos prostéticos FMN- ou FAD- ($\sim 2\text{mol/mol}$ de proteína) e glicerol ($\sim 3,8$ a 4%) - com um pI ácido ou básico, com valores ao redor de (4,4 a 8,8). A LAO possui uma massa molecular ao redor de 120 a 150 kDa na forma não reduzida e uma massa molecular de 55 a 66 kDa em presença de agentes redutores (Ali et al., 2000). Do ponto de vista enzimático, estas enzimas possuem alta especificidade para

alguns tipos de aminoácidos (substratos) como isoleucinas, fenilalanina, metionina, leucina e valina. Na presença destes aminoácidos, as LAOs os convertem em α -cetoácidos e H_2O_2 . As LAOs de cada gênero de serpentes mostram grandes similaridades estruturais, mas ao compararmos LAOs de diferentes gêneros, observamos significativas diferenças na sequência de aminoácidos. Mesmo com estas diferenças estas enzimas mostram grande homologia sequencial na região de ligação com FAD- (Ali et al., 2000). Recentemente descobriu-se que a adição de glicerol pode promover alterações estruturais da enzima tornando-a mais eficiente do ponto de vista catalítico.

A purificação de vários tipos de LAOs tem sido descrita por vários grupos. Apesar de possuírem características enzimáticas e estruturais semelhantes, estas proteínas demonstram graus diferenciados de estabilidade, especificidade, atividade biológica e tóxica. Mesmo sendo intensamente estudados, os efeitos biológicos destas proteínas ainda permanecem pouco explorados, quando se tenta correlacionar a estrutura a efeitos biológicos, tais como: a apoptose, citotoxicidade, agregação ou inibição plaquetária, hemorragia, hemólise, edema e mais recentemente, atividade antibacteriana e antiparasitária. (Sakurai et al., 2001 e Tempore et al., 2001).

1.1.3. Crotaminas

A crotamina é uma das quatro principais frações tóxicas encontradas no veneno total de *Crotalus durissus terrificus*. Estas toxinas pertencem a um grupo estruturalmente relacionado de polipeptídeos pequenos, não enzimáticos, de caráter básico, que causam

mionecrose durante o envenenamento por cascavéis (Bierber e Nedelkov, 1997). A crotamina mostra um alto grau de similaridade estrutural com outras miotoxinas isoladas de outras espécies de *Crotalus*, tais como a miotoxina isolada de *Crotalus viridis viridis* (Fox et al., 1979), miotoxina I e II isolada de *Crotalus viridis concolor* (Bieber et al., 1987), peptídeo C de *Crotalus viridis helleri* (Maeda et al., 1978), toxina CAM de *Crotalus adamanteus* (Samejima et al., 1987). Isoformas de miotoxinas têm sido observadas para venenos de serpentes crotálicas adultas. E estudos mostram que esta variação é influenciada diretamente por fatores geográficos e ambientais, independentemente das variações morfológicas (Schenberg, 1959). Desta forma, o veneno de *Crotalus durissus terrificus* pode ser classificado como crotamina positiva e crotamina negativa, dependendo da região de captura (Schenberg, 1959). A crotamina pode atuar nos canais de sódio tetrodoxina sensíveis, causando redução do potencial de repouso da membrana e aumentando a sua condutância (Brazil & Fontana, 1993). Também induz um aumento dos níveis de cálcio citoplasmático pela interação com calsequestrina (Furukawa et al., 1994), resultando em um aumento do volume do retículo sarcoplasmático e necrose do músculo esquelético. A calsequestrina é uma proteína de alto peso molecular que atua como transportador de cálcio localizado no retículo sarcoplasmático de células cardíacas e musculares, possui uma natureza ácida, tem capacidade para se ligar a 40 ou mais moléculas de cálcio e atua como uma importante reserva de estoque de cálcio interno (Scott et al., 1988).

A crotamina é uma proteína que possui um ponto isoelétrico de 10,3; uma massa molecular de 4,8 kDa; e três pontes dissulfeto (Gonçalves & Vieira., 1950). Apresenta um pequeno número de resíduos de aminoácidos comparados com outras neurotoxinas (Ryden et. al.,1973; Yang, 1974). Por ser uma molécula resistente ao calor, pode suportar uma temperatura de 70°C por 18 horas sem perder sua propriedade tóxica. Esta fração é capaz de produzir, além do bloqueio na junção neuromuscular *in vitro*, uma miotoxicidade moderada. As crotaminas apresentam um alto grau de similaridade estrutural. Muitas vezes suas isoformas apresentam diferenças que estão relacionadas a substituições pontuais de um único resíduo de aminoácido as quais podem resultar em significativas alterações na atividade biológica das crotaminas. Toyama et al., (2000), isolaram duas isoformas de crotamina F2 e F3 que mostraram diferentes atividades biológicas sobre a secreção de insulina, mesmo com uma variação de resíduos de aminoácidos inferior a 4% em relação à estrutura total.

1.1.4. – Convulxina

A convulxina é uma glicoproteína caracterizada bioquimicamente por Marlas et al. (1983) como uma proteína de 72kDa de peso molecular constituída por duas subunidades distintas de 13,5kDa e 12,5kDa de massa molecular, respectivamente unidas por pontes dissulfeto. Estas duas subunidades foram clonadas e apresentaram seqüência homóloga com o domínio de reconhecimento de carboidrato da família de lectina do tipo C (Francischetti et al 1997; Leduc e Bon 1998). No entanto a convulxina não funciona como

lectina, não sendo capaz de induzir aglutinação de eritrócitos. Essa proteína produz convulsões e alterações respiratórias e foi primeiramente isolada por Prado-Franceschi & Vital Brazil (1981). Vargaftig et al. (1980) foram os primeiros a mostrarem sua atividade de agregação de plaquetas que mostrou ser cálcio dependente (Sano-Martins e Daimon, 1992).

1.2 Venenos de serpentes e Homeostase sangüínea.

Homeostase não envolve unicamente a formação do coágulo, mas também mecanismos para sua dissolução. Em suma, a homeostase envolve dois processos que estão em equilíbrio, mantendo as propriedades hemodinâmicas do sangue constante. Em condições fisiológicas, a coagulação é iniciada por uma injúria vascular, levando a uma vasoconstricção reflexa próxima ao vaso danificado, com mudanças na superfície do endotélio. A participação de adesinas e outras proteínas torna possível a liberação de fatores procoagulantes. A modificação da membrana vascular danificada permite a adesão plaquetária. Esta interação plaquetária, que é o início da formação do coágulo, inicia-se com a interação de glicoproteínas da membrana plaquetária, principalmente glicoproteínas Ib (GPIb), VI (GPVI) e o complexo de glicoproteínas Ia/Integrina Ia (GPIa/IIa) com proteínas do subendotélio, como o fator de von Willebrand (vWF), colágeno, fibronectina e vibronectina. A ativação da plaqueta é então iniciada por agonistas solúveis como trombina e ácido araquidônico (AA). Este processo envolve vias

metabólicas plaquetárias e é associado com a liberação do conteúdo de seus grânulos, em particular o ADP e serotonina. (Figura 4)

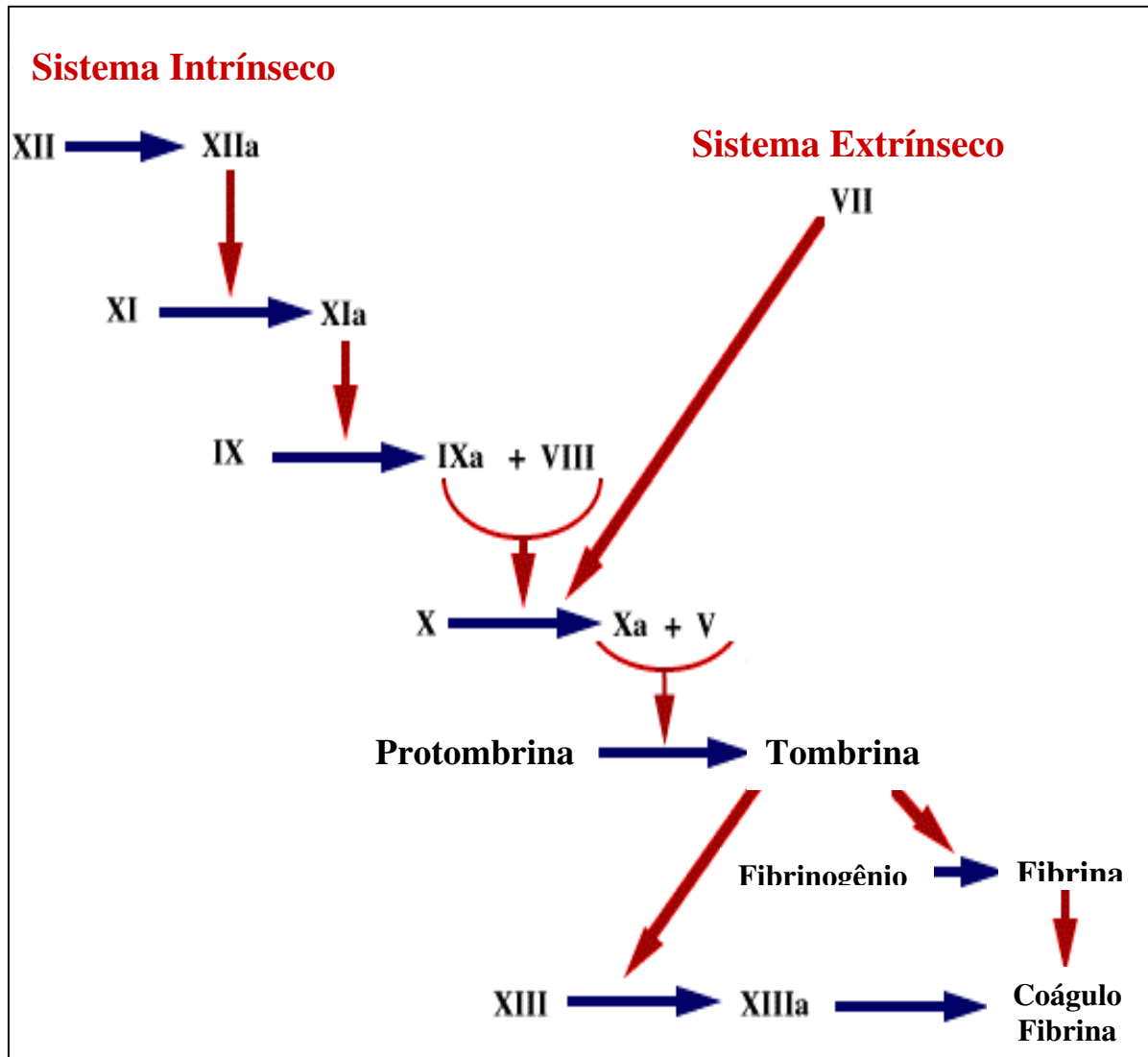


Figura 4. Mecanismo da coagulação sanguínea.

Venenos de serpentes contêm uma grande variedade de proteínas que afetam a homeostase. Metaloproteinases são exemplos deste tipo de proteínas com uma desintegrina e/ou um domínio rico em cisteína e/ou um domínio lectínico tipo C (Bjarnason e Fox, 1994 e Kamigutti et al., (1998). Em alguns casos, o efeito de enzimas presentes nos venenos sobre a homeostase é claro. Como exemplo nós temos as nucleotidases, que hidrolisam ADP para produzir adenosina e que se torna um seqüestrador de ADP e são potentes inibidores da agregação plaquetária (Ouyang, C. & Teng, C.M., 1979 e Huang, T.F., 1999). De forma similar, algumas PLA₂, enzimas de venenos de serpentes que hidrolisam os fosfolipídios da membrana e que atua como um cofator do complexo proteinase e protrombinase (Kini, R.M. & Evans, H.J. 1990), agem também como anticoagulantes (Boffa & Boffa, 1976).

Outras PLA₂ hidrolisam fosfolipídios da membrana de plaquetas e induzem a agregação plaquetária pela liberação de ácido araquidônico (AA) e/ou fator de agregação plaquetária. Muitas metaloproteases e serinoproteases do veneno de serpentes também têm mostrado serem capazes de afetar a homeostase sangüínea. Várias delas atuam degradando fatores de coagulação ou células do endotélio. Contudo, em outros casos, estas proteases, ativando fatores específicos da cascata de coagulação sangüínea ou na fibrinólise atuam seletivamente como as enzimas fisiologicamente envolvidas no processo de controle da homeostase. No veneno das serpentes as proteínas cataliticamente não ativas que afetam a homeostase são principalmente desintegrinas e lectinas tipo C. Desintegrinas são polipeptídeos de baixo peso molecular que inibem a agregação

plaquetária. Estas proteínas possuem uma sequência RGD e competem especificamente com integrinas endógenas, em particular os receptores GPIIb/IIIa de plaquetas (Niewiarowski et al., 1994).

Por outro lado, lectinas tipo C ligam-se seletivamente a proteínas da membrana de plaquetas ou fatores de coagulação (Kini & Evans, 1990). Estas proteínas têm mostrado serem boas ferramentas para investigação dos mecanismos de coagulação sangüínea, uma vez que muitas delas presentes no veneno de serpentes possuem uma estrutura muito parecida com as proteínas fisiologicamente envolvidas (Braud, et al., 2000). Além destas aplicações estas proteínas purificadas de venenos de serpentes também estão sendo investigadas quanto ao seu potencial no desenvolvimento de novos agentes terapêuticos e novas drogas e desenvolvimento de testes diagnósticos.

1.3 Fatores protéicos do veneno de serpentes e a Agregação Plaquetária

Os venenos de serpentes possuem um grande número de proteínas que podem afetar o processo normal de coagulação, bem como a agregação plaquetária. Estes componentes podem ser classificados nos seguintes grupos:-

- I.** Componentes que coagulam fibrinogênio
- II.** Enzimas Fibrino(geno)líticas:
 - (1) α -Fibrinogenase, que especificamente digerem a cadeia α (A) do monômero de fibrinogênio.
 - (2) β -Fibrinogenase, que especificamente digerem a cadeia β (B) do monômero de fibrinogênio.
 - (3) γ -fibrinogenase, que especificamente atacam a cadeia γ do monômero de fibrinogênio.
- III.** Ativador de Plasminogênio
- IV.** Ativador de Protrombina
- V.** Inibidor do complexo protrombinase
 - (1) inibidores sem atividade enzimática não reconhecível
 - (2) Fosfolipase A₂.
- VI.** Ativadores de fator X.
- VII.** Indutores de agregação plaquetária
 - (1) Indutores de agregação sem atividade coagulante
 - (2) Indutores de agregação com atividade coagulante
- VIII.** Inibidores de agregação plaquetária
 - (1) α -fibrinogenase que digere especificamente a cadeia α da cadeia do monômero de fibrinogênio.
 - (2) 5' nucleotidase ou ADPase
 - (3) Antagonista do receptor de fibrinogênio
- VIII.** Fator de von Willebrand

1.3.1 Lectinas

O interesse no estudo das lectinas de venenos de serpentes não reside unicamente na sua função biológica e farmacológica, mas também no fato de possuírem características intermediárias entre os dois grupos de lectinas animais, tipo S e tipo C. As proteínas hemaglutinantes isoladas dos venenos de serpentes são solúveis, apresentam de modo geral massa molecular por subunidade de aproximadamente 14 kDa, são específicas para açúcares com β -galactosídeos, mas requerem Ca^{2+} para sua atividade (Hirabayashi et al., 1991).

As lectinas de venenos são constituídas de cadeias polipeptídicas cuja estrutura primária é homóloga à região molecular que contém o CRD em outras proteínas ligantes de açúcar. São constituídas de aproximadamente 130 resíduos de aminoácidos e não possuem outros domínios acessórios. Elas são o próprio domínio de ligação a carboidratos observados em outras lectinas. Desta forma é vista como um CRD livre (Drickamer, 1993 e 1997).

Outras proteínas, contudo, isoladas do veneno de *Bothrops jararaca* apresentam homologia estrutural com as lectinas tipo-C, sem possuir a atividade de ligação a carboidratos, as denominadas CLPs, como por exemplo: Jararhagina, que inibe a agregação plaquetária induzida por colágeno e ADP (adenosina di-fosfato), (Usami et al., 1993) e a proteína anticoagulante, Jararaca IX/X-bp, que se liga aos fatores IX e X da cascata de coagulação sangüínea (Sekiya et al., 1993). As duas formas da botrocetinas, a de uma cadeia polipeptídica e a de duas cadeias, ligam-se ao fator de von Willebrand

(proteína multimérica presente na circulação sanguínea). Quando este complexo está ativado, a aglutinação plaquetária é induzida (Fujimura e Kuramoto, 1991). BJL e a botrocetina de duas cadeias (Usami et al, 1993) possuem atividades diferentes.

A atividade hemaglutinante é exclusiva da lectina somente enquanto a botrocetina media a agregação plaquetária na presença do fator de von Willebrand independentemente de íons Ca^{2+} , apesar de ter estrutura de lectina tipo C (Ozeki et al., 1994).

Várias outras CLPs, isoladas de veneno de serpentes, possuem diversas funções como: efeito anticoagulante através da ligação aos fatores de coagulação X e XI (Atoda et al., 1991; Sekiya et al., 1993) ou através da ligação a trombina. Outras se ligam a glicoproteínas Ib, mas exibem efeitos variáveis na aglutinação e agregação de plaquetas. Por exemplo, da albogreguina (*Trimeresurus albolabris*), que induz aglutinação na ausência de qualquer cofator, (Peng et al., 1991), e mais a agkicetina, do veneno da serpente *Agkistrodon acutus*, (Chen e Tsai, 1995) inibem aglutinação.

As lectinas tipo C são os componentes mais importantes e os mais estudados em relação a sua habilidade de modulação de agregação plaquetária. As lectinas tipo C de serpentes formam uma família de proteínas com alto grau de similaridade de seqüência de aminoácidos com um domínio regulatório estrutural altamente conservado para ligação ao cálcio. Estas proteínas apresentam-se ligadas por pontes de sulfeto intercadeia o que origina homodímeros de 25kDa em condições não redutoras. Mas quando colocadas em

presença de agentes redutores como DTT ou β -mercaptoetanol, estas proteínas passam a apresentar monômeros de 14 kDa.

Formas multiméricas de 50 a 100 kDa também têm sido descritas para alguns tipos de lectinas como no caso da convulxina, que se mostra com uma massa molecular em condições não redutoras de 90kDa aproximadamente. Está convulxina está ligada covalentemente por pontes de sulfeto a outras lectinas formadas por heterodímeros de 25kDa que também podem, aparentemente, formar multímeros, quando associados não covalentemente. Estas lectinas tipo C têm sido identificadas como agentes promotores da agregação plaquetária de venenos e têm como sítios alvos o fator de von Willebrand, fator GP Ib-IX-V, e fator GP-VI, e possivelmente, outros receptores (Andrews e Berndt, 2000).(Figura 5)

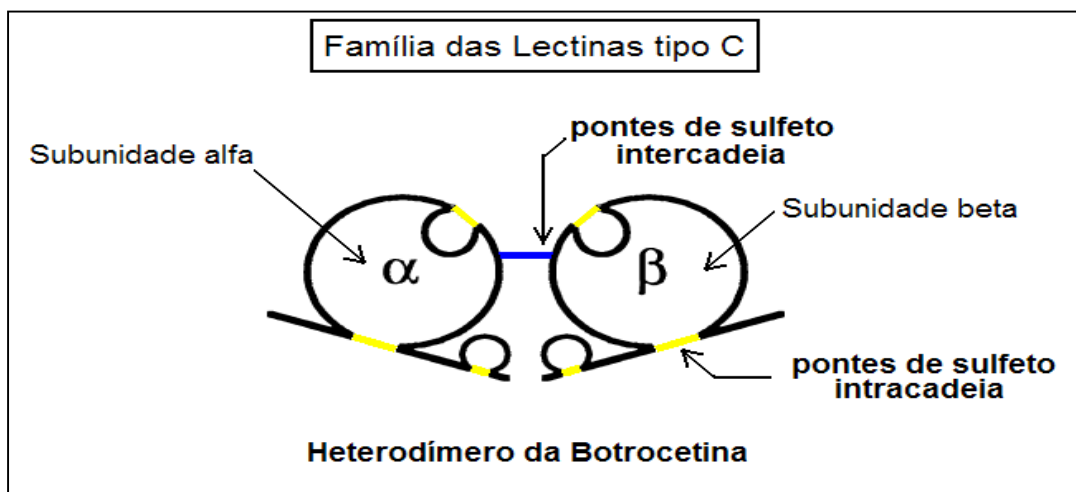


Figura 5. Esquema estrutural da Lectina tipo C.

1.3.2 Metaloproteases-Desintegrinas

Estas proteínas formam uma família com estrutura modular constituída por um domínio para proteases, e um para a desintegrina ; podem incluir um domínio Arg-Gly-Asp (RGD) ou Lys-Gly-Asp (KGD) e um domínio C-terminal rico em Cys (Kini & Evans, 1992 e McLane et al. (1998) (Fig. 6). Através de técnicas de cDNA e análise da estrutura primária das metaloproteases-desintegrinas sugere-se que estas são derivadas de precursores maiores que compreendem inclusive regiões para expressão de lectinas tipo C (Kini, 1996). Contudo, a precisa relação entre estas duas famílias de proteínas ainda não foi totalmente estabelecida. A estrutura cristalográfica da metaloprotease-desintegrina adamalysina II (classe P-1) de *Crotalus adamanteus* e uma outra proteína homóloga de mamíferos (fator de necrose tumoral, ADAM-17) foram caracterizadas usando técnicas de cristalografia de proteínas com uma resolução de 2.0 Å, e mostraram um alto grau de similaridade estrutural (Gomis-Ruth et al., 1993), apesar das duas proteínas serem fisiologicamente diferentes. Dentro destas proteínas, uma das mais bem caracterizadas é a família de desintegrinas, que corresponde ao domínio C, que por sua vez inibe a ligação dos RGD dependente dos receptores da integrina. Estas metaloproteases às vezes possuem várias atividades que podem influenciar a agregação plaquetária, como: ativadores do fator de von Willebrand, clivagem de GP Ib-IX-V ou fator de von Willebrand, bloqueio da $\alpha 1\beta 1$ ou colágeno e metaloprotease-desintegrina que atuam sobre células vasculares de mamíferos.

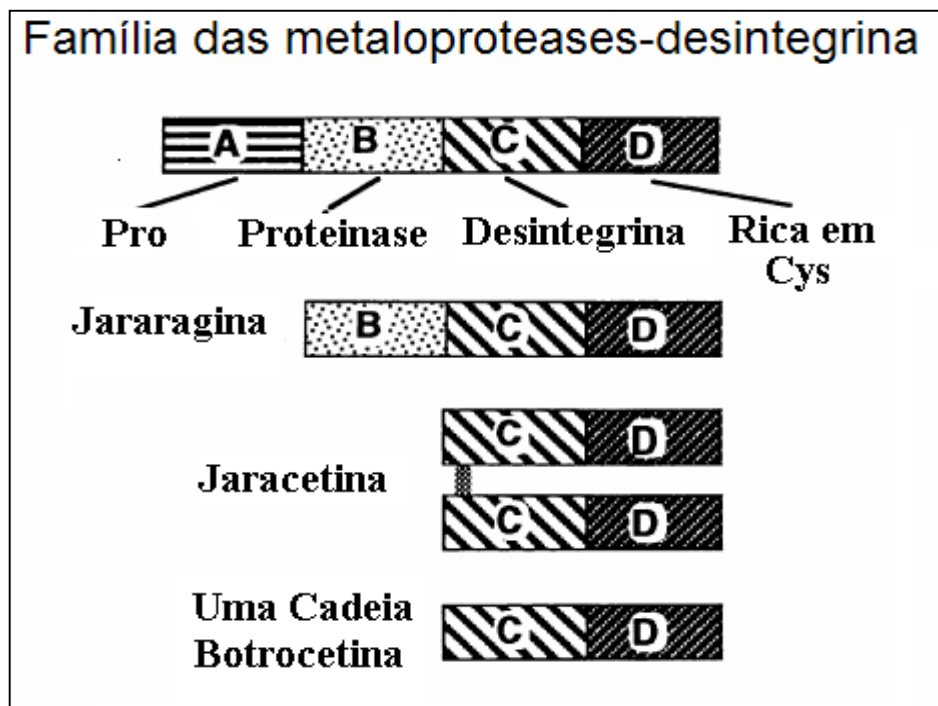


Figura 6. Domínios estruturais das metaloproteases-desintegrina. (Kini & Evans, 1992 e McLane et al. 1998).

1.3.3 Serinoproteases de venenos

Serinoproteases são muito abundantes em venenos de serpentes Viperidae e Crotalidae e em alguns gêneros representando aproximadamente 20% do conteúdo total de veneno. Estas proteínas não são letais por si próprias, mas podem contribuir para o efeito tóxico do veneno, quando associadas com outras proteínas do veneno. Atuam, portanto como sinergistas das atividades tóxicas de algumas frações ativando ou inibindo fatores sangüíneos envolvidos na agregação plaquetária, coagulação ou fibrinólise. Estas proteínas afetam vários passos da cascata de coagulação, quando atuam de forma não seletiva ou de forma altamente específica. Várias serinoproteases de veneno mostram

atividade na agregação plaquetária (Kini & Evans, 1990; Markland. Jr, 1997 e Mitrakul, 1979), mas muitas outras serinoproteases afetam os fatores de coagulação. Fatores coagulantes isolados por clivagem de uma simples ligação peptídica (Kisiel, 1979) de víboras (RVV-V), seletivamente afetam o fator V (FV), convertendo-o em Fva. O efeito anticoagulante do veneno de *Agkistrodon contortrix contortrix* ativa proteína C via proteólise, degradando FVa e fator VIIIa (Stocker et al., 1987). Muitas outras serinoproteínas Viperidae convertem fibrinogênio em fibrina pela clivagem de fibrinopeptídeos A ou B (Stocker et al., 1987 e Pirkle, 1998), similar à atividade da trombina. Desta forma estas enzimas que mostram uma atividade tipo trombina, mas isolada de venenos de serpentes são designadas de trombina símile ou “thrombin like”. Os monômeros de fibrina gerados por trombina símile não formam coágulos semelhantes à trombina, mas devido à proteólise limitada geram fibrinopeptídeos instáveis que não ativam o fator XIII para gerar o fator XIIIa. Então como este processo requer o fator XIIIa ativo para catalisar a interligação dos monômeros de fibrina o coágulo não se forma. Existem também outras serinoproteases que podem ativar plasminogênio, dando, pela hidrólise seletiva da ligação peptídica Arg561-Val562 do plasminogênio plasmina. Serinoprotease de venenos afetam a homeostase, de forma semelhante à de serinoproteases de humanos. Desta forma estas proteínas pertencem à classe das tripsinas símile. Estas proteases são compostas de 235 resíduos de aminoácidos e contêm 12 cisteínas conservadas pareadas com 6 pontes de sulfeto. O alinhamento da estrutura primária desta serinoprotease com serinoproteases de venenos mostram uma alta

conservação do sítio catalítico. Contudo estas proteínas também mostram alterações estruturais, que levam a diferenças em sua atividade fisiológica e de especificidade, sugerindo divergências a partir uma molécula precursora.

As serinoproteases de veneno de serpentes incluindo crotalocitina, trombocitina e algumas enzimas “trombina like” induzem via ADP (um agonista liberado pelas plaquetas) a agregação plaquetária, diferentemente da indução via trombina. Estas enzimas são fortemente inibidas por diisopropilfluorofosfato. Os resultados de agregação plaquetária induzidos por diferentes serinoproteases sugerem que algumas proteínas são capazes de levar à liberação de ADP pelas plaquetas; outras enzimas induzem a liberação tanto do ADP como também de serotonina. Esta atividade está associada à capacidade destas enzimas de interagirem especificamente com receptores localizados à superfície das plaquetas. Esta característica também é usada por algumas plaquetas que inibem a agregação plaquetária (Markland, 1998).

1.3.4 Fosfolipase A₂

Mounier et al. (1994) demonstraram que fosfolipase A₂ isolada do veneno total de *Naja m. mossambica* induzem agregação plaquetária e secreção de ADP. Em geral estas proteínas, atuam liberando ácido araquidônico sobre os fosfolipídios da membrana plaquetária. Experimentos usando aspirina, que é um inibidor de ciclooxigenase, bloquearam o efeito induzido pelas fosfolipases A₂ de venenos sobre a agregação plaquetária, sugerindo que este efeito induzido pelas fosfolipases A₂ envolve a formação

de metabólitos do ácido araquidônico, tais como o tromboxano A_2 (Mounier et al., 1994). As PLA_2 parecem atuar não somente como indutores da agregação plaquetária, mas podem atuar também como inibidores da agregação (Kini & Evans, 1990). Trabalhos apresentados por Takagi et al. (1988) mostram que a agregação plaquetária induzida pela PLA_2 não depende da capacidade enzimática destas enzimas uma vez que o ρ -BPB, um agente alquilante, inibidor da atividade catalítica das PLA_2 , não inibiu a agregação plaquetária. Neste caso a agregação não foi bloqueada por aspirina, mas sim por prostaciclina. Isto sugere que a liberação de ácido araquidônico não tem um papel relevante na agregação plaquetária.

2. OBJETIVOS

O objetivo geral:

- Isolar e caracterizar novos componentes protéicos presentes no veneno total de *Crotalus durissus cascavella* responsáveis pela indução da agregação plaquetária

Os objetivos específicos:

- Purificar e isolar as subunidades de Crotoxina (PLA₂, crotapotina e serinoprotease) e Giroxina (L-aminoácido oxidase).
- Caracterizar bioquimicamente L-aminoácido oxidase;
- Caracterizar bioquimicamente PLA₂, crotapotina e isoformas de serinoproteases;
- Analisar a ação de PLA₂, L-aminoácido oxidase, crotoxina e serinoproteases na indução da agregação de plaquetas lavadas e em plasma rico em plaquetas.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Venenos e reagentes

O veneno total de serpentes tanto botrópicas como crotálicas foi adquirido junto ao Museu Paraense Emílio Goeldi – Belém/Pará e ao Instituto Butantã. Todos os solventes, produtos químicos e reagentes utilizados foram de grau HPLC, grau sequência ou de alto grau de pureza, obtidos do SIGMA, Aldrich Chemicals, Applied Biosystem, Pierce, Merk e Bio Rad.

3.2. Purificação do veneno de *Crotalus durissus cascavella*

3.2.1. Purificação de Proteínas

A. Purificação de Crotoxina e de suas subunidades

Aproximadamente 35 mg de veneno de *Crotalus durissus cascavella* foi dissolvido em tampão Bicarbonato de amônio 0,3 M, pH 7,9 até a sua completa homogeneização, seguido pelo processo de clarificação em uma centrífuga (4500 x g por 2 min). O sobrenadante obtido foi coletado e aplicado em coluna de exclusão molecular Superdex 75 (1,0 x 60 cm, Pharmacia) acoplada em sistema HPLC (1 x 60 cm, Waters) previamente

equilibrado com o mesmo tampão utilizado para a eluição do veneno. A principal fração do veneno foi purificada em fluxo constante de 0,2 ml/min. Frações foram coletadas em intervalos constantes de 2 min para cada tubo. Uma alíquota de 20 µl de cada tubo foi retirada para ensaios enzimáticos (PLA₂, serinoprotease e L-aminoácido oxidase). O monitoramento da corrida cromatográfica foi realizado a 280 nm e a crotoxina-like eluída foi coletada, liofilizada e armazenada a -20 °C para posterior utilização.

A fração crotoxina foi submetida a um segundo passo de purificação usando coluna µ-bondapack C-18 (0,78 x 30 cm). A crotoxina (5,5 mg) foi dissolvida em 200 µl de solução aquosa de TFA 0,1% (tampão A) até completa dissolução. A solução obtida resultante foi clarificada por centrifugação a 4500 x g por 3 min. O sobrenadante foi aplicado na coluna de fase reversa em sistema HPLC e a eluição de PLA₂, crotapotina ou fração “trombina-like” foi realizada em um gradiente não linear de tampão B (67% de acetonitrila em 0,2% de bicarbonato de amônio) e com fluxo constante de 2,0 ml /min. O monitoramento da corrida cromatográfica foi realizado a 280 nm e a fração obtida foi liofilizada.

Aproximadamente 3,0 mg de “trombina-like” foram dissolvidos em 250 µl de tampão A e centrifugado a 4500 x g por 3 min. O sobrenadante foi aplicado em coluna µ-bondapack C-18 (0,78 x 30 cm) previamente equilibrada com tampão A (0,1% TFA) por 15 min. Para a eluição da proteína foi utilizando um gradiente não linear de tampão B (66,6% de acetonitrila em 0,2% de bicarbonato de amônio). O monitoramento da corrida

cromatográfica foi realizado a 214 nm e as frações obtidas foram liofilizadas e armazenadas a -40 °C.

B. Purificação de LAO (L-aminoácido oxidase)

Aproximadamente 35 mg de veneno de *Crotalus durissus cascavella* foi dissolvido em 400 µl de tampão de Bicarbonato de amônio (0,3 M, pH 8,0) e homogeneizado até completa dissolução, seguido por clarificação utilizando centrífuga (4500 x g por 2 min). O sobrenadante obtido foi aplicado em coluna de exclusão molecular Superdex 75 (1,0 x 60 cm, Pharmacia) acoplada em sistema HPLC previamente equilibrada com o mesmo tampão utilizado para a eluição do veneno. A principal fração do veneno foi purificada em fluxo constante de 0,2 ml/min. O monitoramento da corrida cromatográfica foi realizado a 280 nm e a giroxina eluída foi coletada, liofilizada e armazenada a -20 °C para posterior utilização.

Aproximadamente 5 mg de giroxina purificada do veneno foi dissolvida em 250 µl de tampão Bicarbonato de amônio (0,05 M, pH 7,9) e homogeneizado até completa dissolução, seguida por clarificação utilizando centrifugação a 4500 x g por 2 min. O sobrenadante foi recuperado e injetado em coluna de troca iônica acoplada em HPLC (Protein Pack DEAE 5PW, 0,75 x 8,0 cm, Waters) previamente equilibrada com o tampão utilizado para solubilização da amostra. A eluição da fração foi conduzida usando um gradiente linear descontínuo de bicarbonato de amônio a concentração de 1,0 M e fluxo

constante de 1,0 ml/min; a corrida cromatográfica foi monitorada a 280 nm e as frações isoladas foram imediatamente concentradas por ultrafiltração (AMICON), dialisada contra solução de bicarbonato de amônio 5,0 mM, pH 7,8 esterilizado por filtração (0,22 μ M) e armazenado a 4 °C.

Aproximadamente 1,0 mg de LAO obtida por cromatografia de troca iônica foi dissolvido em 250 μ l de tampão A (0,1% de TFA), centrifugado a 4500 x g por 2 min e o sobrenadante foi aplicado em coluna de fase reversa em HPLC, previamente equilibrada com tampão A por 15 min. A eluição da proteína foi conduzida utilizando um gradiente linear de tampão B (66,6% de acetonitrila em tampão A) e a corrida cromatográfica foi monitorada a 214 nm. Após a eluição, a fração foi liofilizada e armazenada a -40 °C.

Esquema de Purificação

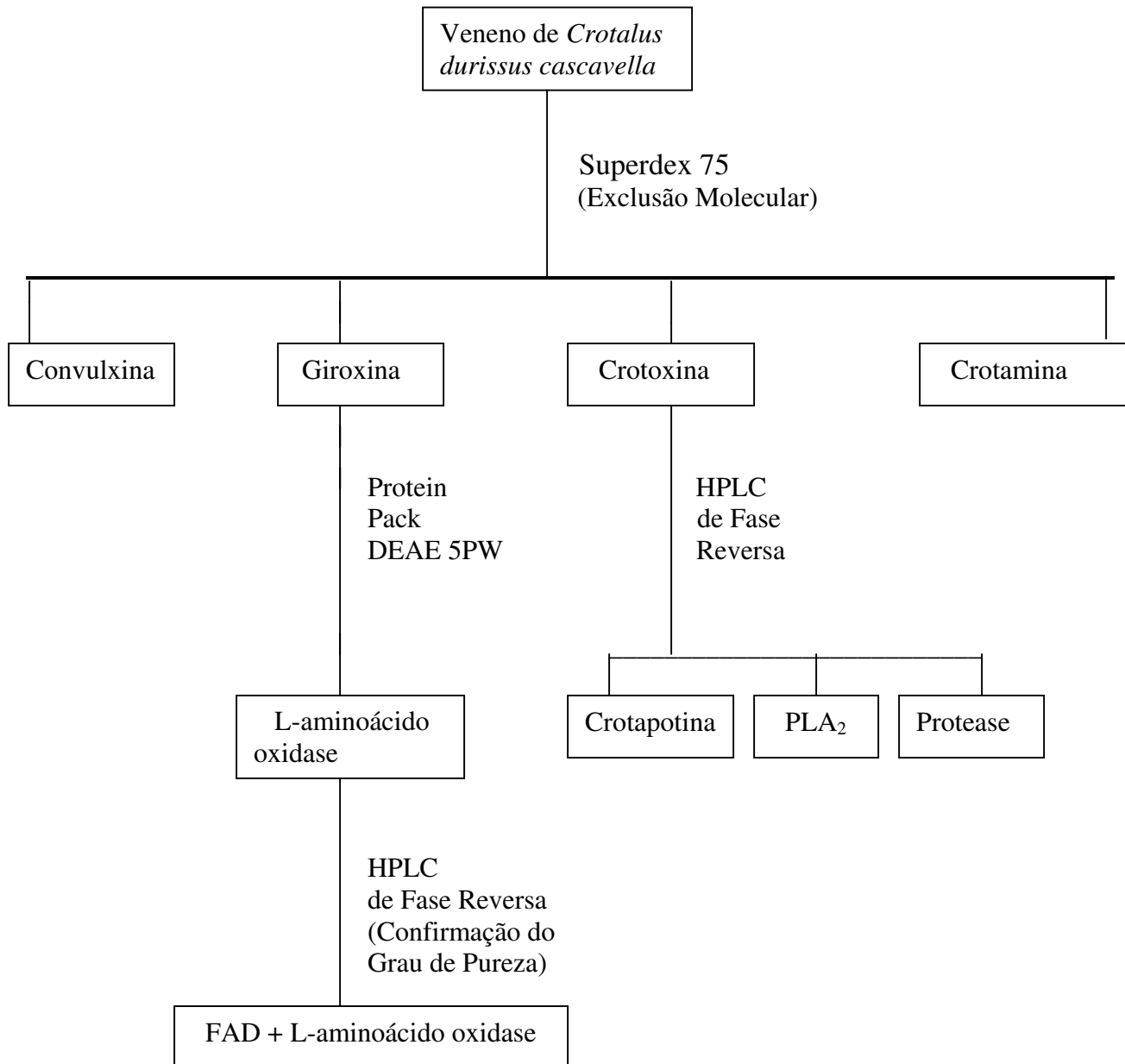


Figura 7. Esquema de Purificação.

3.2.2. Ensaios enzimáticos

A. Atividade PLA₂

A medida da atividade enzimática foi efetuada de acordo com o método descrito por Holzer e Mackessy (1996) adaptado para placa de ELISA com 96 poços. A curva padrão do ensaio foi composta da adição de 200 µl de tampão (Tris-HCl 10 mM, CaCl₂ 10 mM, NaCl 100 mM, pH 8,0), 20 µl de substrato (ácido 4-nitro-3-octanoyloxy-benzóico; 4N₃OBA), 20 µl de água e 20 µl de amostra para um volume final de 260 µl. No ensaio, a solução padrão sem PLA₂ e a solução com PLA₂ foram incubadas separadamente por 20 minutos a uma temperatura constante de 37 °C. Após este prévio tempo de incubação, aproximadamente 20 µl da solução padrão foram incubados na presença de um substrato para o monitoramento da velocidade enzimática (V_o) que foi efetuada a 425 nm a intervalos de 10 min, durante 20 min. Todos os ensaios foram conduzidos em triplicata e a absorbância foi mensurada a 425 nm, usando um multileitor de placas SpectraMax 340 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) e a atividade enzimática foi calculada baseada nas diferenças dos valores da absorbância após 20 min do tempo de incubação.

B. Atividade amidolítica “Trombina-like”

A atividade amidolítica foi mensurada espectrofotometricamente usando substrato de protease cromogênico BApNA adaptado para ELISA utilizando placas de 96 poços. Previamente, 50 µl do substrato cromogênico BApNA (3 mM) foi dissolvido em 200 µl de Tris-HCl (50 mM, pH 7,5) a 37 °C por 30 min e armazenado a 0 °C até o uso. Após o tempo de incubação da reação intermediária, 15 µl da amostra foram adicionados e a reação enzimática foi monitorada por 20 min. Após este período foram adicionados 30 µl de solução aquosa de HCl 10%. As atividades enzimáticas foram expressas com a velocidade inicial da reação (V_o) mensurada após 20 min. Foi medido o aumento da liberação de *p*-nitroanilina, após 20 min do tempo de reação no tampão Tris-HCl (50 mM, pH 7,5) a 37 °C. A concentração enzimática utilizada para o ensaio foi de 1 µg/ µl, 15 µl (15 µg/poço) e as concentrações do substrato foram: 0,062 mM; 0,125 mM; 0,25 mM; 0,50 mM, 1 mM; 2 mM e 4 mM. Todos os ensaios foram conduzidos em triplicata e a absorbância foi mensurada. Os efeitos de PMSF (5 mM), TLCK (0,5 mM), TPCK (0,5 mM), SBTi (10 µg) foram mensurados por adição de cada composto no meio de reação (Tris-HCl 50 mM, pH 7,5) a 37 °C antes da adição da enzima (15 µg). Todos os ensaios foram conduzidos em triplicata.

C. Atividade LAO

O ensaio foi conduzido em microplacas de 96 poços e em triplicata, usando 10 µl de solução enzimática por poço, 90 µl/poço de substrato foram adicionados para iniciar a reação. O meio de reação foi constituído por uma mistura com 250 µM de L-Leucina, 2 µM o-fenilenediamina (OPD), 0,81 U/ml de peróxido de hidrogênio (H₂O₂), e o volume final de 100 µl por poço foi completado com tampão Tris-HCl (pH 8,0). Após incubação a 37°C por 60 min, a reação foi finalizada adicionando-se 50 µl de H₂SO₄ 2M. A absorbância da reação misturada foi mensurada por um multileitor de placas SpectraMax 340 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) a 480nm (Kishimoto & Takahashi, 2001) e a atividade enzimática foi expressa com o aumento na absorbância, após o tempo de incubação. O efeito da concentração do substrato na atividade enzimática foi determinado pela medida do aumento da absorbância, após o tempo de incubação com tampão Tris-HCl, pH 8,0, a 37°C usando diferentes concentrações de L-Leucina (0-350 µM). A atividade LAO foi expressa em nmoles de H₂O₂/min usando o software Origin 5.0 para cálculo em regressão linear em padrões de peróxido de hidrogênio.

3.2.3. Eletroforese em PAGE-SDS

A eletroforese em gel de poliacrilamida foi realizada seguindo-se a metodologia descrita por Laemmli (1970). As placas de poliacrilamida foram feitas de modo descontínuo, apresentando um gel de concentração de 5% e um gel de corrida de 12,5%. As placas foram preparadas utilizando-se uma solução de acrilamida estoque (30%T, 0,8%C). O gel de concentração a 5% foi preparado utilizando-se o tampão Tris-HCl 0,5M, pH 6,8 e o gel de corrida foi feito utilizando-se o tampão Tris-HCl 1,0M, pH 8,8. Em ambos os géis foram acrescentados 0,1% (v/v) de SDS 207%.

A eletroforese PAGE-SDS foi realizada em um sistema duplo de mini placas SE 250 Mighty Small II (Hoefer Scientific Instruments). As amostras e os marcadores de peso molecular foram dissolvidos em tampão de amostra (Tris-HCl, 0,075M, pH 6,8; 10% de glicerol; 4% de SDS; 0,001% de Azul de Bromofenol). A corrida eletroforética foi realizada a 40 mA. Os géis foram corados com solução de Coomassie Blue 0,05% a 37°C e o excesso de corante foi removido com ácido acético 7%.

3.2.4. Eletroforese em 2D para determinar grau de pureza de LAO

A) Preparação das amostras.

Cerca de 2.0 mg/ml de LAO provenientes da cromatografia por troca iônica da Giroxina e cromatografia por exclusão molecular em fase reversa foram dissolvidos em H₂O e centrifugados por 10 minutos a 4500xg. O sobrenadante foi recolhido e sua concentração protéica foi determinada pelo método de Bradford, 1976.

B) Primeira dimensão-focalização isoeletrica

Para a focalização isoeletrica, o sobrenadante foi solubilizado em solução contendo 8M de uréia, 2M de tiouréia, 2% CHAPS, 28 mM de DTT, 1,3% farmalytes (pH 3-10) e azul de bromofenol. Tiras secas de 18 cm, com uma amplitude de pH variando de 4 a 7 foram reidratados com 400µl desta solução por 30 h em parafilme oleoso de baixa viscosidade. As tiras contendo 500µg de proteínas citossólicas, após o processo de reidratação foram submetidas a uma corrida isoeletoforética em um sistema Multiphor II a 20°C. A corrida eletroforética foi realizada em um gradiente linear de voltagem de 0V a 500V para 1000V/h, 500V para 2000V/h, um aumento linear de 500 a 3500V para 10000V/h seguido de 3500V para 35000V/h e uma voltagem final de 48000V/h.

C) Segunda dimensão - PAGE-SDS

Após a primeira dimensão, as tiras individuais foram consecutivamente incubadas em solução de equilíbrio A e B durante 15min. A solução A era constituída por 50mM

Tris-HCl, pH 6,8, 6M de uréia, 30% glicerol, 4% de SDS e completada com 3,5mg de DTT. A solução B apresentava 45mg/ml de iodoacetamida em lugar de DTT. Após o equilíbrio, proteínas foram separadas em gel de segunda dimensão de 10 – 12,5% de PAGE-SDS usando um sistema Rubi (Pharmacia) a 12W/gel. Após o equilíbrio, as tiras foram seladas no topo com gel de eletroforese usando a solução seladora de 1% de agarose, 0,4% de SDS, 0,5M Tris-HCl. Os tampões utilizados para esta corrida eletroforética seguiram os mesmos descritos por Laemmli para gel de SDS (Laemmli, 1970). A corrida eletroforética foi interrompida quando atingiu a marca do azul de Bromofenol.

3.2.5. Análise por Espectrometria de Massas por Maldi-Tof (MS)

A. massa molecular da amostra de Casca LAO foi analisada por Espectrometria de Massas, utilizando-se um Voyager DE PRO MALDI TOF mass spectrometry (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). 1µl da amostra em TFA 0,1% foi misturada em 2 µl da matriz. A matriz foi preparada com ácido α -ciano-4-hidroxi-cinamico (Sigma), 60% acetonitrila e 0,1% v/v TFA. E a massa foi analisada sob as seguintes condições: aceleração de voltagem 25KV, laser ajustado a 2890mJ/cm² em 300ns e o modo de análise foi linear.

3.2.6. Análise de aminoácidos

A análise de aminoácidos foi realizada no analisador automático de aminoácidos PICO TAG (Sistema Waters) seguindo a metodologia descrita por Henrikson e Meredith (1984). Um ou dois nmol das amostras purificadas foram hidrolizados com HCL a 106°C por 24 horas. As amostras hidrolizadas foram posteriormente derivatizadas com PTC (Fenilisotiocianato) por uma hora a temperatura ambiente. Após a derivatização pré-coluna das amostras os aminoácidos derivatizados (PTC aminoácidos) foram identificados, em uma coluna de fase reversa, de acordo com o tempo de retenção dos PTC-aminoácido padrão. Para a quantificação de cisteína e metionina, as amostras foram previamente oxidadas com ácido perbórmico. A hidrólise e a derivatização das amostras oxidadas seguiram a metodologia descrita acima.

A determinação do triptofano foi de acordo com metodologia descrita pela Waters. A hidrólise foi realizada com 4M de Ácido Metilsulfônico ao invés de HCl 6M e a temperatura de hidrólise foi de 110 °C por 20 horas. A derivatização e a análise dos hidrolisados seguiram os procedimentos anteriormente descritos.

3.2.7. Determinação da seqüência N-terminal.

Dois miligramas da proteína purificada de acordo com a metodologia anteriormente descrita foram dissolvidas em 6M de guanidina contendo 0,4M de Tris e 2 mM de EDTA, com pH final de 8,15, reduzida com DTT (14M) e carboximetilada com ácido iodoacético, marcado como descrito por Marangoni et al., 1995. Após a redução e

alquilação radioativa as amostras foram dessalificadas por meio de uma coluna de exclusão molecular em G25, usando o ácido acético 1M como eluente. A dessalificação ocorreu à temperatura ambiente com fluxo livre, sendo coletadas amostras de 1 ml por tubo, o monitoramento da corrida foi realizado a 280 nm.

A proteína reduzida e carboximetilada, RC Proteína, foi processada na região N-terminal da proteína com um seqüenciador automático de aminoácidos (Applied Biosystem modelo Procise f). A identificação dos PTH aminoácidos foi realizada com um PTH Analyzer 120 A da Applied Biosystem. A identificação dos resíduos de Cys foi realizada como PTH ^{14}Cys e confirmada por contagem radioativa.

3.2.8. Atividade Fibrinogenolítica

A atividade fibrinogenolítica foi determinada pela incubação de 0,1 ml de fibrinogênio (0,2%) em tampão Tris-HCl 50 mM (pH 7,5) com 0,1 ml de amostra a ser testada. Alíquotas foram retiradas em intervalos de 15, 45 e 90 min e separadas por SDS-PAGE para verificar a clivagem do fibrinogênio.

3.2.9. Atividade de agregação plaquetária.

A) Preparo da solução de plaquetas

Para este ensaio foram coletados sangue de voluntários sadios, que não tomaram medicamentos por 15 dias. O sangue foi colocado em tubos plásticos contendo citrato de sódio 3,8% (1:10 v/v), e centrifugado a 200 x g por 15 minutos a 25°C para obtenção do plasma rico em plaquetas (PRP); o plasma pobre em plaquetas (PPP) foi obtido centrifugando-se o sangue remanescente a 800 x g por 15 min a 25°C. Para preparar as plaquetas lavadas, o PRP foi centrifugado a 800 x g por 12 min na presença de 9µl de iloprost (8 nM), um análogo da prostaciclina. O sobrenadante foi desprezado e o precipitado de plaquetas foi ressuspensão em solução de Krebs livres de Ca^{2+} e centrifugado a 200 x g. O processo foi repetido por mais duas vezes (Radomski & Moncada, 1983). Após a lavagem, as plaquetas (50µl) foram incubadas em todos tipo eppendorf, com 950 µl de oxalato de amônia 1% por 10 min. e a contagem de plaquetas foi feita em Câmara de Neubauer, ajustada para 3×10^8 plaquetas/ ml. Cloreto de cálcio (1 mM) foi adicionado à suspensão final das plaquetas. O sangue para obtenção das PL contém ACD-C (124 mmol/L Na_3 -citrato, 130 mmol/L ácido cítrico e 110 mmol/L glicose) (1:10, v/v).

B) Medida da Agregação plaquetária.

A medida de agregação foi realizada, usando-se um agregômetro de dois canais (Payton Scientific Instruments, Inc, Buffalo, NY). O PRP representa 0% de agregação, determinando-se uma linha de base para o PRP o aparelho foi calibrado contra PPP, que apresenta 100% de agregação, determinando-se um pico máximo. Com isso foi possível determinar uma amplitude para o registro de agregação deste plasma. Para as PL (0%) a calibração foi realizada contra solução de Krebs (NaCl 118mM, NaHCO₃ 25mM, d glicose anidra 5,6mM e KCL 74g/L) (100%). Uma suspensão de PRP (400 µl) foi mantida sob agitação constante (900 rpm) no agregômetro em cuvetas à 37°C. Os experimentos de agregação foram realizados em triplicatas utilizando-se concentrações crescentes das proteínas purificadas do veneno total de *C. d. cascavella* (Crotoxina, Crotapotina, PLA₂, “Trombina-like” e LAO). Como controles positivos para a agregação foram utilizados ADP (PRP) e trombina (PL). O efeito agregante promovido pela “trombina-like” purificada do veneno foi inibido pela sua incubação com TLCK, e o efeito agregante de LAO foi inibido pela sua incubação com catalase, indometacina e/ou aspirina.

3.3.0. Atividade coagulante no plasma.

Amostras de sangue foram coletados de cinco doadores sadios em presença de citrato de sódio a 3,8% (9:1, v/v) e centrifugados a 2500 x g a 4°C por 15 min para a obtenção do PL. A atividade coagulante foi medida pelo método de Nahas et al. (1979), usando plasma humano citratado. Cinquenta µl foram adicionados a 0,2 ml de plasma citratado e o tempo de coagulação determinado a 37 °C. Nestas condições, foram adicionados 50 µl de CaCl₂ (25 mM) imediatamente antes da adição da fração. Toda a atividade coagulante foi expressa com o inverso do tempo de coagulação em segundos.

4. RESULTADOS

4.1. Caracterização da uma protease “Trombina-like” presente no veneno total de

Crotalus durissus cascavella

4.1.1. Isolamento de proteínas “Trombina-like”

O veneno total foi fracionado por cromatografia de exclusão molecular em sistema HPLC com fluxo constante. As amostras foram coletadas em tubos de 400 µl. A corrida cromatográfica foi monitorada a 280 nm e resultou na eluição de 4 frações principais nomeadas como I, II, III e IV, identificadas como convulxina, giroxina, crotoxina e crotamina (**Figura 8A**). A atividade enzimática foi monitorada a intervalos constantes. A atividade serinoproteásica foi detectada em dois tubos a intervalos de 60-68 minutos e 70-80 minutos (**Figura 8A**) e as atividades coagulantes foram detectadas a intervalos de tempos de 60-68 minutos e 70-80 minutos (**Figura 8B**). A atividade de LAO foi detectada a 64-70 minutos e a fosfolipásica foi detectada a 70-80 minutos. Estes resultados mostram claramente que a crotoxina exibe duas diferentes atividades enzimáticas (fosfolipase A₂ e serinoprotease) e duas diferentes ações biológicas (neurotóxica e coagulante). A giroxina também apresentou duas atividades principais (“trombina-like” e atividade L-aminoácido oxidase).

A crotoxina total foi então fracionada por coluna preparativa de fase reversa em HPLC usando um gradiente não linear de acetonitrila em presença de bicarbonato de amônio, que permitiu a purificação das principais frações serinoproteases, eluídas a 68% de tampão B a 43 min do tempo de retenção. Esta fração foi nomeada F20 e exibiu atividade serinoprotease e atividade coagulante (**Figura 9C**).

Os resultados da cromatografia em HPLC utilizando coluna analítica mostraram que F20 é composto de várias subfrações nomeadas como F201, F202 e F203 (**Figura 9A**). F202 foi a principal fração encontrada em F20 e exibiu atividade coagulante e serinoprotease. O grau de pureza desta fração foi confirmado por cromatografia em coluna de fase reversa analítica em HPLC que indicou apenas uma fração principal (**Figura 9B**), confirmado por SDS-PAGE com uma banda protéica com peso molecular de aproximadamente 28 kDa (**Figura 9C**). Esta proteína purificada após confirmação da homogeneidade foi nomeada F202.

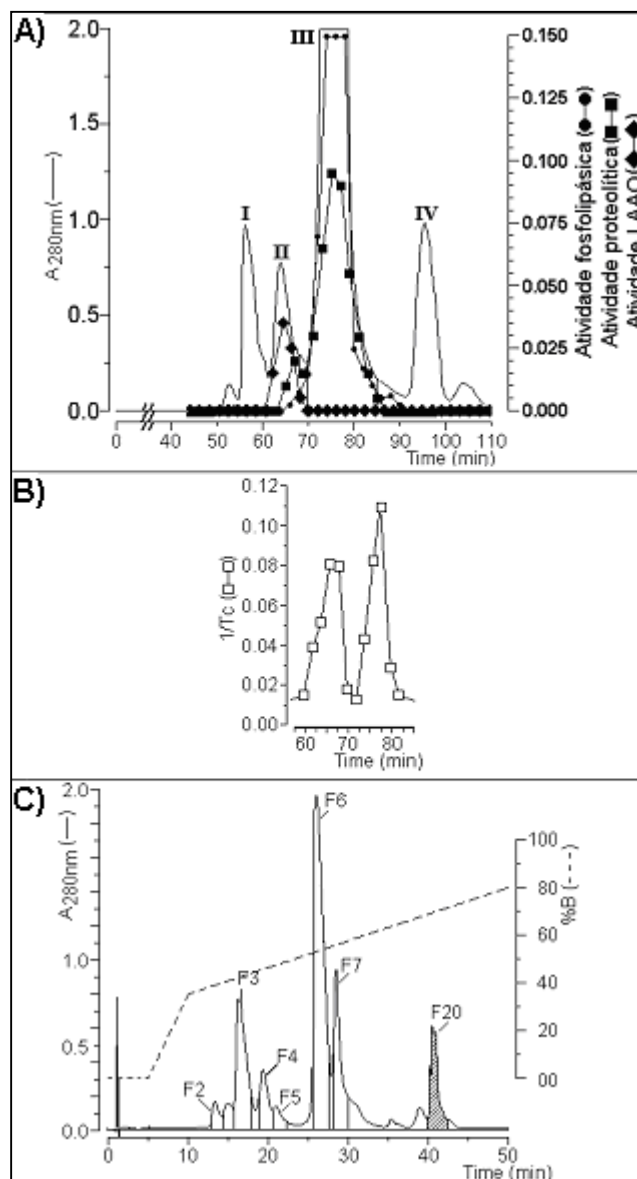


Figura 8. (A) Perfil cromatográfico da purificação do veneno de *Crotalus durissus cascavella* obtido por cromatografia de exclusão molecular (Superdex 75) usando tampão bicarbonato de amônio. A corrida cromatográfica foi monitorada a 280 nm. A atividade enzimática foi monitorada usando alíquotas de 10-20 μ l em cada tubo. As frações em números romanos correspondem a: I (convulxina), II (giroxina), III (crotoxina) e IV (crotamina). A atividade PLA₂ foi encontrada no pico III, a atividade proteolítica foi encontrada na giroxina e crotoxina, a atividade L-aminoácido oxidase foi encontrada apenas na fração II. (B) Foi encontrada atividade coagulante nas frações II e III (C) Os compostos protéicos da crotoxina foram purificados por gradiente não linear de tampão e em fluxo constante de 2 ml/min. Todas as frações foram analisadas para a atividade PLA₂ e serinoprotease. Sob estas condições, F6 e F7 apresentaram atividade PLA₂, e F20 atividade serinoprotease.

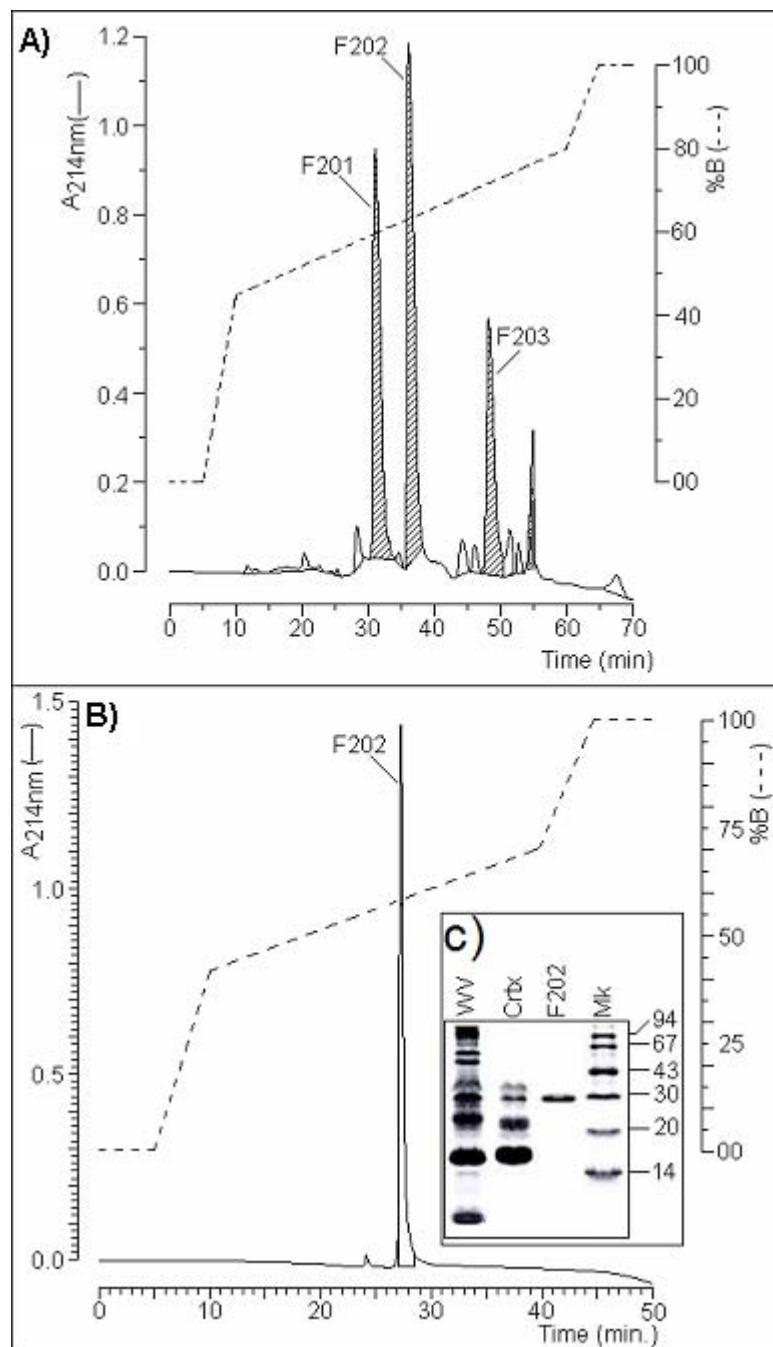


Figura 9. (A) Perfil cromatográfico da fração F20 obtida por cromatografia em HPLC, a qual se observou a purificação de três frações principais nomeadas como F201, F202 e F203. Estas frações foram purificadas usando gradiente não linear. A corrida cromatográfica foi monitorada a 214 nm, a atividade serinoproteásica das frações foi confirmada usando BApNA como substrato. F202 foi então repurificada em HPLC resultando em um pico protéico principal (B). SDS-PAGE confirmou o grau de pureza de F202 e indicou a presença de uma banda protéica com massa molecular estimada em 28 kDa (C).

4.1.2. Cinética enzimática da protease “Trombina-like”

Como a tripsina, F202 exibe uma atividade amidolítica frente ao substrato sintético medido de acordo com o método descrito. F202 exibiu um comportamento e cinética de Michaelis-Menten para K_m , e a $V_{m\acute{a}x}$ foi obtida pela plotagem Lineweaver-Burk. Nestas condições F202 exibiu um $V_{m\acute{a}x}$ de 5,64 $\mu\text{M}/\text{min}$ e K_m de 0,58 mM. Este parâmetro foi obtido com os métodos descritos (**Figura 10**).

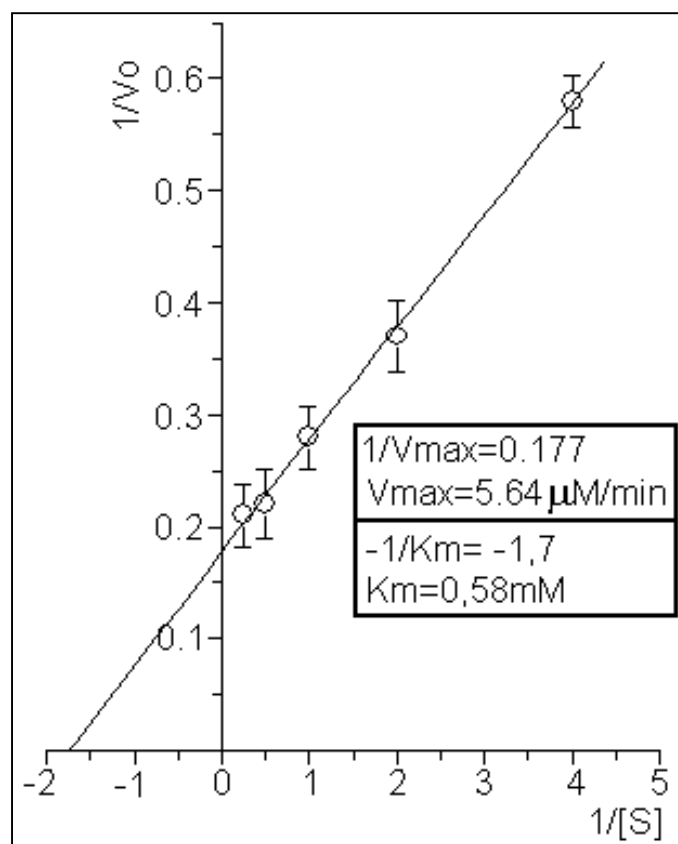


Figura 10. Para a determinação das constantes de $V_{m\acute{a}x}$ ou K_m , da F202, foi usado um gráfico duplo-recíproco de Lineweaver-Burk que permitiu determinar a $V_{m\acute{a}x}$ de 5,64 $\mu\text{M}/\text{min}$ de F202 e K_m de 0,58 mM.

4.1.3. Atividade Fibrinogenolítica de protease “Trombina-like”

Durante a purificação do veneno foi monitorada a atividade coagulante, e após a purificação de F202 observou-se que esta enzima induziu a rápida degradação das cadeias α do fibrinogênio do plasma humano citratado, uma baixa degradação das cadeias β do fibrinogênio e não afetou a cadeia γ (**Figura 11**).

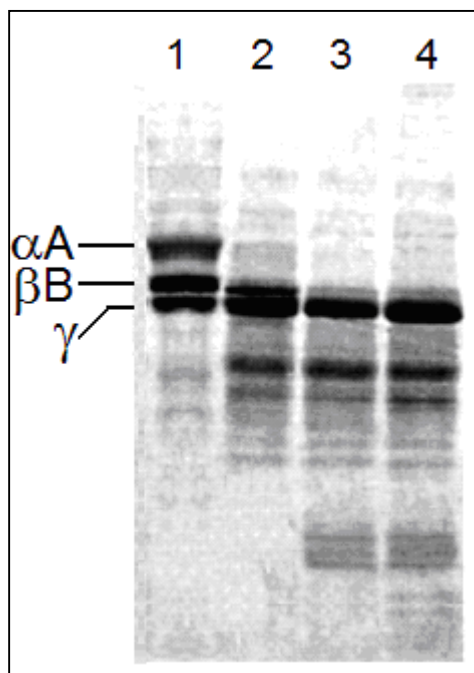


Figura 11. SDS-PAGE do fibrinogênio reduzido após a incubação com a fração F202 purificada da fração “Trombina-like” do veneno total de *C. d. cascavella*, incubado em diferentes tempos 1) Controle , 2) 15 min, 3) 45 min e 4) 90 min. As três maiores bandas na linha 1 são as cadeias α , β e γ do fibrinogênio, respectivamente.

4.1.4. Atividade amidolítica da serinoprotease “Trombina-like”

F202 foi pré-incubada com inibidores de proteases (PMSF, TLCK, TPCK e SBTi) antes de ser adicionada ao meio de reação na presença do substrato para a determinação da atividade serinoproteásica. A atividade enzimática foi fortemente diminuída pela presença de TLCK, PMSF e moderadamente por SBTi (**Figura 12**). A habilidade desta proteína em degradar as cadeias α e β do fibrinogênio e sua inibição por PMSF e TLCK indicou que F202 é uma serinoprotease com atividade “trombina-like”

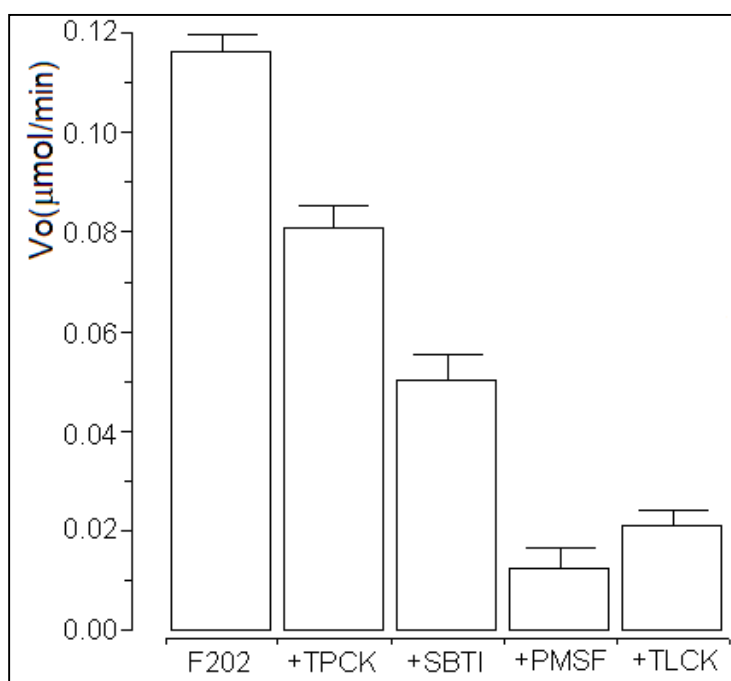


Figura 12. Efeito dos inibidores de serinoprotease PMSF (5 mM), TLCK (0,5 mM), TPCK (0,5 mM) e SBTi (10 μg) sob a fração F202 purificada da fração “trombina-like” de *C. d. cascavella*. (n=4, $p < 0,05$)

4.1.5. Análise de aminoácidos da protease "Trombina-like"

A análise de aminoácidos da F202 purificada revelou um alto conteúdo de aminoácidos ácidos (Asp e Glu) quando comparados com os aminoácidos básicos (Arg, Lys), e alta concentração de Ser e Gly. Também foram observados a presença de 12 resíduos de cisteína, indicando a presença de 6 pontes dissulfeto (**Figura 13**).

Aminoacid	M/M	MW
Asp	24	2762.64
Glu	21	2711.73
Ser	18	1567.62
Gly	19	1084.33
His	18	2468.88
Arg	13	2030.73
Thr	14	1555.68
Ala	13	924.17
Pro	11	1068.43
Tyr	12	1369.80
Val	11	1794.65
Met	6	787.26
Cys	12	1237.68
Ile	11	1134.87
Leu	10	1131.70
Phe	16	2355.04
Lys	18	2307.42
Trp	8	1632.00
Total	255	29924.60

Figura 13. Análise de aminoácidos da fração F202 purificada da fração "Trombina-like" do veneno total de *C. d. cascavella*.

4.1.6. Determinação da seqüência N-terminal da protease “Trombina-like”

A seqüência N-terminal foi similar a outras serinoproteases “trombina-like”. (**Figura 14**) A presença de H (43) altamente conservada confirma esta análise, especialmente se comparada a outras proteínas “trombina-like” agregadoras de plaquetas, tal como PA-BJ (*Bothrops jararaca*), rCC-PPP (*Cerastes cerastes viper*). A análise seqüencial também revelou uma significativa discrepância entre a seqüência de aminoácidos de F202 e giroxina (*Crotalus durissus terrificus*) principalmente no vigésimo e vigésimo segundo resíduo de aminoácido. Este fato foi importante para confirmar a distinção estrutural entre serinoprotease F202 e giroxina.

	1	5	10	15	20	25	30	35	40	45																																				
F202	V	V	G	G	D	E	C	N	I	N	E	H	R	F	L	V	A	L	Y	A	--	N	S	S	L	L	C	G	G	T	L	I	N	Q	E	W	V	L	I	A	A	H	C	D	R	
PA-BJ	V	V	G	G	R	P	C	K	I	N	V	H	R	S	L	V	L	L	Y	N	--	S	S	S	L	L	C	S	G	T	L	I	N	Q	E	W	V	L	I	A	A	H	C	D	S	
rCC-PPP	V	I	G	G	A	E	C	N	I	N	E	H	R	S	L	V	L	L	Y	N	--	S	S	R	L	F	C	G	G	T	L	I	N	K	E	W	V	L	I	A	A	H	C	D	G	
ACC-C	V	I	G	G	D	E	C	N	I	N	E	H	R	F	L	A	L	V	Y	A	--	N	G	S	L	L	C	G	G	T	L	I	N	Q	E	W	V	L	I	A	R	H	C	D	R	
Tsv-PA	V	F	G	G	D	E	C	N	I	N	E	H	R	S	L	V	V	L	F	N	--	S	N	G	F	L	C	G	G	T	L	I	N	Q	D	W	V	V	I	A	A	H	C	D	S	
LM-TL	V	I	G	G	D	E	C	N	I	N	E	H	R	F	L	V	A	L	Y	D	G	L	S	G	T	F	L	C	G	G	T	L	I	N	Q	E	W	V	L	I	A	Q	H	C	N	R
Batroxobin	V	I	G	G	D	E	C	D	I	N	E	H	P	F	L	A	F	M	Y	Y	--	S	P	R	Y	F	C	G	M	T	L	I	N	Q	E	W	V	L	I	A	A	H	C	N	R	
Flavoxobin	V	I	G	G	D	E	C	N	I	N	E	H	P	F	L	V	A	L	Y	D	A	W	S	G	R	F	L	C	G	G	T	L	I	N	P	E	W	V	L	I	A	A	H	C	D	S
Gyroxin	V	I	G	G	D	E	C	N	I	N	E	H	R	F	L	V	A	L	Y	D	G	L	S	G	T	F	L	C	G	G	T	L	I	N	Q	E	W	V	L	I	A	Q	H	C	N	R
Ancrod	V	I	G	G	D	E	C	N	I	N	E	H	R	F	L	V	A	V	E	G	G	T	N	W	T	F	I	C	G	G	V	L	I	H	P	E	W	V	I	I	A	E	H	C	A	R
Human	I	V	E	G	S	D	A	E	I	G	M	S	P	W	Q	V	M	L	F	R	K	S	P	Q	E	L	L	C	G	A	S	L	I	S	D	R	W	V	L	I	A	A	H	C	L	I

Figura 14. Comparação da seqüência N-terminal da fração F202 com outras serinoproteases “trombina-like”, tais como PA-BJ (Serrano et al., 1995); rCC-PPP (Dekhil et al., 2003); ACC-C (McMullen, et al., 1989); Tsv-PA (Zhang et al., 1998); LM-TL (Castro, et al., 2001); Baltroxobina e Flavoxobina (Markland, 1998 e Dekhil et al., 2003), Giroxina (Alexander et al., 1988); Ancrod (Markland, 1998) e Tripsina humana (Dekhil et al., 2003).

4.1.7. Agregação plaquetária induzida pela serinoprotease “Trombina-like”

No plasma rico em plaquetas (PRP), a crotoxina total induziu uma forte e evidente agregação plaquetária a doses de 20 µg, enquanto suas principais subunidades, PLA₂ e crotapotina não evidenciaram a agregação plaquetária (**Figura 15**).

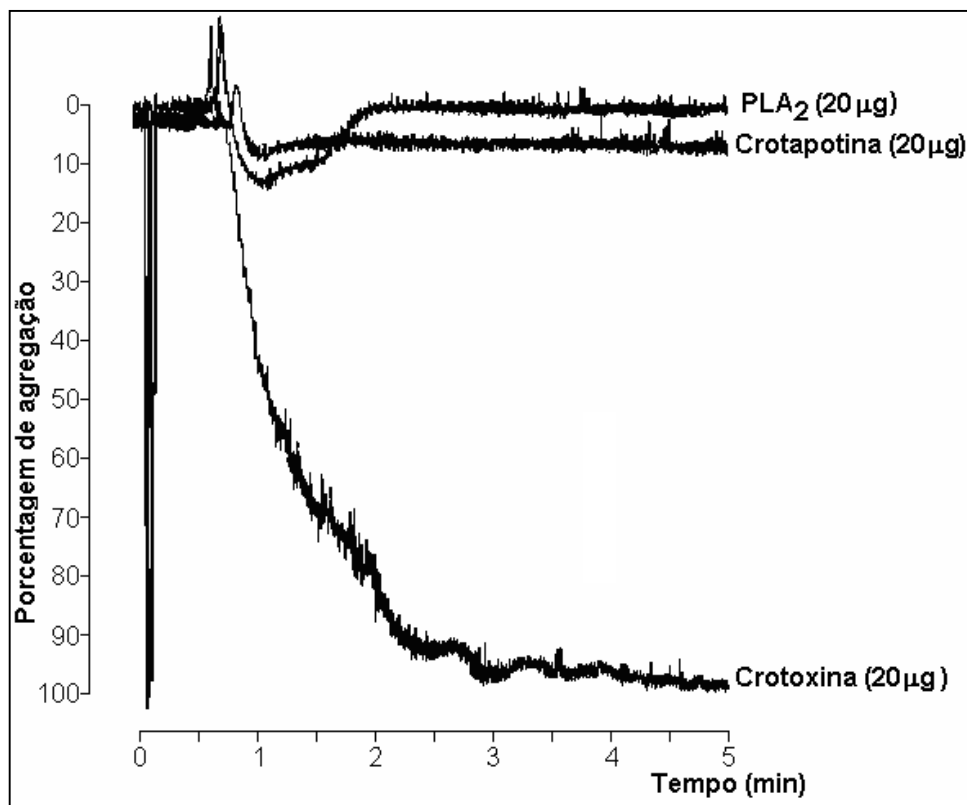


Figura 15. Efeito da crotoxina total e suas subunidades, PLA₂ e crotapotina, na agregação plaquetária usando doses de 20 µg.

Sob condições experimentais similares, F202 induziu a agregação plaquetária dose-dependente a diferentes concentrações (1 μ g, 2 μ g, 5 μ g, 10 μ g e 20 μ g) (**Figura 16**). A mínima dose que F202 induziu a agregação plaquetária foi estimada em 2 μ g. Além disso, F202 induziu um efeito na agregação plaquetária em preparações de plasma rico em plaquetas assim como em plaquetas lavadas. Em ambos os casos, esta atividade foi fortemente inibida pela pré-incubação desta proteína com TLCK (**Figura 17A e 17B**).

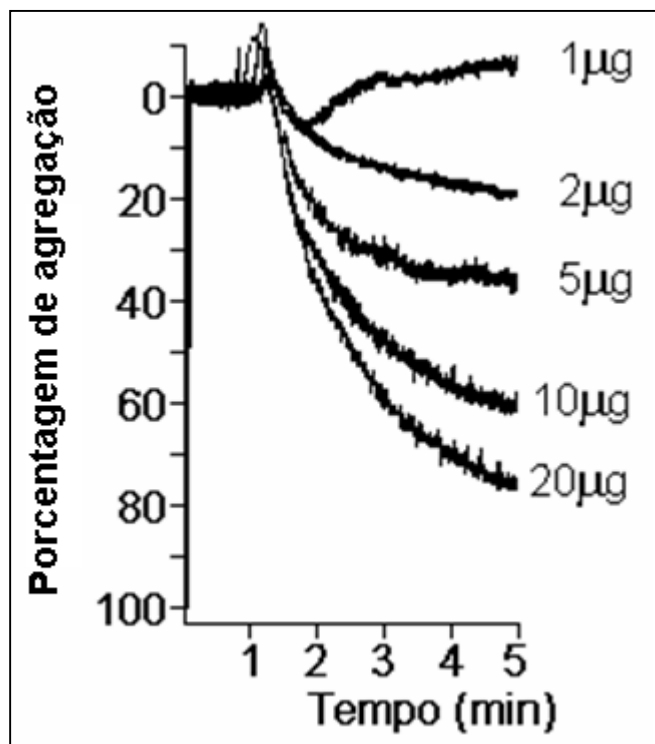


Figura 16. Curva de dose-resposta da fração F202 purificada da fração “Trombina-like” do veneno total de *C. d. cascavella* na agregação plaquetária usando sistema de plasma rico em plaquetas (PRP)

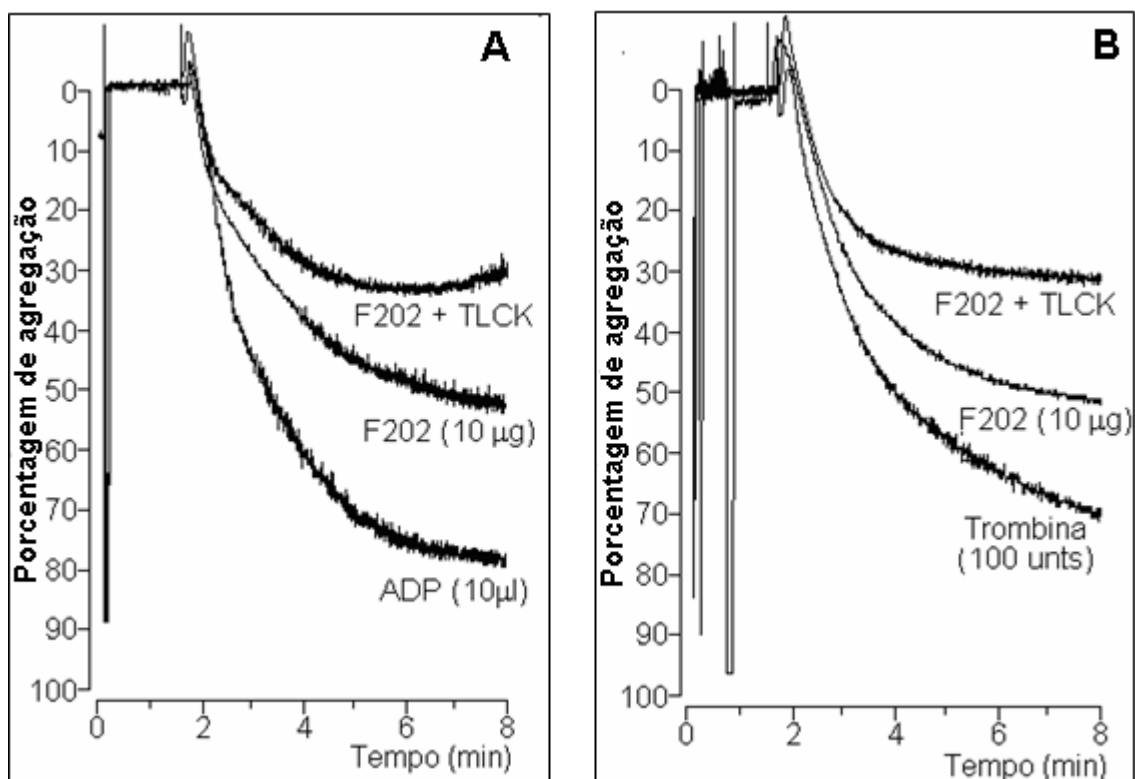


Figura 17: Indução da agregação plaquetária pela fração F202 purificada da fração “Trombina-like” presente no veneno total de *C. d. cascavella*, utilizando tanto PRP (A) como PL (B). A inibição da atividade de agregação promovida por F202 foi realizada pela pré-incubação de F202 com o inibidor TLCK. Para os controles foram utilizados Trombina (PL) e ADP (PRP).

4.2. Caracterização de uma L-aminoácido oxidase (LAO) presente no veneno total de *Crotalus durissus cascavella*

4.2.1. Isolamento de LAO

O veneno total de *C. d. cascavella* foi primeiramente purificado em uma coluna de gel filtração Superdex 75 onde foram obtidas 4 frações majoritárias. A atividade de LAO foi encontrada na fração giroxina, a qual foi coletada e armazenada (**Figura 18A**). A giroxina (5 mg) foi dissolvida e aplicada em uma coluna de troca iônica, que estava previamente equilibrada com bicarbonato de amônio 0,05 M. As amostras da giroxina total foram eluídas usando um gradiente descontínuo de tampão bicarbonato de amônio 1,0 M. O perfil cromatográfico mostrou a presença de nove (9) frações nos quais a atividade de LAO foi detectada na terceira fração principal eluída com 0,05 M de bicarbonato de amônio. Esta fração foi nomeada como Casca LAO (**Figura 18A**). As frações isoladas foram imediatamente concentradas por ultrafiltração (AMICON), dialisadas contra solução de bicarbonato de amônio 5,0 mM (pH 7,8), esterilizada por filtração (0,22 µm) e armazenada a 4 °C.

Esta fração foi eluída com um pico único em cromatografia de fase reversa (HPLC) que separou o FAD da molécula total (**Figura 18B**).

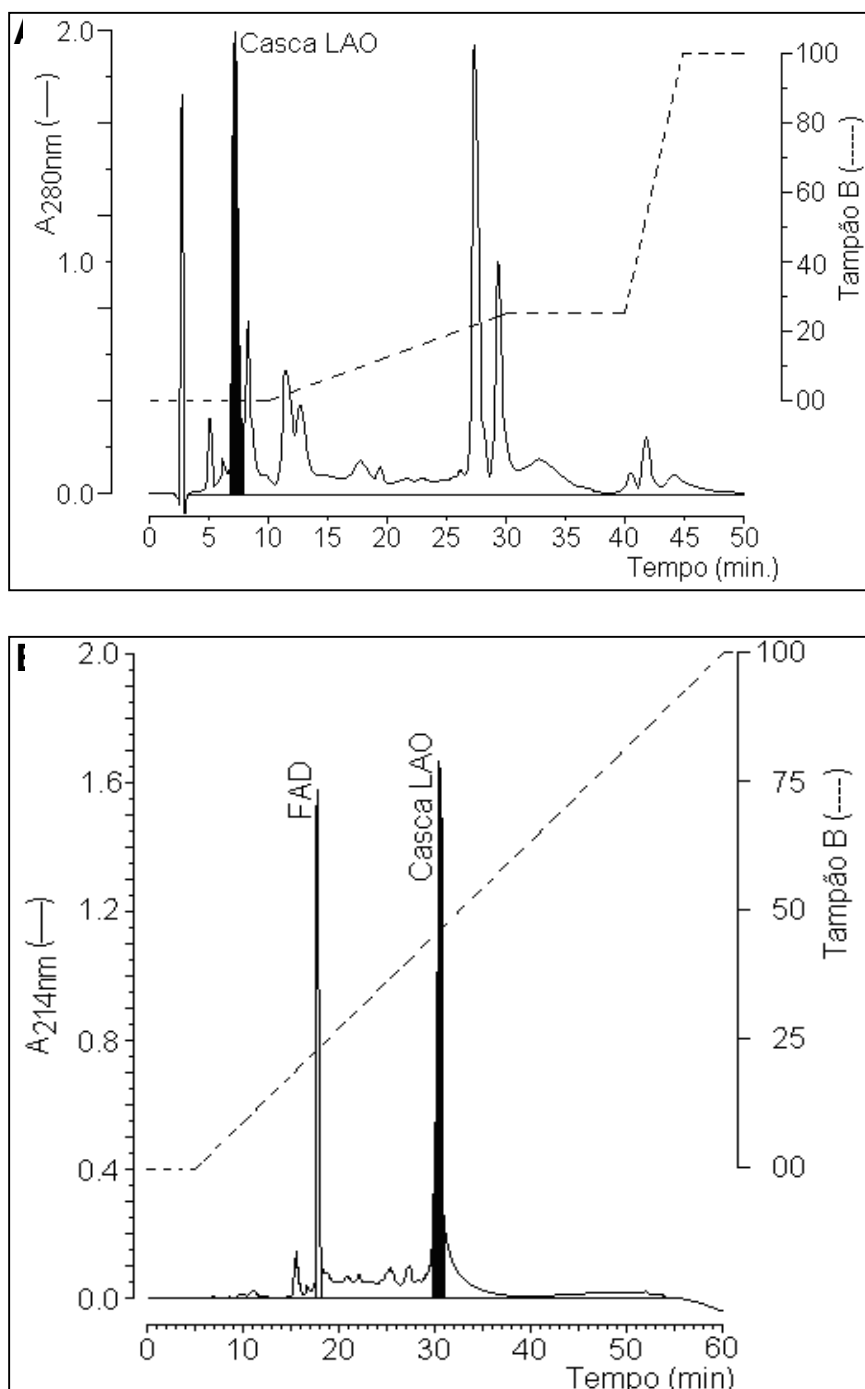


Figura 18: (A) Perfil cromatográfico de Deae Protein Pack da fração Casca LAO encontrada na fração giroxina do veneno total de *C. d. cascavella*. A eluição de Casca LAO foi efetuada a 0,2 ml/min e a corrida cromatográfica foi avaliada 280 nm. (B) Recromatografia em coluna de fase reversa (HPLC) de Casca LAO. A proteína foi eluída usando um gradiente linear de tampão B e a corrida cromatográfica foi monitorada a 214 nm.

4.2.2. Cinética enzimática de Casca LAO

Como observado para outras LAOs, a Casca LAO exibiu um comportamento Michaelis-Menten e os valores da cinética para K_m e $V_{m\acute{a}x}$ foram obtidos pelo gráfico de Lineweaver-Burk, o qual mostrou um K_m de 47,6 μM , $V_{m\acute{a}x}$ de 0,161 e um pH ótimo para a atividade enzimática de 6,5 (**Figura 19 A, B e C**).

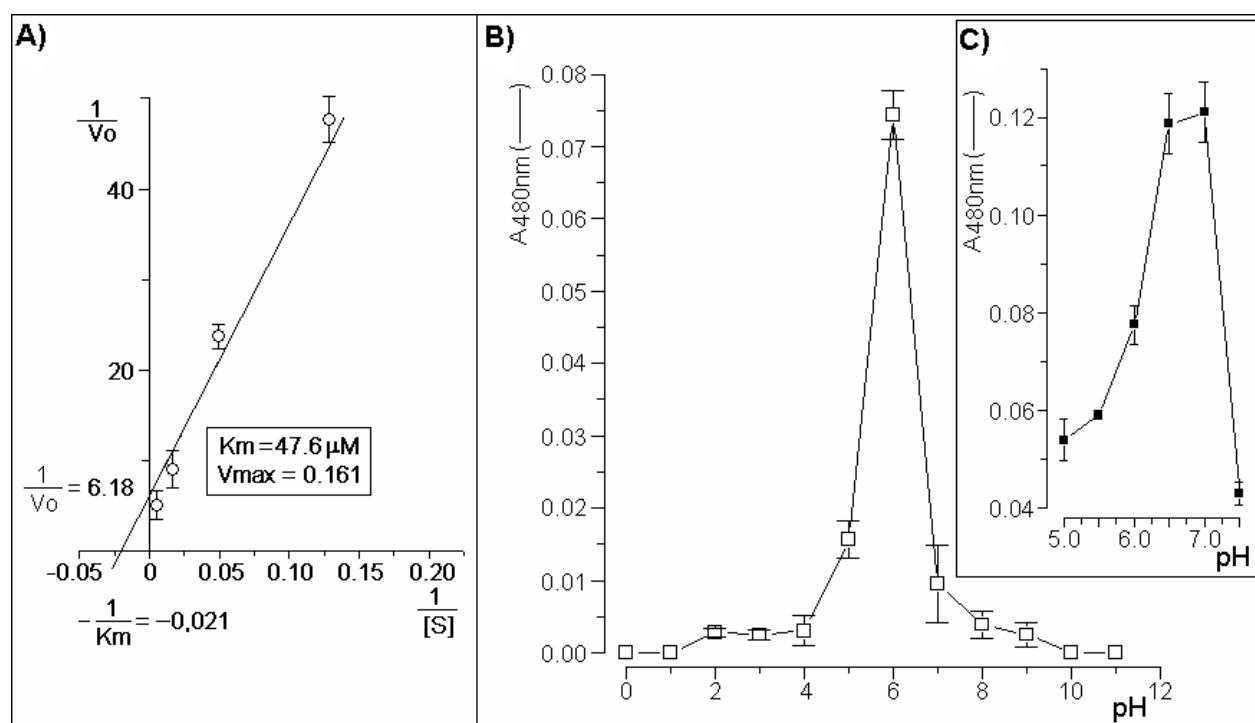


Figura 19: (A) Determinação do K_m e $V_{m\acute{a}x}$ de Casca LAO; (B e C) Efeito do pH na atividade enzimática

4.2.3. Determinação da sequência N-terminal de Casca LAO

Os primeiros 62 resíduos de aminoácidos do N-terminal da enzima reduzida e carboximetilada a fim de obter evidências adicionais da pureza e homologia entre as diferentes LAOs presentes em venenos foram determinados pela análise da degradação automática direta de Edman. A comparação da sequência de aminoácidos N-terminal entre Casca LAO e a enzima LAO previamente descrita na literatura de outros venenos, revelou uma similaridade seqüencial com *Agkistrodon hays blomhoffi* (~97,7%), *Agkistrodon hays hays* (~97,2%), *Crotalus adamanteus* (95,8%) e *Trimeresurus stejnegeri* (96,3%) (**Figura 20**).

	1	10	20	30	40
<i>Crotalus d. cascavella</i>	ADDRNPLEQCFRET DYEEFLEIARNNLKATSNPKHVIVG				
<i>Colloselasma rhosostoma</i>	AE...Q.N.....				
<i>Crotalus adamanteus</i>	.H.....E.....K.G.T.....R.....				
<i>Agkistrodon h. blomhoffi</i>	E.....G.....				
<i>Agkistrodon h. halyx</i>	...H...E.....T.F.....G.N.....				
<i>Trimeresurus stejnegeri</i>	F.E.....G.....E.....				
	41	50	60		
<i>Crotalus d. cascavella</i>	AGMAGLSAAYVLSGGGHQVTV ...				
<i>Colloselasma rhosostoma</i>	A.A.....				
<i>Crotalus adamanteus</i>	A.A.....				
<i>Agkistrodon h. blomhoffi</i>	S.A.....				
<i>Agkistrodon h. halyx</i>	...S.....T.S.A.....				
<i>Trimeresurus stejnegeri</i>	GA.SS.....V.ALG.....				

Figura 20: Sequência N-terminal de Casca LAO purificada do veneno total de *C. d. cascavella*. A proteína foi reduzida e carboximetilada em um sequenciador de aminoácidos automático. O alinhamento de aminoácidos foi efetuado usando o software BLAST (PubMed). A análise da sequência do N-terminal de Casca LAO com LAOs de outros venenos, LAO de *Colloselasma rhosostoma*, LAO de *Agkistrodon hays blomhoffi*, LAO de *Agkistrodon hays hays*, LAO de *Crotalus adamanteus* e LAO de *Trimeresurus stejnegeri*.

4.2.4. Agregação plaquetária induzida por Casca LAO

Casca LAO induziu a agregação plaquetária em plasma humano rico em plaquetas (PRP) de maneira dose-dependente a 10, 5, 1 e 0,5 µg/ml (**Figura 21A**). O ED50 para a indução da agregação plaquetária de Casca LAO foi estimada em 7 µg/ml e este efeito foi dependente da produção de H₂O₂, que é o produto final de LAO. O efeito da presença de peróxido de hidrogênio no meio de reação foi claramente demonstrado pela adição de catalase no ensaio de Casca LAO, o qual aboliu este efeito. Além disso, foi observada uma forte diminuição na agregação plaquetária pela adição de indometacina (1 x 10⁻⁵ M) ou aspirina (1 x 10⁻⁵ M), que poderiam estar inibindo a ativação de PLA₂ endógenas, sugerindo que o envolvimento de fosfolipases A₂ também seja importante para a agregação plaquetária induzida por Casca LAO (**Figura 21B**).

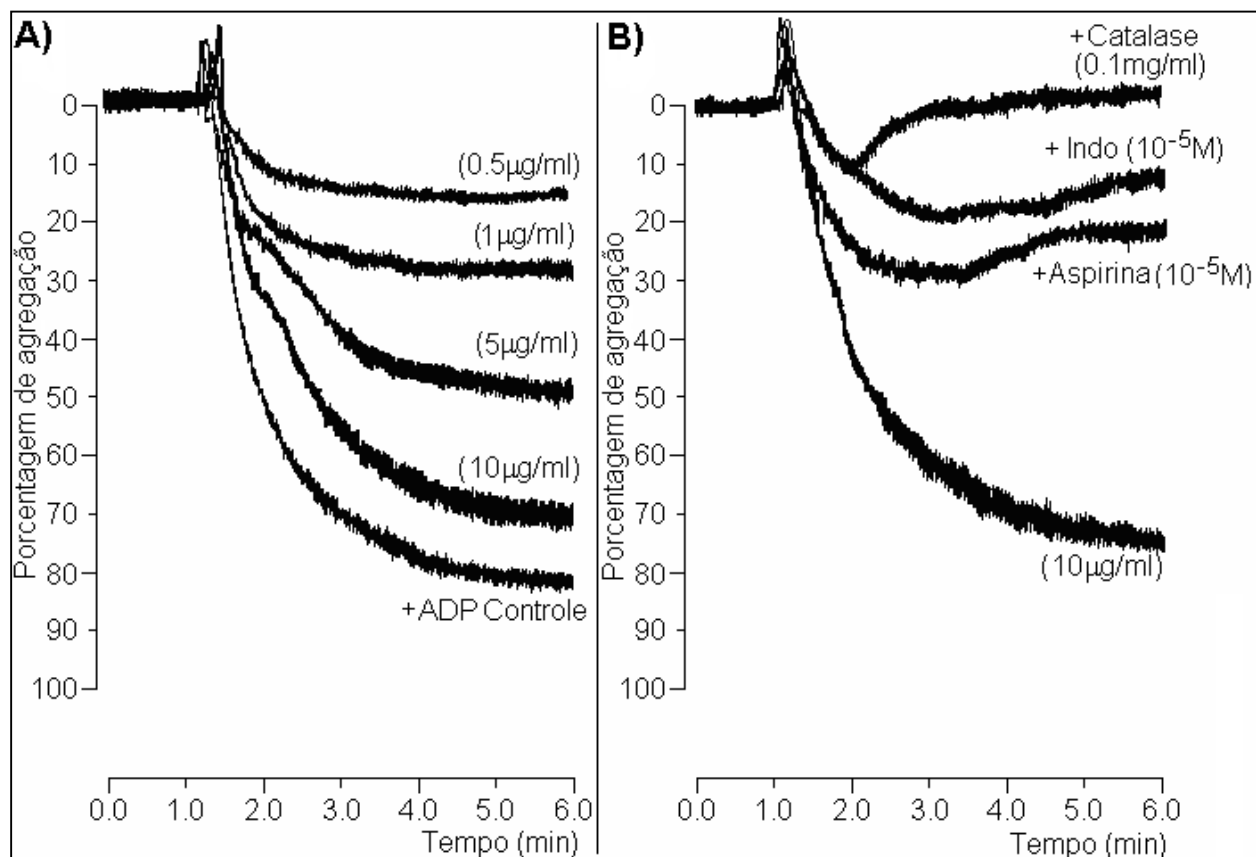


Figura 21: Efeito de Casca LAO na preparação de PRP a diferentes concentrações (10, 5, 1 e 0,5 µg/ml). **(A)** ADP foi utilizado como controle positivo da agregação. **(B)** Efeito da catalase (catalase 0,1 mg/ml), indometacina (Indo, 1×10^{-5} M) e aspirina (Aspirina, 1×10^{-5} M) e o controle de Casca LAO (10 µg/ml).

5. Discussão

Neste trabalho foi purificada uma nova serinoprotease “Trombina-like” da fração crotoxina presente no veneno total de *C. d. cascavella* pela combinação de exclusão molecular e cromatografia de fase reversa em sistema HPLC. Esta proteína purificada teve a sua pureza e massa molecular analisada por SDS-PAGE. A massa molecular foi determinada em 28 kDa e esta proteína pode ser descrita como um polipeptídeo de cadeia única, similar ao observado para outras enzimas “trombina-like” do veneno de serpentes e fibrinogenases (Selistre e Giglio, 1987; Chen e Rael, 1997; Huang et al., 1999). A presença de modelos de cadeia única determinada por SDS-PAGE para esta enzima na ausência e presença de agentes redutores tem sido comumente encontradas para outras serinoproteases com atividade serinoprotease (Tans & Rosing, 2001). A sub-fração 202 exibiu uma atividade serinoprotease típica com a habilidade de degradar fibrinogênio, assim como observado para outras enzimas “trombina-like” (Selistre e Giglio, 1987). As serinoproteases do veneno de serpentes têm sido caracterizadas como amostras com atividades fibirnogenolíticas e fibrinolíticas, mas muitas têm exibido apenas atividade fibrinogenolíticas, tais como a proteína isolada neste trabalho, nomeada de F202 da fração total da crotoxina de *C. d. cascavella*. F202 também exibiu atividade de coagulação do fibrinogênio e, de acordo com o critério apresentado por Markaland (1991) e Pirkle (1998), esta proteína pode ser definida como uma protease “trombina-like”. Esta enzima exibiu uma atividade coagulante em células do plasma humano citratadas e rapidamente

degradou a cadeia α , enquanto vagorosamente degradou a cadeia β do fibrinogênio, indicando que esta é uma proteína “trombina-like” com atividade α,β -fibrinogenase, como definida por Ouyang & Teng (1979) e Bortoleto et al. (2002).

Apesar da habilidade em degradar fibrinogênio, os coágulos formados por F202 foram instáveis e não apresentaram o aspecto característico dos coágulos normais. Esta instabilidade dos coágulos pode ser devido à habilidade da serinoprotease “trombina-like” do veneno aumentar preferencialmente os fibrinopeptídeos A como B do fibrinogênio, elevando a quantidade de coágulos anormais. Estes coágulos de fibrina são compostos de pequenos polímeros, de modo a interferir no sistema de coagulação sangüínea de suas vítimas (Ouyang et al., 1992; Markland, 1998; Pirkle, 1998). No veneno de serpentes há algumas proteínas que induzem à agregação plaquetária; algumas destas proteínas incluem as serinoproteases, tais como crotalocitina, trombocitina e algumas enzimas “trombina-like” (Teng & Ko, 1988). A atividade enzimática de F202 foi inibida pela adição de PMSF ou TLCK, similar aos resultados observados por serinoproteases isoladas de mamíferos, os quais foram reduzidas por inibidores de serinoproteases comuns, tais como diisopropil fluorofosfato (DFP), fenilmetilsulfonil fluorido (PMSF) e TLCK (Matsui et al., 2000). Estes resultados permitem concluir que F202 exhibe características típicas de enzimas serinoprotease de venenos de serpente.

De fato, três diferentes receptores foram identificados em plaquetas humanas: PAR 1, PAR 4 e GP 1b(29). Confirmou-se que os receptores de trombina em plaquetas ativadas são PAR 1 e PAR 4. Recentemente, GP 1b(29) mostrou ser um receptor de trombina

funcional para a agregação plaquetária. Dentre as serinoproteases de venenos de serpente, apenas PA-BL e trombocetina, de *Bothrops jararaca* e *Bothrops atrox*, respectivamente, mostraram induzir a agregação plaquetária através de PAR 1 e PAR 4 (Dekhil et al., 2003). Um outro exemplo de serinoprotease que induz a agregação plaquetária é a trombocetina purificada de *Bothrops atrox*. Esta é uma serinoprotease “trombina-like” e é inibida por substâncias sintéticas específicas, tais como DFP (Niewiarowski et al., 1994). F202 induz uma agregação dose-dependente que foi fortemente inibida pela substância sintética TLCK. Este resultado claramente mostra a correlação entre a atividade enzimática e a agregação plaquetária. A análise molecular desta serinoprotease de *Cerastes cerastes* revelou que esta proteína apresenta um segmento de aminoácidos inseridos entre os resíduos de aminoácidos Tyr67-Arg80 os quais correspondem à região de ligação de ânions, que ligam a trombina, e está envolvida na agregação plaquetária (Dekhil et al., 2003).

F202 é uma serinoprotease que apresenta similaridades biológicas com proteínas “trombina-like”, exibe uma atividade amidolítica e causa agregação plaquetária em suspensão de plasma rico em plaquetas e em plaquetas lavadas. Diferente de outras proteínas “trombina-like”, F202 também exibe atividade de coagulação de fibrinogênio. O N-terminal de F202 apresentou uma alta homologia com peptidases da família S1 da subfamília dos venenos de serpentes, mas a sequência N-terminal foi levemente diferente do N-terminal da giroxina, a qual foi a primeira serinoprotease isolada de *Crotalus*

durissus ssp (Alexander et al., 1988). A giroxina também apresenta uma diferença molecular do perfil de, F202, assim como diferença na massa molecular.

Em conclusão, foi identificada uma nova serinoprotease na fração crotoxina diferente da giroxina. Esta nova proteína induz a agregação plaquetária como observado para a crotoxina. A crotoxina tem sido caracterizada pelos seus efeitos neurotóxicos, os quais são conduzidos principalmente por dois componentes protéicos: fosfolipase A₂ e crotapotina. Neste trabalho, evidenciou-se que o veneno de *C. d. cascavella* apresenta dois diferentes grupos de proteases e um deles foi encontrado na crotoxina. Assim a crotoxina pode estar envolvida em algumas desordens da hemóstase e tem sido marginalmente estudada, se comparada aos venenos botrópicos.

Neste trabalho juntamente com a purificação e caracterização de uma serinoprotease “trombina-like”, foi purificada uma nova L-aminoácido oxidase (LAO) presente no veneno de *C. d. cascavella* com altos graus de homogeneidade molecular após dois passos cromatográficos. Esta nova LAO é uma molécula altamente estável com um caráter moderadamente ácido e tem como cofator enzimático FAD. Este composto representa aproximadamente 0,28% do veneno seco de *C. d. cascavella*. Outros venenos podem apresentar maiores concentrações de LAO (Torii et al., 1997). As propriedades bioquímicas, tais como massa molecular, atividade e caráter ácido, foram consistentes para encontrar outras LAOs descritas na literatura (Du et al., 2002). Esta proteína, eluída por exclusão molecular em sistema HPLC apresentou uma massa molecular de 115-125 kDa, embora seu peso molecular determinado por eletroforese bidimensional tenha

indicado uma proteína monomérica com massa molecular de 67 kDa. Este resultado sugere uma estrutura agregada comumente observada para glicoproteínas. A agregação ou dimerização são também comumente observados para LAO (Stabeli et al., 2004). Seu pI foi de aproximadamente 5-6 similar a outra enzima descrita na literatura e corroborou pela análise de aminoácidos devido ao alto conteúdo de Asp ou Glu. Uma comparação entre a seqüência N-terminal de Casca LAO e a enzima isolada de outros venenos de serpentes relatadas até o momento revelaram uma seqüência de aminoácidos particularmente idêntica com *Agkistrodon contortrix laticinctus*, *Crotalus adamanteus* e *Trimeresurus stejnegeri*. Na seqüência N-terminal pelo menos 46 resíduos de aminoácidos apresentaram alto conteúdo de aminoácidos ácidos (principalmente ácido glutâmico). Os resíduos estavam inteiramente conservados em toda a seqüência analisada e a presença de metionina no 43º foi detectada, assim sugerindo um sítio glutamínico rico e altamente conservado. A Casca LAO apresenta um Km menor que 46,7 µM e seu pH ótimo foi estimado em 6,5; os efeitos foram similares para com os valores encontrados para várias LAOs isoladas de venenos de serpentes por Wellner & Meister (1961). Estes resultados sugerem que o protocolo de purificação utilizado para a Casca LAO foi eficiente e garantiu a integridade estrutural desta proteína.

Casca LAO também induziu a agregação plaquetária de modo dose-dependente em plasma rico em plaquetas (PRP). As LAOs de outros venenos de serpente, como a de *Crotalus atrox* e *Calloselasma rhodostoma*, possuem um importante papel na coagulação sanguínea após a picada de cascavel, e estão envolvidas direta ou indiretamente na

trombose ou mudanças na homeostase sanguínea (Torii et al., 1997). Experimentalmente, porém, observou-se que a LAO de *Crotalus durissus cascavella* induz uma forte agregação plaquetária. Os resultados mostraram que a incubação de Casca LAO com catalase aboliu a agregação plaquetária embora alguns estudos na literatura não mostrem claramente que a diferença biológica e os efeitos tóxicos produzidos por LAO de veneno de serpente estejam relacionados ou mediados pela produção de H_2O_2 , e o produto final da oxidação da L-aminoácido oxidase. A indometacina e aspirina têm sido usadas como inibidores gerais na via da ciclooxigenase. Essas drogas foram capazes de inibir a agregação plaquetária induzida por Casca LAO. Os resultados sugerem que a produção de H_2O_2 envolve a subsequente ativação de enzimas inflamatórias como o tromboxano, o qual foi previamente descrito para LAO isolada de veneno de *O. hannah* (Li et al., 1994).

Crotalus durissus cascavella apresenta uma fração menos estudada denominada giroxina que tem sido descrita como uma proteína “trombina-like”, como relatado por Raw et al. (1986) e Alexander et al. (1988). Há mais estudo mostrando que a giroxina é responsável por alguns efeitos neurotóxicos, os quais parecem envolver a habilidade desta fração em induzir lesões no hipocampo. Este efeito controverso foi apenas relatado para giroxina, mas não para outras proteínas “trombina-like” (Camillo et al, 2001). Neste trabalho foi demonstrado que a giroxina é uma fração heterogênea composta de uma “trombina-like” e proteína LAO, a qual parece estar envolvida em várias atividades biológicas. Também, os experimentos de agregação sugerem que o mecanismo de ação de Casca LAO não é apenas dependente da ação direta do peróxido de hidrogênio na

membrana, mas também pela sua habilidade em induzir uma modificação estrutural dos lipídeos de membrana, que conseqüentemente, ativa a cascata do ácido araquidônico e gera produtos bioativos derivados de lipídeos.

6. CONCLUSÕES

- Purificou-se à partir da fração crotoxina uma nova serinoprotease “Trombina-like”, denominada F202, que apresentou massa molecular de 28KDa, atividade fibrinogenolítica e fibrinolítica, capacidade coagulante e capacidade em degradar cadeias α e β do fibrinogênio.
- F 202 exibiu atividade amidolítica e causou agregação plaquetária em PRP e PL.
- A atividade enzimática de F202 foi inibida pela adição de PMSF e TLCK, inibidores comuns de serinoproteases.
- Verificou-se que F202 é uma serinoprotease que apresenta similaridades biológicas com proteínas “Trombina-like”.
- Foi purificada uma nova L-aminoácido oxidase presente no veneno de *C.d. cascavella* após dois passos cromatográficos que foram eficientes e garantiram a integridade estrutural desta proteína.
- Casca LAO induz forte agregação plaquetária de modo dose-dependente em plasma rico em plaqueta.
- A incubação de Casca LAO com catalase aboliu a agregação plaquetária e a utilização de indometacina e aspirina, usados como inibidores gerais na via ciclooxigenase, foi capaz de inibi-la.
- Foi demonstrado que a giroxina é uma fração heterogênea composta por uma “trombina-like” e por proteína LAO.

7. APÊNDICES

7.1. Publicações

- Fonseca, F.V., Antunes, E., Morganti, R.P., Helena S.A. Monteiro, Alice, M.C. Martins, Toyama D.O., Marangoni, S. and Toyama, M.H. Characterization of a new platelet aggregating factor from crotoxin *Crotalus durissus cascavella* venom. *The Protein Journal* (Accepted)
- Toyama, M.H., Toyama, D.O., Passero, L.F., Laurenti, M.D., Corbett, C.E., Thaise Y. Tomokane, T.Y., Fonseca, F.V., Antunes, E., Joazeiro, P.P., Beriam, L.O.S., Martins, M.A., Monteiro, H.S., Fonteles, M.C. (2006) Isolation of a new L-amino acid oxidase from *Crotalus durissus cascavella* venom. *Toxicon* 47(1), 47-57.

7.2. Congressos

XX Reunião Anual da FeSBE (Federação de Sociedades de Biologia Experimental). Águas de Lindóia - SP, 24 a 27 de Agosto de 2005.

- Characterization of proteic fraction from the crotoxin responsible for platelet aggregation. Fonseca, F.V., Toyama, M.H., Antunes, E., Morganti, R.P., Toyama, D.O., Marangoni, S.

8. REFREÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALEXANDER, G; GRUTHUSEN, J; ZEPEDA, H. & SCHWRTZON, R.J. Gyroxin, a toxin from the venom of *Crotalus durissus terrificus*, is a thrombin-like enzyme. *Toxicon*. 26: 953-960, 1988
- ALI, S.A; STOEVA, S; ABBASI, A; ALAM, J.M; KAYED, R; FAIGLE, M; NEUMEISTEIR, B; & VOELTER, W. Isolation, structural, and functional characterization of an apoptosis-inducing L-amino acid oxidase from leaf-nosed viper (*Eristocophis macmohoni*) snake venom. *Arch. Biochem. Biophys*:384, 216-226, 2000.
- ANDREWS, R.K; BERNDT, M.C. Snake venom modulators of platelet adhesion receptors and their ligands. *Toxicon*. Jun; 38 (6): 775-91, 2000.
- ATODA, H; HYUGA, M; MORITA, T. The primary structure of coagulation factor IX/factor X-binding protein isolated from the venom of *Trimeresurus flavoviridis*. Homology with asialoglycoprotein receptors, proteoglycan core protein, tetranectin, and lymphocyte Fc epsilon receptor for immunoglobulin E. *J Biol Chem*. 15; 266 (23):14903-11, 1991.
- AZEVEDO-MARQUES, M. M; CUPO, P; COIMBRA, T.M; HERING, S.E; ROSSI, M.A; LAURE, C.J. Myonecrosis, myoglobinuria and acute renal failure induced by South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*) envenomation in Brazil. *Toxicon* 23: 631-636, 1982.
- BIEBER, A.L; NEDELKOV, D. Structural, biological and biochemical studies of myotoxin homologous myotoxin. *J. Toxicol.-Toxin Rev*. 16: 33-52, 1997.
- BIEBER, A.L; MCPARLAND, R.H; BECKER, R.R. Amino acid sequences of myotoxins from *Crotalus viridis concolor* venom. *Toxicon* 25, 677-680, 1987.
- BIEBER, A.L & BERGSTRON, J.D. Characterization of purified guanine aminohydrolase. *Arch Biochem Biophys*. Apr 15;194(1):107-16, 1979.
- BJARNASON, J.B & FOX, J.W. Hemorrhagic metalloproteinases from snake venoms. *Pharmacol Ther*. 62(3):325-72, 1994.
- BOFFA, M.C; BOFFA, G.A. A phospholipase A₂ with anticoagulant activity II. Inhibition of the phospholipid activity in coagulation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA). Enzymology*, 429 (3), 839-852, 1976.

- BON, C; CHANGUEUS, J. P; JENG, T. W. & FRAENKEL-CONRAT, H. Postsynaptic effects of crotoxin and of its isolated subunits. *Eur. J. Biochem.* 99 (3): 471-481, 1979.
- BORTOLETO, R.K; MURAKAMI, M.T; WATANABE, L; SOARES, A.M & ARNI, R.K. Purification, characterization and crystallization of Jaracussin-I, a fibrinogen-clotting enzyme isolated from the venom of *Bothrops jararacussu*. *Toxicon* 40: 1300-1312, 2002.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72: 248-54, 1976.
- BRAUD, S; BON C & WISNER, A Snake venom proteins acting on hemostasis. *Biochimie.* 82, (9-10): 851-859, 2000.
- BRAZIL, O.V; & FONTANA, M.D. Toxins as tools in the study of sodium channel distribution in the muscle membrane. *Toxicon* 31: 1085-1098, 1993.
- BREITHAUPT, H. Enzymatic characteristics of *Crotalus* phospholipase A₂ and the crotoxin complex. *Toxicon* 14: 221-233, 1976.
- CAMILLO, M.A.; ARRUDA PAES, P.C., TRONCONE, L.R & ROGERO, J.R. Gyroxin fails to modify in vitro release of labelled dopamine and acetylcholine from rat and mouse striatal tissue. *Toxicon* 39(6), 843-853, 2001.
- CARDOSO, D.F & MOTA, I. Effect of *Crotalus* venom on the humoral and celular immune response. *Toxicon* 35(4): 607-612, 1997.
- CASTRO, H.C; SILVA, D.M; CRAICK, C & ZINGALI, R.B. Structural features of a snake venom thrombin-like enzyme: thrombin and trypsin on a single catalytic platform. *Biochim. Biophys. Acta.* 1547 (2): 183-195, 2001.
- CHANG, C. C. & LEE, J. D. Crotoxin, the neurotoxin of South American rattlesnake venom, is a pre- synaptic toxin acting like β - bungarotoxin. *Naunym Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 296: 159-168, 1977
- CHEN, T. & RAEL, E.D. Purification of M5, a fibrinolytic proteinase from *Crotalus molossus molossus* venom that attacks complement. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 29, 789-799, 1997.

- CHEN, Y. & TSAI, I. H. Biochem. Functional and sequence characterization of agkecetin, a new glycoprotein Ib antagonist isolated from *Agkistrodon acutus* venom. *Biophys. Res. Commun.* 210: 472-477, 1995.
- DEKHIL, H.; WISNER, A.; MARRAKCHI, N.; EL AYEB, M.; BON, C. & KAROUI, H. Molecular cloning and expression of a functional snake venom serine protease, with platelet aggregating activity, from *Cerastes cerastes* viper. *Biochemistry.* 42: 10609-10618, 2003.
- DELOT, E. & BON, C. Model for the interaction of crotoxin, a phospholipase A₂ neurotoxin, with presynaptic membranes. *Biochemistry* 32: 10708-10713, 1993.
- DRICKMANER, K. Recognition of complex carbohydrates by Ca²⁺ dependent animal lectins. *Biochem. Soc. Trans.* 21(2): 456-459, 1993.
- DRICKMANER, K. Making a fitting choice: common aspects of sugar-binding sites in plant and animal lectins structure. 5, (4): 465-468, 1997.
- DU, X.Y. & CLEMETSON, K.J. Snake venom L-amino acid oxidases-Review. *Toxicon.* 695-665, 2002.
- FAURE, G.; CHOUMET, V.; BOUCHIER, C.; CAMOIN, L.; GUILLAUME, J.L.; MONEGIER, B.; VUILHORGNE, M.; BON, C. The origin of the diversity of crotoxin isoforms in the venom of *Crotalus durissus terrificus*. *Eur. J. Biochem.* 223(1): 161-164, 1994.
- FAURE, G. & BON, C. Crotoxin, a phospholipase A₂ neurotoxin from the South American rattlesnake *Crotalus durissus terrificus*: purification of several isoforms and comparison of their molecular structure and of their biological activities. *Biochemistry.* 27(2): 730-738, 1988
- FOX, J.W.; ELZINGA, M.; TU, A.T. Amino acid sequence and disulfide bond assignment of myotoxin isolated from the venom of prairie rattlesnake (*Crotalus viridis viridis*). *Biochemistry* 18: 678-684, 1979.
- FRANCISCHETTI, I.M.B.; GOMBAROVITS, M.E.; VALENZUELA, J.G.; CARLINI, C.R.; GUIMARAES, J.A. Intraspecific variation in the venoms of the South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*). *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.* 27 (1): 23-36, 2000.

- FRANCISCHETTI, I.M.B; GHAZALEH, F.A; REIS, R.A.M; CARLINI, C.R. & GUIMARÃES, J.A. Convulxin Induces Platelet Activation by a Tyrosine-Kinase-Dependent Pathway and Stimulates Tyrosine Phosphorylation of Platelet Proteins, Including PLC γ 2, Independently of Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$. Archives of Biochemistry and Biophysics. 353, (2): 239-250, 1998.
- FRANCISCHETTI, H.C.C.; ZINGALI, R.B.; CARLIANI, C.R. & GUIMARÃES, J.A. Identification of glycyrrhizin as thrombin inhibitor. Biochem. Biophys. Res. Commun. 235: 259-263, 1997.
- FUJIMURA, K. KURAMOTO, A. Function and pathophysiology of platelet membrane glycoproteins. Rinsho Byori. Suppl 91:161-79.1991.
- FURUKAWA, K.; FUNAYAMA, K.; OHKURA, M.; OSHIMA, Y.; TU, A.T.; OHIZUMI, Y. Ca²⁺ release induced by myotoxin a, a radio-labellable probe having novel Ca²⁺ release properties in sarcoplasmatic reticulum. Br. J. Pharmacol. 113: 233-239, 1994.
- GOMIS- RUTH, F.X; KRESS, L.F.; BODE, W. First structure of a snake venom metalloproteinase: a prototype for matrix metalloproteinases/collagenases EMBO J. 12 (11): 4151-7, 1993.
- GONÇALVES, J.M.; & VIEIRA, L.G. Estudos sobre venenos de serpentes brasileiras I. Análise eletroforética. Ana.Acad.Brás.Cien. 22: 141, 1950.
- GOPALAKRISHNAKONE, P.; HAWGOOD, B. J.; THEAKSTON, R. D G. Specificity of antibodies to the reconstituted crotoxin complex, from the venom of South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*), using enzyme- linked immunosorbent assay (ELISA) and double immunodiffusion. Toxicon 19: 131-139, 1981.
- HATI, R, MITRA, P, SARKER, S, BHATTACHARYYA, K K. Snake venom hemorrhagins.Crit. Rev.Toxicol. 29 (1): 1-19, 1999.
- HAWGOOD, B.J. & SANTANA DE SA, S. Changes in spontaneous and evoked release of transmitter induced by the crotoxin complex and its component phospholipase A₂ at the frog neuromuscular junction. Neuroscience: 4 (2): 293-303, 1979.
- HENDON, R.A. & FRAENKEL-CONRAT, H. Biological role of the two components of Crotoxin. Pnas, 68 (7): 1560-1563, 1971.

- HEINRIKSON, R.L, MEREDITH, S.C. Amino acid analysis by reverse-phase high-performance liquid chromatography precolumn derivatization with phenylisothiocyanate. *Anal. Biochem.* Jan; 136(1):65-74, 1984.
- HIRABAYASHI, J.; KUSUNOKI, T.; KASAI, K. Complete primary structure of a galactose-specific lectin from the venom of the rattlesnake *Crotalus atrox*. Homologies with Ca^{+2} dependent type lectins. *J.Biol. Chem.* 266 (4):2320-2326, 1991.
- HOLZER, M. & MACKESSY, S.P. An aqueous endpoint assay of snake venom phospholipase A_2 . *Toxicon.* 34 (10): 1149-1155, 1996.
- HUANG, Q.Q; TENG, M.K. & NIU, L.W. Purification and characterization of two fibrinogen-clotting enzyme from five-pace snake (*Agkistrodon acutus*) venom. *Toxicon*, 999-1013, 1999.
- KAMIGUTI, A.S.; ZUZE, M. THEAKSTON, R.G.D. South venom metalloproteinases and desintegrins: interactions with cells. *Braz. J. Med. Res*, 31: 853-862, 1998.
- KARLSSON, E. Chemistry of protein toxic in snake venom. In Lee, C.Y. (Ed): *Handbook of Experimental Pharmacology*, pp 159-212, 1979.
- KINI, R. M. Are C-type lectin-related proteins derived by proteolysis of metalloproteinase/disintegrin precursor proteins? *Toxicon.* 34, (11-12), 287-1294, 1996.
- KINI, R. M. & EVANS, H. J. Structural domains in venom proteins: evidence that metalloproteinases and nonenzymatic platelet aggregation inhibitors (disintegrins) from snake venoms are derived by proteolysis from a common precursor. *Toxicon.* 30 (3): 265-293, 1992.
- KINI, R. & EVANS, H. J. Effects of snake venom proteins on blood platelets. *Toxicon* 28: 1387-1422, 1990
- KISHIMOTO, M. & TAKAHASHI, T. A spectrophotometric microplate assay for L-amino acid oxidase. *Analytical Biochemistry* 298: 136-139, 2001.
- KISIEL W. Molecular properties of the factor V-activating enzyme from Russell's viper venom. *J Biol Chem.* 10; 254 (23): 12230-4, 1979.
- KORNALIK, F. Toxins affecting blood coagulation and fibrinolysis. In: *Handbook of Toxinology*, pp 683 (Shier, W.T. & Mebs, D., Eds) New York: Marcel Dekker, 1990

- KOUYOUUMDJIAN, J.A.; HARRIS, J.B.; JOHSON, M.A. – Muscle necroses caused by the subunits of crotoxin. *Toxicon* 24: 575-583, 1986.
- LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins among the assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nature*. 227: 680-685, 1970
- LANDUCCI, E. C; ANTUNES, E; DONATO, J. L; FARO, R; HYSLOP, S; MARAGONI, S; OLIVEIRA, B; CIRINO, G; DE NUCCI, G. Inhibition of carragenin-induced rat paw o edema by crotapotin, a polypeptidecomplexed A₂. *Br. J. Pharmacol.* 114 (3): 578-583, 1995.
- LANDUCCI, E.C; CONDINO-NETO, A; PEREZ, A.C; HYSLOP, S; CORRADO, A. P; NOVELLO, J.C; MARAGONI, S; OLIVEIRA, B; ANTUNES, E; DE NUCCI, G. Crotoxin induces aggregation of human washed platelets. *Toxicon* 32 (2): 217-226, 1994.
- LEDUC, M.; BON, C. Cloning of subunits of convulxin, a collagen-like platelet-agregating protein from *Crotalus durissus terrificus* venom. *Biochem. J.* 333:389-393, 1998
- LI, A.Y; YU, T.F & E.C. Purification and characterization of L-amino acid oxidase from king cobra (*Ophionagus hannah*) venom and its effects on human platelet aggregation. *Toxicon*. 32: 1349-1358, 1994.
- MAEDA, N.; TAMYA, N., PATTABHIRAMAN, T.R., RUSSEL, F.E. Some chemical properties of the venom of the rattlesnake, *Crotalus viridis helleri*. *Toxicon* 16, 431-441, 1978.
- MARANGONI, S; TOYAMA, M.H; ARANTES, E.C; GIGLIO, J.R; DA SILVA, C.A,, CARNEIRO, E.M; GONCALVES, A.A; OLIVEIRA, B. Amino acid sequence of TsTX-V, an alpha-toxin from *Tityus serrulatus* scorpion venom, and its effect on K⁺ permeability of beta-cells from isolated rat islets of Langerhans. *Biochim Biophys Acta*. Apr 13;1243(3):309-14, 1995.
- MARKLAND, F.S. Snake venoms and the hemostatic system. *Toxicon*, 36, 1749-1800, 1998.
- MARKLAND, F.S.Jr. Snake venoms. *Drugs*. 54 Suppl 3:1-10, 1997.

- MARLAS G, JOSEPH D, HUET C. Subunit structure of a potent platelet-activating glycoprotein isolated from the venom of *Crotalus durissus cascavella*. *Biochimie*. Nov-Dec; 65(11-12):619-28, 1983.
- MARTINS, A.M.C, TOYAMA, M.H, HAVT, A, et al. Determination of *Crotalus durissus cascavella* venom components that induce renal toxicity in isolated rat kidneys. *Toxicon*. 40 (8): 1165-1171, 2002.
- MARTINS, A.M; MONTEIRO, H.S; JUNIOR, E.O; MENEZES, D.B. & FONTELES, M.C. Effects of *Crotalus durissus cascavella* venom in the isolated rat kidney. *Toxicon*. 36 (10): 1441-1450, 1998.
- MATSUI, T., FUJIMURA, Y. & TITANI, K. Snake venom proteases affecting hemostasis and thrombosis. *Biochimica et Biophysica Acta* 1477: 146-156, 2000.
- McLANE, M.A.; MARCINKIEWICZ, C. VIJAY-KUMAR, S. WIERZBICKA-PATYNOWSKI, I.; NIEWAROWSKI, S. Viper venom disintegrins and related molecules. *Proc Soc Exp Biol Med*. 219 (2):109-19, 1998.
- McMULLEN, B.A.; FUJIKAWA, K. & KISIEL, W. Primary structure of a protein C activator from *Agkistrodon contortrix contortrix* venom. *Biochemistry* 28, 674-679, 1989.
- MITRAKUL C. Effect of five snake venoms on coagulation, fibrinolysis and platelet aggregation. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. 10(2): 266-75, 1979.
- MOUNIER, C.; VARGAFTIG, B. B.; FRANKEN, P. A.; VERHEIJ, H. M.; BON, C & TOUQUI, L. Platelet secretory phospholipase A₂ fails to induce rabbit platelet activation and to release arachidonic acid in contrast with venom phospholipases A₂. *Biochim. Biophys. Acta*. 1214: 88-96.1994.
- NAHAS, L; KAMIGUTI, A.S & BARROS, M.A.R. Thrombin-like and factor-X activator components of *Bothrops* snake venoms. *Thromb. Haemst.* 41: 314-328, 1979.
- NAKAZONE, A.K. Aspectos imunoquímicos da crotoxina e suas subunidades. São Paulo, 1978, 125 p. Tese de doutorado, Instituto de Química, USP.
- NIEWIAROWSKI, S; MCLANE, M.A; KLOCZEWIAK, M; STEWART, G.J. Disintegrins and other naturally occurring antagonists of platelet fibrinogen receptors. *Semin Hematol*. Oct; 31(4):289-300, 1994.

- OLIVEIRA, D.G; TOYAMA, M.H; MARTINS, A.M.C; MARAGONI, S; CAMARA, P.R; ANTUNES, E; DE NUCCI, G.; BERIAM, L.O.S.; FONTELES, M.C. & MONTEIRO, H.S.A. Structural and Biological characterization of crotapotin isoform isolated from the *Crotalus durissus cascavella* venom. *Toxicon* 42 (1): 53-62, 2003.
- OZEKI Y, MATSUI T, HAMAKO J, SUZUKI M, FUJIMURA Y, YOSHIDA E, NISHIDA S, TITANI K. C-type galactoside-binding lectin from *Bothrops jararaca* venom: comparison of its structure and function with those of botrocetin. *Arch Biochem Biophys.* 308 (1): 306-10, 1994.
- OUYANG, C., TENG, T.F. & HUANG, T. Characterization of snake venom components acting on blood coagulation and platelet functions. *Toxicon* 30: 945-966, 1992.
- OUYANG, C.; HWANG, L.J & HUANG, T.F. α -Fibrinogenase from *Agkistrodon rhodostoma* (Malayan pit viper) snake venom. *Toxicon.* 21: 25-33, 1983.
- OUYANG C. & TENG C.M. The action mechanism of the purified platelet aggregation principle of *Trimeresurus mucrosquamatus* venom. *Thromb Haemost.* 25, 41(3):475–490, 1979.
- PAWELEK, P.D; CHEAH, J; COULOMBE, R; MACHEROUX, P; GHISLA, S; VRIELINK, A. The structure of L-amino acid oxidase reveals the substrate trajectory into an enantiomerically conserved active site. *EMBO J.* Aug 15; 19(16):4204-15, 2000.
- PENG M.; LU, W; KIRBY, E.P. Alboaggregin-B: a new platelet agonist that binds to platelet membrane glycoprotein Ib. *Biochemistry.* 10; 30 (49):11529-36, 1991.
- PIRKLE, H. Thrombin-like enzyme from snake venoms: an updated inventory, *Thromb. Haemost.* 79: 675-683, 1998.
- PRADO-FRANCESCHI, J. & VITAL BRAZIL, O. Convulxin, a new toxin from the venom of the South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*). *Toxicon* 19: 661-666, 1981.
- RADOMSKI, M.W. & MONCADA, S. An improved method for a washing human platelets with prostacyclin. *Thromb. Res.* 30: 383-389, 1983
- RAW, I., ROCHA, M.C; ESTEVES, M.I. & KAMIGUTI, A.S. Isolation and characterization of a thrombin like enzyme from the venom of *Crotalus durissus terrificus*. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 19 (3):333-338, 1986.

- RÜBSAMEN, K.; BREITHAUPT, H.; HABERMANN, E. Biochemistry and pharmacology of the crotoxin complex. I. Subfraction and recombination of the crotoxin complex. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 270: 274-288, 1971.
- RYDEN, L., GABEL, D. & EAKER, D. A model of tree-dimensional structure of snake venom neurotoxins based on chemical evidence. Int. J. Peptide Protein Res. 5: 261, 1973.
- SAKURAI, Y.; TAKATSUKA, H.; YOSHIOKA, A.; MATSUI, T.; SUZUKI, M.; TITANI, K.; FUJIMURA, Y. Inhibition of human platelet aggregation by L-amino acid oxidase purified from *Naja naja kaouthia* venom. Toxicon. Dec; 39(12):1827-3, 2001.
- SAMEJIMA, Y., AOKI, Y., MEBS, D. Amino acids sequence of a myotoxin from venom of the eastern diamondback rattlesnake (*Crotalus adamanteus*). Toxicon 29, 461-468, 1987.
- SANO-MARTINS, I.S. & DAIMON, T. Electron microscopic cytochemistry on the distribution of wheat germ agglutinin receptor on the platelet plasma membrane after treatment with convulxin isolated from *Crotalus durissus terrificus* venom. Toxicon. Feb;30(2):141-50,1992.
- SCHENBERG, S. Geographical pattern of crotoxin distribution in the same rattlesnake subspecies. Science 129, 1361-1363, 1959.
- SCOTT, B.T., SIMMERMAN, H.K., COLLINS, J.H., NADAL-GINARD, B. E. JONES, L.R. Complete amino acid sequence of canine cardiac caldesmon deduced by cDNA cloning. J. Biol. Chem. 263(18), 8958-8964, 1988.
- SEKIYA, F.; ATODA, H.; MORITA, T. Isolation and characterization of an anticoagulant protein homologous to botrocetin from the venom of *Bothrops jararaca*. Biochemistry. 13; 32 (27): 6892-7, 1993.
- SELISTRE, H.S. & GIGLIO, J.R. Isolation and characterization of a thrombin like enzyme from the venom of the snake *Bothrops insularis* (jararaca ilhoa). Toxicon 25, 1135-1144, 1987
- SERRANO, S.M.T.; MENTELE, R. SAMPAIO, C.A.M. & FINK, E. Purification, characterization and amino acid sequence of a serine proteinase, PA-BJ, with platelet-

- aggregating activity from the venom of *Bothrops jararaca*. *Biochemistry* 34, 7186-7193, 1995.
- SLOTTA, K. H. & FRAENKEL-CONRAT, H. L. Schlangengifte, III: Mitteilung
Reinigung und Krystallization des Klapperschlangengiftes. *Ber. Dich. Chem. Ges.*
71: 1076-1081.1938.
- SMOLKA, M.B; MARANGONI, S; OLIVEIRA, B; NOVELLO, J.C. Purification and
partial characterization of a thrombin-like enzyme, balterobin, from the venom of
Bothrops alternatus. *Toxicon*. Jul; 36(7):1059-63, 1998.
- STABELI, R.G., MARCUSSI, S., CARLOS, G.B., PIETRO, R.C., SELISTRE-DE-
ARAUJO, H.S., GIGLIO, J.R., OLIVEIRA, E.B. & SOARES, A.M. Platelet
aggregation and antibacterial effects of an l-amino acid oxidase purified from
Bothrops alternatus snake venom. *Bioorg. Med. Chem.*, 12(11), 2881-2886, 2004.
- STOCKER.K; FISCHERA H; MEIER.J; M. BROGLI & L. SVENDSEN. L.
Characterization of the protein C activator protac[®] from the venom of the southern
copperhead (*Agkistrodon contortrix*) snake. *Toxicon*, 25, (3): 239-252, 1987.
- SUHR, S.M. & KIN, D.S. Identification of the snake venom substance that induces
apoptosis. *Bioch. Biophys. Res. Com.* 224(1): 134 – 139, 1996.
- TAKAGI, J; SEKYIA, F; KASAHARA, K; INADA, Y. & SAITO, Y. Venom from
southern copperhead sanke (*Agkistrodon contortrix contortrix*). II. A unique
phospholipase A₂ that induces platelet aggregation. *Toxicon*. 26: 199, 1988.
- TANS G. & ROSING, J. Snake venom activators of factor X: an overview. *Haemostasis*
31(3-6), 225-233, 2001.
- TEMPORE, A.G; ANDRADE Jr.; H.F., SPENCER, P.J., LOURENÇO, C.O., ROGERO,
J.R., & NASCIMENTO, N. *Bothrops moojeni* venom kills *Leishmania* ssp. with
hydrogen peroxide by its L-amino acid oxidase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*
280: 620-624, 2001.
- TENG, C.M. & KO, F.N. Comparison of the platelet aggregation induced by three
thrombin-like enzymes of snake venoms and thrombin. *Thromb. Haemost.* 59: 304-
309, 1988.
- TOYAMA, M.H.; OLIVEIRA, D.G.; BERIAM, L.O.S.; NOVELLO, J.C.; RODRIGUES-
SIMIONI, L. & MARAGONI, S. Structural, enzymatic and biological properties of

- new PLA₂ isoforms from *Crotalus durissus terrificus* venom. *Toxicon*, 41(8): 1033-1045, 2003.
- TOYAMA, M. H.; CARNEIRO, E. M.; MARAGONI, S.; BARBOSA, R.L.; CORSO, G.; BOSCHERO, A.C. Biochemical characterization of two crotamine isoforms isolated by a single step RP-HPLC from *Crotalus durissus terrificus* (South American rattlesnake) venom and their action on insulin secretion by pancreatic islets. *Biochimica et Biophysica Acta* 1474: 56-60, 2000.
- TORII, S, NAITO, M. & TSURUO, T. Apoxin I, a novel apoptosis-inducing factor with L-amino acid oxidase activity purified from Western diamondback rattlesnake venom. *Journal of Biological Chemistry* 272(14): 9539-9542, 1997.
- USAMI, Y; FUJIMURA, Y; SUZUKI, M; OZEKI, Y; NISHIO, K; FUKUI, H; TITANI, K. Primary structure of two-chain botrocetin, a von Willebrand factor modulator purified from the venom of *Bothrops jararaca*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Feb 1;90(3):928-32, 1993.
- VARGAFTIG, B.B., PRADO-FRANCESCHI, J., CHIGNARD, M., LEFORT, J. & MARLAS, G. Activation of guinea-pig platelets induced by convulxin, a substance extracted from the venom of *Crotalus durissus cascavella*. *Eur J Pharmacol*. 68 (4), 451-464, 1980.
- VITAL BRAZIL, O. Peçonhas. In. *Farmacodinâmica* (Corbett, C. E., 6 ed). Guanabara-Koogan, Rio de Janeiro. 1044-1074, 1982.
- VITAL BRAZIL, O. Pharmacology of crystalline crotoxin. II Neuromuscular blocking action. *Mem. Inst. Butantan. Simp. Internac.* 33: 981-992, 1966.
- VITAL BRAZIL, O. & EXCELL, B. J. Action of crotoxin and crotactin from the venom of *Crotalus durissus terrificus* (South American rattlesnake) on the frog neuromuscular junction. *J. Physiol.* 212: 34-35, 1971.
- YANG, C.C. Chemistry and evolution of toxins in snake venoms. *Toxicon* 12, 1, 1974.
- WELLNER, D. & MEISTER, A. Studies on the mechanism of action of L-amino acid oxidase. *J. Biol. Chem.* 236, 2357-2364, 1961.
- ZHANG, Y; GAO, R; LEE, W.H; ZHU, S.W; XIONG, Y.L. & WANG, W.Y. Characterization of a fibrinogen-clotting enzyme from *Trimerurus stejnegeri* venom and comparative study with other venom proteases. *Toxicon*. 36 (1): 131-142, 1998