

UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA E
RECURSOS NATURAIS

JOÃO PAULO GONÇALVES CATUNDA

**ANTIGENICIDADE E ATIVIDADES BIOLÓGICAS DO VENENO
HEMORRÁGICO DA SERPENTE *CROTALUS DURISSUS*
RURUIMA, (Hoge 1965), APÓS INDUÇÃO DA PROTEÓLISE DAS
TOXINAS “*IN VITRO*”**

MANAUS
2010

JOÃO PAULO GONÇALVES CATUNDA

**ANTIGENICIDADE E ATIVIDADES BIOLÓGICAS DO VENENO
HEMORRÁGICO DA SERPENTE *CROTALUS DURISSUS*
RURUIMA, (Hoge 1965), APÓS INDUÇÃO DA PROTEÓLISE DAS
TOXINAS “*IN VITRO*”**

Dissertação de Mestrado em Biotecnologia
e Recursos Naturais para obtenção do título
de Mestre na Universidade do Estado do
Amazonas.

Orientador: Prof^o. Dr. Jorge Luis López-Lozano

MANAUS
2010

RESUMO

Atualmente mais de duzentas espécies de serpentes venenosas já foram identificadas, elas são classificadas em quatro principais famílias: Hydrophiidae; Elapide, Viperidea e Crotalidae, o gênero *crotalus* apresenta maior índice de letalidade (1,87%), devido à neurotoxicidade e a insuficiência renal aguda que é a mais séria complicação do envenenamento crotálico humano o veneno presente na serpente *Crotalus durissus ruruima* foi introduzido em camundongos para se avaliar a caracterização biológica e antigenicidade destes. Os procedimentos realizados foram a caracterização do perfil molecular dos venenos *in natura* e proteolizado, imunização dos camundongos com antígenos T0 e T6, testes de neutralização da letalidade do veneno utilizando plasma hiperimune experimental, análise imunológica para verificação da reação antígeno-anticorpo e testes estatístico. Deste experimento observou-se entre outros resultados, que o perfil molecular apresentou variações na detecção das bandas e também na análise quantitativas das proteínas, no zimograma sobre o fibrinogênio e a gelatina a intensidade das bandas apresentou variações mas amostras proteolizadas quando comparadas com o veneno *in natura*, o soro hiperimune experimental T6 obteve melhor resposta neutralizante quando comparado com soro T0, no teste da letalidade camundongos apresentam maior resistência quando receberam soro veneno proteolizado proteolisado levando mais tempo para chegar a óbito, os camundongos imunizados com T0 não resistiram a dose desafio de 5 DL₅₀ vindo a óbito, já os camundongos imunizado com T6 obtiveram uma boa resposta imune, não apresentando nenhum dos sintomas causados pelo veneno e sobreviveram a dose desafio de 5 DL₅₀.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Componentes da resposta imune.....22

Tabela 2 Dose desafio 5 DL₅₀ 10 µg/camundongo.....50

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Dispersão do gênero <i>Crotalus</i>	14
Figura 2 Atividade Miotóxica sobre as células renais.....	15
Figura 3 Atividade hemorrágica.....	16
Figura 4 Diferentes classes de metaloproteases.....	17
Figura 5 Modelo estrutural da Crotoxina 3D.....	19
Figura 6 Efeitos tóxicos causados gênero <i>Crotalus</i>	21
Figura 7 Bloqueio Pré-sináptico.....	23
Figura 8 Perfil eletroforético SDS-PAGE em condições não redutoras....	41
Figura 9 Perfil eletroforético SDS-PAGE em condições redutoras.....	42
Figura 10 Perfil eletroforético SDS-PAGE Gel corado com Nitrato de prata.....	43
Figura 11 Atividade fosfolipásica.....	48
Figura 12 Atividade hemorrágica.....	52
Figura 13 Zimograma sobre o fibrinogênio bovino	54
Figura 14 Zimograma da atividade sobre a gelatina.....	55
Figura 15 Imunoperfis do veneno de <i>Crotalus durissus ruruima</i>	54
Figura 16 Perfil eletroforético Tris-tricina SDS-PAGE	54

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 Tempo de início da atividade coagulante sobre o Fibrinogênio bovino.....	45
Gráfico 2 Tempo de início da atividade coagulante sobre o plasma humano.....	46
Gráfico 3 Veneno <i>in natura</i> , soros hiperimunes T0, T6 , fibrinogênio bovino	47
Gráfico 4 Veneno <i>in natura</i> , soros hiperimunes T0, T6 , plasma humano	48
Gráfico 5 Média dos halo em (mm) da atividade fosfolipásica A ₂	50
Gráfico 6 Atividade hemorrágica VS Proteólise, 50 µg veneno.....	56

LISTA DE ABREVIATURAS

AgNO₃ – nitrato de prata

Ca⁺ – íon cálcio

Cl²⁺ – íon potássio

CTX - crotoxina

DL 50 – dose letal 50%

EDTA – Ácido Etilenodiamino tetra-acético

K⁺ – íon potássio

kDa – kilodaltons

L – litro

M – molar

mA – miliamperes

mg – miligrama

mL – mililitro

mm – milímetro

Na⁺ – íon sódio

PBS – Tampão fosfato salino (Phosphate Buffer Saline)

pH – potencial Hidrogeniônico

pI – Ponto isoelétrico

PMS – Fenil metano sulfonil fluoridro

SDS – Sódio dodecil sulfato

SSF – Solução salina fisiológica

TBS – Tris-Glicina-Metanol

TBS-T – Tris-Glicina-Metanol-Tween

V – Voltz

W - Watts

µg – micrograma

μL – microlitro

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	11
1.1 OFIDISMO	11
1.2 VENENO CROTÁLICO.....	13
2. Resposta Imune	20
2.1 Imunidade Inata	20
2.2 Resposta Adquirida.....	20
2.3 Imunidade humoral	21
2.4 Imunidade mediada por células	22
3. PROTEÍNAS E SEU ESTADO CONFORMACIONAL	22
4. ATIVIDADE BIOLÓGICA APÓS PROCESSO DE PROTEASES NO ESTADO CONFORMACIONAL DAS PROTEÍNAS DO VENENO DE SERPENTES.	23
5. SOROTERAPIA	24
6. JUSTIFICATIVA.....	25
7. OBJETIVOS	26
7.1 OBJETIVO GERAL.....	27
7.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	27
8. MATERIAIS E MÉTODOS	28
8.1 VENENO DA SERPENTE	29
8.2 INDUÇÃO DE PROTEÓLISE <i>IN VITRO</i>	29
8.3 ANIMAIS DE LABORATÓRIO.....	29
9. CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL MOLECULAR.....	30
9.1 ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA SDS-PAGE.....	
9.2 ELETROFORESE Tris-Tricina-SDS-PAGE	31
10. AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS DO VENENO APÓS PROCESSO PROTEOLÍTICO	31
10.1 ATIVIDADE COAGULANTE PLASMA E O FIBRINOGENÍO	31
10.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE FOSFOLIPÁSICA A ₂	32
10.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE HEMORRÁGICA.....	33
10.4 ZIMOGRAMA DA ATIVIDADE PROTEOLÍTICA SOBRE FIBRINOGENÍO E GELATINA	33
10.5 AVALIAÇÃO DA LETALIDADE de 5 DL ₅₀ (10 µg) DAS AMOSTRAS DO VENENO <i>IN NATURA</i> E PROTEOLIZADO	34
10.6 IMUNIZAÇÃO	34
10.7 AVALIAÇÃO DA NEUTRALIZAÇÃO DA LETALIDADE DE 5 DL ₅₀	35
10.8 AVALIAÇÃO DA NEUTRALIZAÇÃO DA ATIVIDADE COAGULANTE SOBRE O PLASMA E O FIBRINOGENÍO.....	35
11. ANÁLISE IMUNOQUÍMICO	36
11.1 “WESTERN BLOTTING”	36
11.2 TESTES ESTATÍSTICOS	37

12. RESULTADOS.....	38
12.1 ELETROFORESE SDS-PAGE	39
12.2 ATIVIDADE COAGULANTE SOBRE FIBRINOGENIO E PLASMA.....	43
12.2.1 ATIVIDADE FOSFOLIPÁSICA APÓS PROCESSO DE PROTEÓLISE	45
12.2.2 ATIVIDADE HEMORRÁGICA APÓS PROCESSO DE PROTEÓLISE	47
12.2.3 ZIMOGRAMA DA ATIVIDADE SOBRE FIBRINOGENIO/ GELATINA.....	48
12.3 NEUTRALIZAÇÃO PELOS SOROS HIPERIMUNES EXPERIMENTAIS DAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS DO VENENO <i>IN NATURA</i>	51
12.3.1 NEUTRALIZAÇÃO DA ATIVIDADE SOBRE FIBRINOGENIO E PLASMA.	51
12.3.2 NEUTRALIZAÇÃO DA LETALIDADE	53
13. ANÁLISE IMUNOQUÍMICO.....	55
13.1 “WESTERN BLOTTING”	55
14. DISCUSSÃO	57
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	64

1. INTRODUÇÃO

1.1 OFIDISMO

Atualmente mais de duzentas espécies de serpentes venenosas já foram identificadas, elas são classificadas em quatro principais famílias: Hydrophiidae; Elapide, Viperidea e Crotalidae (MATSUI *et al.*, 2000). O aparato produtor de veneno nas espécies destas famílias é formado por glândulas exócrinas modificadas que produzem o veneno tóxico. O ataque dessas espécies de serpentes com a consequente inoculação de tal veneno na vítima pode ressaltar em severos perigosos danos fisiológicos, podendo, em alguns casos levar a óbito.

Acidentes ofídicos envolvendo o gênero *Crotalus* são geralmente sérios e frequentemente fatais na ausência de tratamento adequado e específico (BARRAVIERA *et al.*, 1998). Apresenta maior índice de letalidade (1,87%), devido à neurotoxicidade e a insuficiência renal aguda que é a mais séria complicação do envenenamento crotálico humano (CUPO *et al.*, 1998).

Em algumas localidades do país este percentual de acidentes pode ser maior, por exemplo, no Estado de Roraima, no período de Junho de 1986 a Dezembro de 1987 os acidentes envolvendo o gênero *Crotalus* representaram 30% dos acidentes ofídicos (RESENDE *et al.*, 1989). E entre os anos de 1992 a 1998, estudos epidemiológicos constataram uma porcentagem de 13,4% dos acidentes ofídicos atribuídos a este gênero na mesma região (NASCIMENTO, 2000).

Crotalus durissus é a espécie de maior distribuição geográfica, abrangendo desde o México até a Argentina, possuindo várias subespécies. Tem-se suposto que essa espécie tenha se originado na América do Norte com subsequente dispersão nas Américas Central e do Sul (CAMPBELL; LAMAR, 1989).

Vanzolini (1986) sugere que o gênero *Crotalus* entrou na América do Sul através da América Central durante o Plioceno, e que sua dispersão tenha

ocorrido em períodos secos, encontrando-se hoje tipicamente distribuídos nas formações abertas, os lavrados.

Segundo QUIJADA-MASCARENÃS *et al.*, (2007), o gênero *Crotalus* dispersou na América do Sul no Pleistoceno pelo corredor Amazônico central de florestas secas e savanas que dividia a Floresta Tropical Amazônica em duas porções ocidentais e orientais.



Figura 1 Dispersão do gênero *Crotalus* pela América do Sul pelo corredor amazônico, MASCARENÃS *et al.*, (2007)

1.2 VENENO CROTÁLICO

O veneno crotálico é uma mistura complexa de proteínas, peptídeos, carboidratos, lipídios e íons metálicos, com proteínas e peptídeos representando cerca de 90% do veneno seco (BIERBER, 1979). A função primária do veneno é imobilizar e matar a presa (KARLSSON, 1979).

Acidentes ofídicos causados por serpentes do gênero *Crotalus* pode apresentar quadros clínicos bem distintos. O veneno da maioria das espécies encontradas nas Américas do Norte e Central causam, em geral, manifestações locais, caracterizadas por edema, hemorragia e necrose além de efeitos sistêmicos como: hemorragia, desfibrinogenação e hipotensão (MINTON; WIENSTEIN, 1986; OWNBY; GEREN, 1987; ADAME *et al.*, 1990; RUSSEL., 1996). Essas manifestações clínicas são semelhantes aos observados nos acidentes botropicos.

O veneno das serpentes da América do Sul possui principalmente três atividades com importância clínica conhecida: Neurotóxica, através de ação periférica, em placa motora; miotóxica (figura 2) sistêmica, coagulante, através de ação da trombina-símili. O quadro clínico compõe-se basicamente de manifestações locais discretas e manifestações sistêmicas que podem ser graves. São comuns a ptose palpebral e a diminuição da expressão facial, (figura 3), caracterizando-se pela boca entre aberta e o enrugamento da testa na tentativa de abrir os olhos, ocorre também à mialgia generalizada e rhabdomiólise muscular esquelética com coloração marrom escura da urina em razão da miólise com liberação maciça de mioglobina (JORGE; RIBEIRO, 1992).

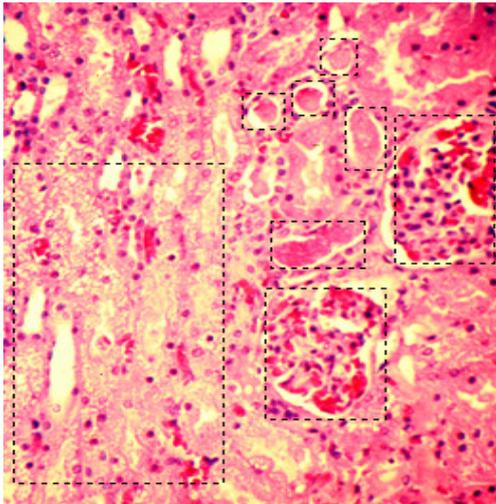


Figura 2 Atividade Miotóxica sobre as células renais



Figura 3 face miastêmica

Segundo Muniz (2002) o veneno de *Crotalus durissus ruruima* coletados de diferentes áreas do Estado de Roraima apresenta diferenças qualitativas e quantitativas nas atividades biológicas que estão relacionadas com a presença do veneno, de toxinas hemorrágicas e/ou da crotamina, classificados os venenos como: veneno hemorrágico e crotamina positivo, hemorrágico e crotamina negativa, não hemorrágico e crotamina negativo.



Figura 4 Atividade hemorrágica

As metaloproteases dependentes de zinco são as responsáveis pelas fortes hemorragias característica de acidentes envolvendo a serpente norte América *Crotalus atrox*.

As metaloproteinasas dos venenos dos viperideos são divididas em quatro classes baseadas nas diferenças estruturais dessas moléculas. A classe PI compreende apenas o domínio das metaloproteases, a classe PII e representada além do domínio da metalonoprotease um domínio desintegrina, a classe PIII possui os domínios descritos acima e também um domínio rico em cisteína e a classe PIV além do domínio da classe PIII apresenta um domínio adicional semelhante a lectina (FOX; SERRANO, 2005, 2008, 2009).

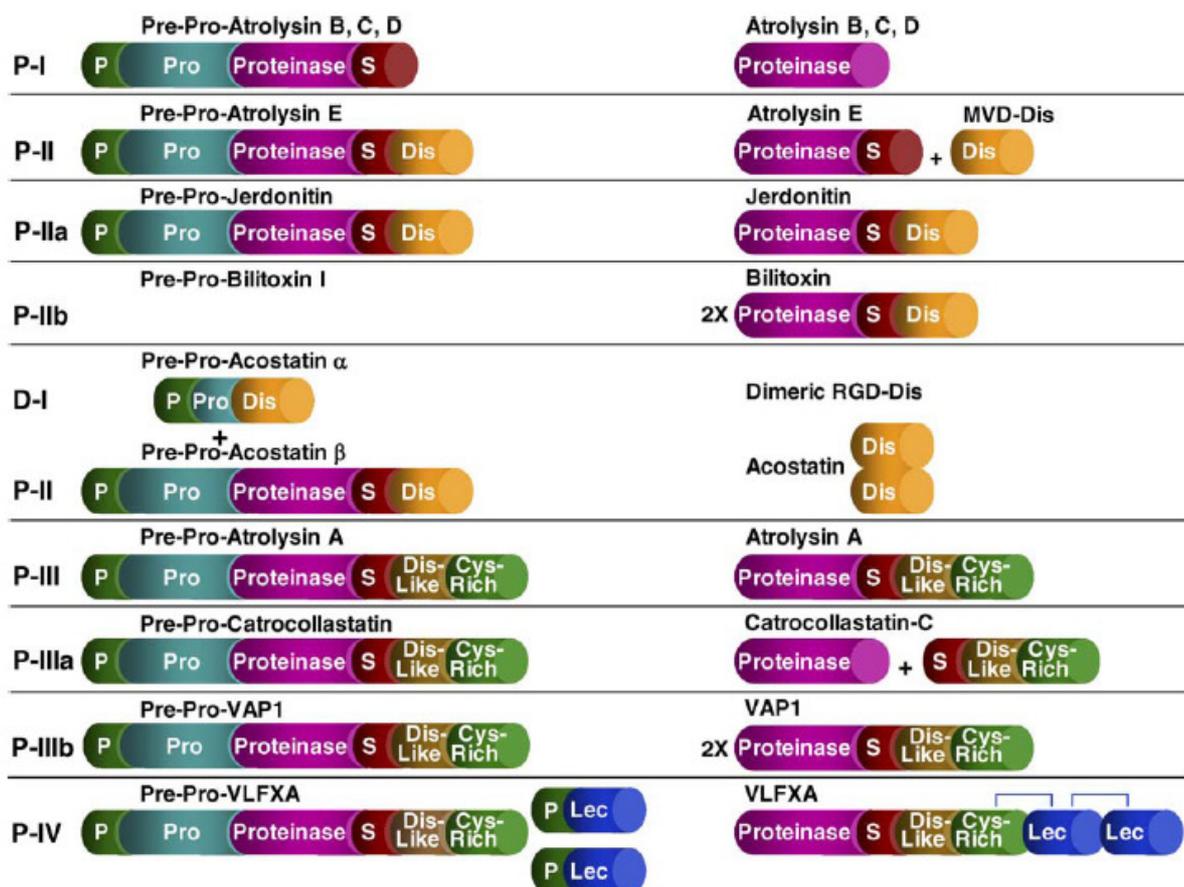


Figura 5 Diferentes classes de metaloproteases pertencentes aos Viperideos (Fox e Serrano, 2005)

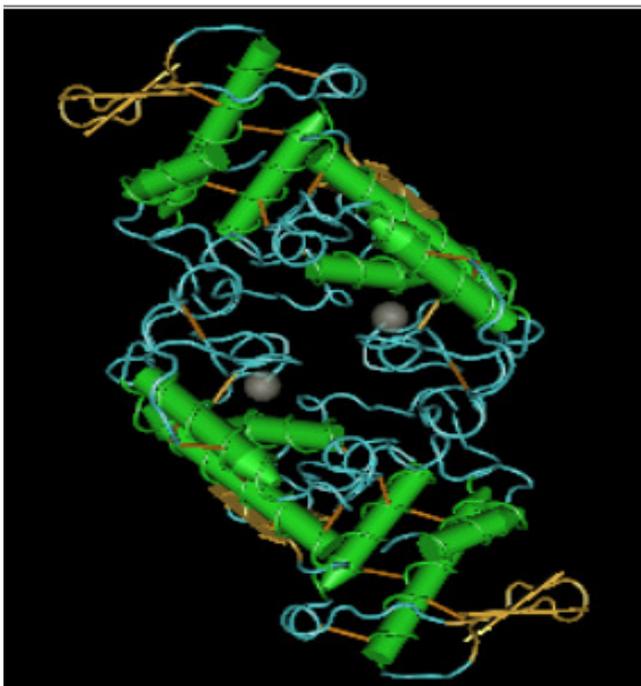
Alterações da coagulação sanguínea tais como aumento do tempo de coagulação, têm sido observadas em aproximadamente 40% dos indivíduos acidentados por *Crotalus durissus terrificus*. Esta manifestação ocorre devido ao consumo de fibrinogênio, possivelmente causado pela ação da enzima trombina-símili isolada deste veneno (RAW *et al.*, 1986).

A convulxina é uma toxina do veneno de *Crotalus durissus terrificus*, que foi isolada e caracterizada farmacologicamente em 1970 por (PRADO-FRANCESCHI, J.; VITAL BRASIL., 1981). Tem sido isolada e caracterizada uma convulxina de *Crotalus durissus collilineatus*, que se apresenta composta por duas cadeias polipeptídicas, sendo capaz de estimular *in vitro* a secreção de insulina nas ilhotas de langerhans (TOYAMA, *et al.*, 2000).

A Giroxina é uma glicoserinoprotease farmacologicamente pouco conhecida, produz uma síndrome convulsiva, em condições experimentais em camundongos. Seu isolamento foi descrito por Bairro, A. (1961), Barrabin *et al.*, (1978) e Alexander *et al.*, (1988).

A crotamina é uma proteína de caráter básico, caracterizada pela primeira vez por Gonçalves e Vieira (1950). Esta toxina tem sido encontrada no veneno das serpentes do gênero *Crotalus* em certas regiões do país como: Ceará, Minas Gerais, São Paulo e Paraná (SCHENBERG, 1959), Roraima (LOPÉZ- LOZANO *et al.*, 1996). Apresenta ponto isoelétrico de 10,3; massa molecular de 4,8 KDa; e três pontes de dissulfeto (Gonçalves, 1950).

É uma molécula bastante resistente ao calor chegando a suportar até 70 °C por 18 horas sem perder sua propriedade tóxica. A crotamina produz um bloqueio na junção neuromuscular e também uma miotoxidade moderada. Na atualidade, várias isoformas têm sido isoladas (TOYAMA, *et al.*, 2000; 2003).



Crotoxina

Figura 6 Modelo estrutural da Crotoxina 3D fonte:NCBI

A crotoxina é a principal neurotoxina do veneno de *Crotalus durissus terrificus* e corresponde a $\approx 50\%$ do peso seco do veneno total, e foi a primeira neurotoxina a ser purificada e analisada em 1938, por Slotta e Fraenkel-Conrat.

Esta toxina é responsável pela alta toxicidade do veneno, atuando nas terminações nervosas e respondendo pela paralisia motora e respiratória em condições experimentais. Essa proteína é um heterodímero composto por duas subunidades: uma Fosfolipase A₂ (PLA₂) componente básico com uma massa molecular de 14,5 kDa; e um componente denominado crotapotina, componente ácido com massa molecular de 9 kDa (BREITHAUPT, 1976; BON *et al.*, 1979).

Quando um componente da crotoxina é separado do outro, seu efeito tóxico apresenta-se anulado, com uma estimativa de dez vezes menor que a sua forma associada (Slotta; Fraenkel-Conrat 1938; Chang & Lee 1977; Hawgood & Santana de Sá S. 1979). A fosfolipase A₂ (PLA₂) da crotoxina é responsável pelo desencadeamento dos efeitos farmacológicos ocasionados pelo complexo crotoxina (Hendon; Fraenkel-Conrat 1971).

Segundo Breithaupt (1976) e Bon *et al.* (1979), do ponto de vista farmacológico e fisiológico a crotoxina é um bloqueador pré-sináptico, mais experimentalmente foi demonstrado que em altas concentrações pode também agir como bloqueador pós-sináptico (Hawgood; Santana de Sá 1979; Bon *et al.*, 1979). De acordo com Fraure; Bon (1988), a crotoxina apresenta-se em várias isoformas aparentemente resultantes de um único gene ou de modificações pós-traducionais, que ocorrem sobre uma única forma precursora, levando à formação de crotapotina (Bouchier *et al.*, 1991; Fraure *et al.*, 1991); ou pela expressão de diferentes RNAs mensageiros (isolados de um mesmo espécime), levando à formação das isoformas de PLA₂ (FAURE *et al.*, 1994)

A crotapotina foi primeiramente descrita como uma molécula “chaperona” das fosfolipases A₂ de *Crotalus durissus terrificus*, que potencializa a toxicidade da fosfolipase A₂ (PLA₂), sendo interpretada como um fenômeno farmacocinético, sugerindo que o componente ácido possa proteger a fosfolipase A₂ da inativação por ligação a sítios de baixa afinidade na junção neuromuscular, no entanto, a crotapotina diminui a atividade enzimática da PLA₂. (LAURE, C.J. 1990; GOPALAKRISHNAKONE *et al.*, 1984; BON, 1982; LANDUCCI *et al.*, 2000).

Na (figuras 7), esta representado de forma resumida, os principais efeitos toxicos do veneno crotálico.

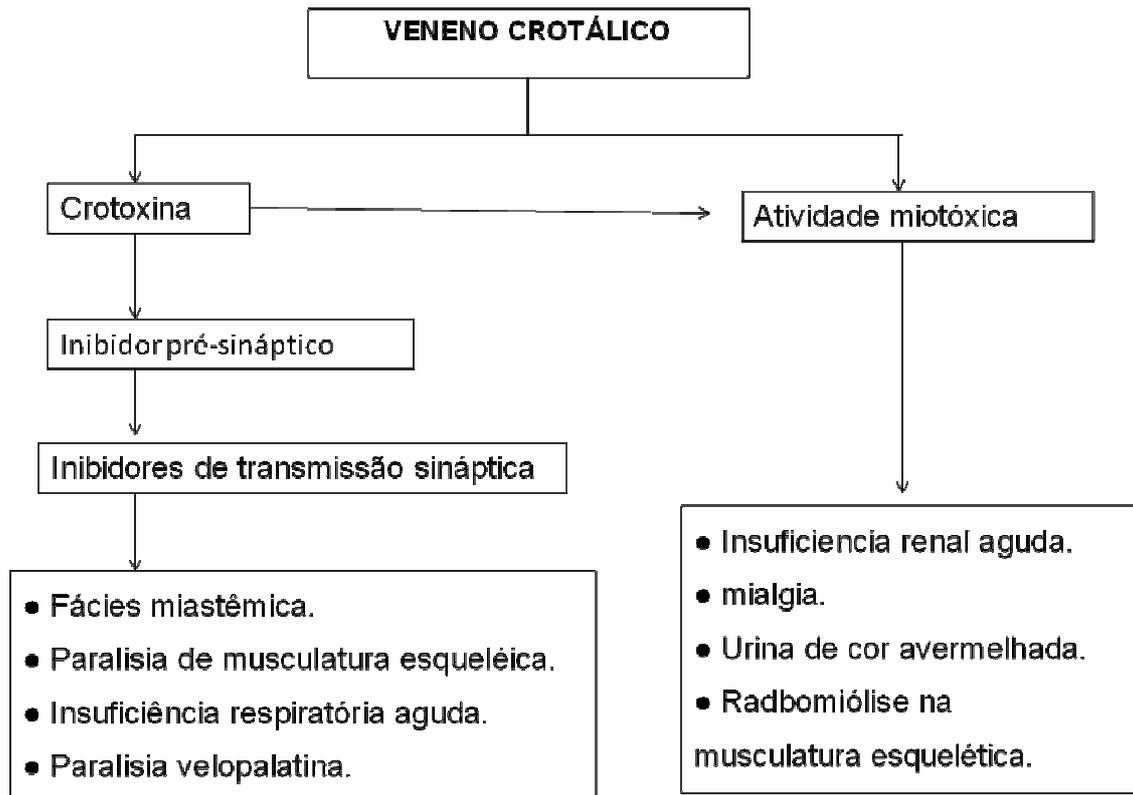


Figura 7. Efeitos tóxicos causados pelo veneno das serpentes do gênero *crotalus* da América do Sul

Mediante o efeito do veneno sobre o sistema imune a resposta inflamatória. A crotoxina tem efeito inibitório na resposta imune humoral por interferir com a síntese de anticorpos imunoglobulina IgG (CARDOSO; MOTA., 1997), e induz na alteração acentuada na distribuição de leucócitos, caracterizado por uma declínio no número de linfócitos e monócitos (CARDOSO *et al.*, 2001).

Garcia *et al.* (2003) mostrou que a crotopotina uma subunidade da crotoxina inibe a liberação de linfócitos T em resposta a uma Concanavalina A. Por outro lado, a subunidade PLA₂ isolada de *Crotalus durissus terrificus*, *Crotalus durissus cascavella* e *Crotalus durissus collilineatus*, do veneno é capaz de causar inflamação, aumentando a permeabilidade vascular em pele de ratos. Este efeito é mediado em células pela ativação das células sensoriais. (CAMARA *et al.*, 2003).

2. Resposta Imune

Em todos os organismos multicelulares existem mecanismos para defender o hospedeiro contra invasores estranhos. Esses mecanismos constituem a imunidade inata. Os mecanismos de defesa mais especializados constituem a imunidade adquirida (ABBAS *et al.*, 2006).

2.1 Imunidade Inata

Consiste de mecanismos que já existem antes da infecção, que são capazes de rápidas respostas aos microrganismos e que reagem essencialmente do mesmo modo às infecções repetidas. Os mecanismos da imunidade inata proporcionam a defesa inicial contra as infecções. (ABBAS *et al.*, 2006)

Principais componentes da imunidade inata:

Tabela 1. Componentes da resposta inata

Barreira física e química (epitélio e substâncias antimicrobianas produzidas nas superfícies epiteliais)
Células fagocíticas (macrófagos e neutrófilos) e células matadoras naturais (NK [Natural Killer])
Proteínas do sangue, membros do sistema complemento e outros mediadores de inflamação
Proteínas citocinas que regulam e coordenam muitas atividades das células da imunidade inata.

2.2 Resposta Adquirida

Podemos entender por imunidade adquirida, a atuação de um grande conjunto de elementos que permite uma resposta imune específica a um determinado antígeno, utilizando-se agora linfócitos T e B portadores de receptores com regiões variáveis, capazes de reconhecer e montar uma resposta complexa, muitas vezes envolvendo a produção de anticorpos e a ativação de células efetoras e com funções regulatórias (JANEWAY *et al.*, 2002).

As células B são capazes de reconhecer uma grande variedade de antígenos, desde peptídeos, proteínas, ácidos nucleicos, lipídeos, polissacarídeos até pequenos produtos químicos, essa propriedade não é compartilhada pelas células T citotóxica que reconhecem apenas quando o antígeno (epítomos lineares) está unido a uma molécula do complexo MHC do próprio indivíduo, expressa na superfície da célula apresentadora de antígeno (APC) (MCDEVITT, 2000). Além disso, o reconhecimento do antígeno pelas células T $CD4^+$ ou *helper* ou pelas $CD8^+$, dependendo do alelo de MHC ao qual o peptídeo está acoplado, é o primeiro sinal indispensável para a ativação de linfócitos T. O segundo sinal é dado pela ligação de moléculas co-estimulatórias presentes tanto nos linfócitos, como nas APCs. As moléculas mais conhecidas são CD28 e CD152 (CTLA4) expressas nos linfócitos, que se ligam às moléculas CD80 e C86 presentes nas APCs (LENSCHOW *et al.*, 1996). A inibição da expressão dessas moléculas suprime a resposta dos linfócitos T, mecanismo conhecido como energia (SCHWARTZ *et al.*, 2003).

Existem dois tipos de resposta imune adquirida: Imunidade humoral e imunidade mediada por células que são realizadas por diferentes componentes do sistema imune (JANEWAY *et al.*, 2002).

2.3 Imunidade humoral

É realizada por moléculas, chamadas de anticorpos, que são produzidos pelos linfócitos B. Os anticorpos reconhecem especificamente os antígenos, dessa forma neutralizam a infecciosidade dos microrganismos e marcam os microrganismos para eliminação pelos vários mecanismos efetores. Esta é o principal mecanismo de defesa contra os microrganismos e suas toxinas. Os anticorpos são especializados, e os diferentes tipos de anticorpos podem ativar diferentes mecanismos efetores (JANEWAY *et al.*, 2002).

Epítomos são a parte de um antígeno e são classificados em: epítomos lineares que apresentam resíduos de aminoácidos de forma linear (sequencial)

e epítomos conformacionais apresentando uma forma não linear próximo à estrutura tridimensional de uma macromolécula (PEAKMAN *et al.*, 1999).

As proteínas podem estar sujeitas a novas modificações como a fosforilação ou a proteólise. Essas modificações, alterando a estrutura covalente, podem produzir novos epítomos chamados de neo-epítomos (JANEWAY *et al.*, 2002)

2.4 Imunidade mediada por células

A participação dos produtos celulares solúveis é fundamental na seqüência de eventos que vão culminar com a ativação linfocitária. As células T CD4⁺ secretam alguns tipos de citocinas que as diferenciam em subpopulações celulares do tipo Th1 ou Th2. Os linfócitos T CD4⁺, do tipo Th1, secretam citocinas como IL-2, IFN γ e TNF α que irão mediar as reações de hipersensibilidade tardia e induzir a síntese preferencial de alguns isotipos de imunoglobulinas. Já os linfócitos T CD4⁺ do tipo Th2 secretam citocinas como IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13 e estão associadas com a produção de imunoglobulinas dos tipos IgG1 e IgE (MOSSMAN *et al.*, 1986).

3. PROTEÍNAS E SEU ESTADO CONFORMACIONAL

A estrutura primária da proteína resulta em uma longa cadeia de aminoácidos, com uma extremidade "amino terminal" e uma extremidade "carboxi terminal". Sua estrutura primária é somente a seqüência dos aminoácidos, sem se preocupar com a orientação espacial da molécula. Suas ligações são ligações peptídicas e pontes dissulfeto. (JANEWAY *et al.*, 2002)

A estrutura secundária É dada pelo arranjo espacial de aminoácidos próximos entre si na sequêcia primária da proteína. É o último nível de

organização das proteínas fibrosas, mais simples estruturalmente (RODRIGUEZ FARIDE *et al.*, 2004)

Estrutura terciária resulta do enovelamento da proteína na forma de α -hélice ou da folha β -pregueada, sendo estabilizada por pontes de ligações não covalentes e pontes dissulfeto. Esta estrutura, num determinado estado conformacional, confere a atividade biológica às proteínas (RODRIGUEZ FARIDE *et al.*, 2004).

A estrutura quaternária e a união de duas ou mais cadeias polipeptídicas de estruturas terciárias originando a estrutura quaternária (NELSON e COX, 2004).

4. ATIVIDADE BIOLÓGICA APÓS PROCESSO DE PROTEASES NO ESTADO CONFORMACIONAL DAS PROTEÍNAS DO VENENO DE SERPENTES.

As proteases encontradas no veneno das serpentes podem ser reunidas em dois grupos: endopeptidases e exopeptidases. (IWANAGA *et al.*, 1976)

As proteases presentes no veneno total não são responsáveis pela ação letal, mas podem causar outros tipos de efeitos danosos, como hemorragia. Um grande grupo de metaloprotease têm sido isolado de diferentes venenos e caracterizados como hemorráginas (MANDELBAUM *et al.*, 1976; TU, 1982).

O veneno de serpentes da família Crotalidea e Viperidea apresentam, além das hemorráginas, muitas outras proteases, que agem como cascata de coagulação sanguínea (IWANAGA *et al.*, 1979).

A proteólise também ocorre na ativação ou liberação de algumas moléculas (proteólise limitada), e muitas enzimas são ativadas pela ação proteolítica sobre seu precursor, chamado pró-enzima mudando de um estado conformacional sem função biológica para outro estado conformacional com função biológica específica (ZAHA *et al.*, 2003; ALBERTS *et al.*, 2004).

López-Lozano *et al.* (2002), verificou que o perfil molecular por eletroforese SDS-PAGE do veneno da serpente *Bothrops atrox*, submetidos Ao processo de proteólise por até 24 horas, constatou que o perfil molecular sofreu mudanças devido a proteólise. A análise dos padrões eletroforéticos das amostras de veneno incubado em tampão PBS (0,01 M), pH 7,4 por 24 horas a detecção da proteína de 50 kDa foi degradada, e uma nova proteína de 27 kDa foi detectada. Também foi detectada a diminuição na intensidade da proteína de 23 kDa.

5. SOROTERAPIA

A soroterapia continua sendo o tratamento específico nos envenenamentos ocasionados por acidentes ofídicos desde seu descobrimento por CALMETTE, 1894. E são a principal terapêutica disponível e a mais eficaz para o combate aos efeitos desastrosos e até mesmo letais ocasionados pelos venenos de diferentes animais peçonhentos e deve ser administrada em um menor espaço de tempo em doses e por vias adequadas.

A neutralização das atividades biológicas dos venenos tais como a letalidade, hemorragia, necrose e desfibrinogenação são avaliadas “*in vivo*”, utilizando animais de experimentação. Os antivenenos utilizados na terapêutica contra os acidentes por serpentes são produzidos usando-se antígenos um único tipo de veneno ou uma mistura deles (DIAS DA SILVA *et al.*, 1989).

O emprego da soroterapia no tratamento dos acidentes por serpentes vem sendo utilizado há mais de um século. Os procedimentos para obtenção dos antivenenos não sofreram profundas modificações embora tenham buscado melhorias para a produção e a purificação dos soros (MUNIZ, 2002).

6. JUSTIFICATIVA

A diversidade das serpentes da fauna Brasileira e da região Amazônica indica a ocorrência de espécies e subespécies o que assume um grande problema para o ofidismo, pois se sabe que em alguns casos ocorre uma relação intra-subespecífica, intra-específica e interespecífica de regiões diversas, podem ter venenos de composição e propriedades farmacológicas, bem como imunológicas diversas. Os poucos dados científicos sobre a fauna das serpentes peçonhentas da Amazônia e das características das atividades biológicas e imunológicas de seus venenos, principalmente das regiões do interior dos Estados que compõem a Amazônia sugere que podemos não estar empregando melhor a terapêutica para os acidentes ocorridos. Nos sistemas de colonização da Amazônia (turismo ecológico, avanço das fronteiras agrícolas), sugerem a necessidade de enriquecer o conhecimento pouco explorado sobre a biodiversidade dos animais peçonhentos e da eficácia dos soros anti-peçonhentos.

Sabe-se que o sistema imune precisa da degradação do antígeno por proteólise para apresentar os epítopos e gerar uma resposta humoral protetora.

Estudos prévios têm demonstrado que a crotoxina *in natura* dos venenos das serpentes pertencentes ao gênero *Crotalus* da América do Sul, apresentam uma forte atividade inibitória da resposta imune, que influencia em uma baixa produção de anticorpos neutralizante contra o veneno. Assim faz-se necessário a produção de novos métodos que melhorem a qualidade da resposta imune.

A degradação por proteólise da crotoxina poderia alterar o seu estado conformacional diminuindo sua toxicidade sobre o sistema imune existindo a possibilidade de uma melhor potência antigênica.

7. OBJETIVOS

7.1 OBJETIVO GERAL

- Avaliar as atividades biológicas e antigenicidade das toxinas do veneno hemorrágico de *Crotalus durissus ruruima* após proteólise “*in vitro*” pelas proteólises do veneno.

7.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar, usando técnicas proteômicas, o perfil molecular do veneno hemorrágico da serpente *Crotalus durissus ruruima*, após processo de proteólise.
- Avaliar as atividades biológicas do veneno hemorrágico de *C.d.ruruima* após processo de proteólise.
- Obter, animais de laboratório, plasma hiperimunes utilizando como antígeno veneno *in natura* e proteolizado de *C.d.ruruima*.
- Comparar a eficácia neutralizante dos plasmas hiperimunes das atividades biológicas do veneno *in natura* de *C.d.ruruima*.

8. MATERIAIS E MÉTODOS

8.1 VENENO DA SERPENTE

O veneno da serpente *Crotalus durissus ruruima* com fator hemorrágico foi obtido do banco de venenos do laboratório de Toxinologia Molecular do Centro de Ofidismo Prof^o. Paulo Friedrich Bührnheim da Fundação de Medicina Tropical do Amazonas FMT/AM.

8.2 INDUÇÃO DE PROTEÓLISE *IN VITRO*

A amostra do veneno hemorrágico da serpente *C.d.ruruima* foi diluída, concentração final de 10 µg/µl, em tampão glicina 100 mM pH 8,3. Foram retiradas alíquotas de 100 µl em diversos intervalos de tempo de proteólise, o veneno foi colocado para incubar a 37 °C e coletado nos tempos T1=3h, T2=6h, T3=24h, T4= 48h, T5=72h, T6= 168h. A amostra T0: sem o processo de proteólise foi usado como controle, tanto para os testes de atividades biológicas e para comparação do perfil molecular. Todas as amostras coletadas foram mantidas a -20 °C para posterior avaliação das atividades letal, coagulante, hemorrágica, gelatinase e fosfolipásica A2 e indução da resposta imune humoral.

8.3 ANIMAIS DE LABORATÓRIO

Os experimentos “*in vivo*”, para a caracterização biológica e antigenicidade das amostras do veneno coletado, foram feitos em camundongos albinos (*Mus musculus*), não isogênicos, peso entre 20 ± 2 g. Os animais foram fornecidos pelo Biotério Experimental do Laboratório de Toxinologia, do Centro de Ofidismo Prof^o Paulo Friedrich Bührnheim. Os camundongos foram mantidos em gaiolas de polipropileno, com temperatura controlada entre (23-25 °C), com ciclo de luz de 12 horas, recebendo ração e água “*ad libitum*”.

9. CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL MOLECULAR

9.1 ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA SDS-PAGE

A obtenção do perfil eletroforético SDS-PAGE do veneno foi realizado segundo LAEMMLI (1970), utilizando gel de concentração 4% e gel de separação a 15%. A montagem dos géis com espessura de 0,75mm foi realizada em placas de vidro, de 15 cm x 12 cm.

As amostras dos venenos foram diluídas em tampão de amostra (Tris 0,125 M, SDS 2% e azul de bromofenol 0,05%) em condições redutoras ou não redutoras. As amostras aplicadas nos géis na concentração 30 µg, foram submetidas a eletroforese com corrente elétrica constante de 500V e 50 mA por gel. A corrida eletroforética foi desenvolvida a 10° C, em solução tampão de corrida (Tris-HCl 0,025 M, pH 8,3, Glicina 0,192 M e SDS 0,1%).

Os géis foram corados com Coomassie Blue R-250 a 0,02% e descorados com solução de ácido acético, metanol e água na proporção de 1:5:4 (v/v) *overnight*. Os géis foram escaneados e analisados no sistema *Image Master 2D Platinum 6.0 da Amersham Biosciences*.

Para coloração com nitrato de prata os géis foram previamente lavados com água deionizada por 5 minutos, depois colocados em solução fixadora (metanol 50%, ácido acético 12%, formaldeído 0,1%), por 2 horas lavados 3X por 10 segundos com etanol 50% em seguida colocados em solução de tiosulfato de sódio a 0,005% por 1 hora, lavados com água ultra pura 3X por 10 segundos, corados com solução reveladora (nitrato de prata a 0,2% e formaldeído a 0,075%).

Após a detecção das proteínas, os géis foram colocados em solução ácido acético a 5% para parar a reação e escaneados com scanner *Image Master 2D Platinum 6.0 da Amersham Biosciences*.

9.2 ELETROFORESE Tris-Tricina-SDS-PAGE

A eletroforese Tris-Tricina é um sistema de gel de poliacrilamida para a separação de proteínas composta com 3 géis de diferentes concentrações, gel concentrador 4%, gel espaçador 10% e gel fracionador (4%), a metodologia utilizada foi realizada segundo SCHÄGGER & VON JAGOW (1987). Foram colocadas 30 µg das amostras do veneno da serpente *C.d.ruruima* coletadas nos diferentes tempos de incubação (descritas no item: 6.2) em condições não reduzidas. As amostras do veneno foram dissolvidas em tampão de amostra Tris-HCl 0,5 M, (pH 6,8), 0,4ml glicerol, SDS 10% e azul de bromofenol a 0,01%.

A corrida eletroforética foi realizada a 10° C, sob corrente de 20 mA e 40V por gel, com tampão catódico superior Tris-Tricina 0,1 M, SDS 0,1%, pH 8,25 e tampão anódico inferior Tris-HCl 0,2 M, pH 8,9.

Após a corrida eletroforética, os géis foram corados com Coomassie Blue R-250 0,02% em solução de ácido acético, metanol e água na proporção de 1:4:5 (v/v) *overnight* por 24 horas. Em seguida, os géis foram descorados em solução de ácido acético, metanol e água na mesma proporção. Os géis foram escaneados com scanner *Imagem Master 2D Platinum 6.0* da *Amersham Biosciences*.

10. AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS DO VENENO APÓS PROCESSO PROTEOLÍTICO

10.1 ATIVIDADE COAGULANTE PLASMA E O FIBRINOGÊNIO

A avaliação da atividade coagulante das amostras do veneno, sobre o fibrinogênio bovino, foi realizado segundo THEAKSTON & REID (1983). O fibrinogênio bovino (2mg/ml) foi diluído em tampão PBS, pH 7,4, 10 mM. Alíquotas de 200 µl foram colocadas para incubar à 37°C por 30 minutos em seguida misturados com 20 µg de cada amostra do veneno citados no item 6.2, e foi verificado o tempo de início de formação do coágulo de fibrina.

Para avaliar a atividade coagulante sobre o plasma foi utilizado 200 µl de plasma humano misturado com 20 µg de veneno e anotado o tempo e início de formação do coágulo de fibrina.

A atividade foi expressada com o tempo de início da formação do coágulo de fibrina induzido pelas amostras do veneno proteolizado com respeito ao tempo de início da formação do coágulo induzido pelo controle (amostra T0 veneno *in natura*).

10.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE FOSFOLIPÁSICA A₂

A atividade fosfolipásica A₂ foi avaliada segundo o método descrito por HABERMANN; HARD, 1972; GUTIERRÉZ *et al.*, (1994), utilizando-se agarose 1%, emulsão de gema de ovo a 3% (fonte de fosfatidilcolina), tampão PBS pH 8,1. A solução foi homogeneizada e aquecida a 60°C e aplicada em placas de plástico e deixadas em repouso para gelificar. Em seguida foram feitos poços de 3 mm de diâmetro e foram aplicados 10 µg das amostras coletadas do veneno de *C.d.ruruima* em 10 µl NaCl 0,9% de (volume final por poço). Após essa etapa foram incubadas a 37 °C em camara úmida por 24 horas.

A atividade fosfolipásica A₂ das amostras testadas foi avaliada comparando o diâmetro do halo formado pelas amostras do veneno *in natura* com os halos formados pelas amostras do veneno após processo de proteólise.

$$\% \text{ Atividade PLA}_2 = \frac{\text{Diâmetro halo veneno } in \text{ natura}}{\text{Diâmetro halo veneno proteolizado}} \times 100$$

10.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE HEMORRÁGICA

Na avaliação da atividade hemorrágica foram utilizados quatro grupos de 3 camundongos, foram utilizadas amostras do veneno de *C.d.ruruima* T0, T3, T4 e T6 aplicando-se via intradérmica com doses de 50 µg de veneno por camundongo. Após a aplicação das amostras os camundongos ficaram em observação por 2 horas, em seguida os camundongos foram anestesiados com éter, depois foi extraída a pele da região abdominal dos camundongos.

Após extração, os halos hemorrágicos foram mensurados com paquímetro digital, para avaliar a atividade hemorrágica das diferentes amostras do veneno.

10.4 ZIMOGRAMA DA ATIVIDADE PROTEOLÍTICA SOBRE FIBRINOGÊNIO E GELATINA

Para determinação da atividade proteolítica do veneno sobre o fibrinogênio ou gelatina foi utilizada a técnica de zimograma utilizando eletroforese SDS-PAGE segundo LAEMMLI (1970). O substrato fibrinogênio ou gelatina (10 mg/ml) foi previamente misturado com acrilamida antes da polimerização. Colocou-se 30 µg de veneno por “poço” em tampão amostra não reduzido. A corrida realizada a 10 °C e 50 mA por gel. Ao término da corrida os géis foram lavados em solução de 2% de Triton-X100 por uma hora à temperatura ambiente.

Em seguida os géis foram incubados a 37 °C por 24h em tampão Glicina 100 mM pH 8,3. Após essa fase os géis foram corados segundo item: 7.1. A observação das áreas clara no fundo azul do gel indica a atividade proteolítica do veneno.

10.5 AVALIAÇÃO DA LETALIDADE de 5 DL₅₀ (10 µg) DAS AMOSTRAS DO VENENO *IN NATURA* E PROTEOLIZADO

A dose letal (DL₅₀) de 2 µg/camundongo 20 ± 2 g via intraperitoneal para o veneno hemorrágico da serpente *C.d.ruruima* foi previamente determinada por MUNIZ (2002), segundo a metodologia descrita por (FINNEY, 1971).

Foram utilizados dois grupos de 5 camundongos 20 ± 2 g, e aplicando-se 5 DL₅₀ de veneno *in natura* e veneno proteolizado, os camundongos ficaram em observação por um período de 24 horas.

Os camundongos que receberam veneno *in natura* após 1 hora apresentaram sintomas de: respiração ofegante e agitação e após 3 horas vieram à óbito.

Os camundongos que receberam veneno proteolizado após 1 hora não apresentaram nenhum sintoma aparente, mais após 6 horas os camundongos apresentaram-se ofegantes e agitado e depois de 24 horas 3 camundongos dos cinco que receberam veneno proteolizado vieram a óbito.

10.6 IMUNIZAÇÃO

A imunização foi realizada, aplicando-se em dois grupos de 8 camundongos, por via subcutânea o antígeno mais adjuvante em volume final de 100 µl por camundongo. As amostras do veneno usado com adjuvante foram as de T0 (sem autoproteólise) e T6 (168 h de autoproteólise). As amostras foram dissolvidas em tampão PBS pH 7,4, 100 mM.

Na primeira dose de imunização foi utilizado: adjuvante de Freund completo (óleo mineral associado a *Mycobacterium tuberculosis*), Tween 80 0,1% e nas outras três doses subsequente foi utilizado adjuvante de Freund incompleto (óleo mineral) e Tween 80 0,1%. As doses do veneno de *C.d.ruruima* administrada foram 25 µg, 50 µg, 75 µg e 100 µg respectivamente.

Após 7 dias da aplicação da última dose, os animais foram anestesiados com éter e sangrados pelo plexo braquial. O sangue foi coletado em tubos de hemólise, deixando em repouso por 20 minutos, em seguida foram incubadas por 20 minutos a 37 °C e depois a 4 °C por 30 minutos, depois as amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 1500 rpm, e em seguida foi feita a coleta do plasma hiperimune e armazenado a -20 °C.

10.7 AVALIAÇÃO DA NEUTRALIZAÇÃO DA LETALIDADE DE 5 DL₅₀

Para avaliar a eficácia antigênica imunizante protetora contra a atividade letal do veneno, as amostras T0= veneno *in natura* e T6=168h do veneno foram utilizados camundongos segundo item anteriormente descrito.

Assim, nos camundongos imunizados forma aplicados por via intraperitoneal dose do veneno *in natura* de C.d.ruruima, equivalente a 5 DL₅₀, 10 µg/camundongo.

Após inoculação da dose desafio do veneno os camundongos ficaram em observação por um período de 24 horas anotando-se o número de animais vivos.

10.8 AVALIAÇÃO DA NEUTRALIZAÇÃO DA ATIVIDADE COAGULANTE SOBRE O PLASMA E O FIBRINOGÊNIO.

A atividade neutralizante das amostras do veneno, sobre o fibrinogênio bovino. O fibrinogênio bovino (2mg/ml) foi diluído em tampão PBS, pH 7,4, 10 mM. Alíquotas de 200 µl foram colocadas para incubar à 37°C por 30 minutos em seguida misturados com 2 µl de soro hiperimune experimental T0 e T6, e 20 µg de veneno *in natura* foi verificado o tempo de início de formação do coágulo de fibrina.

Para avaliar a atividade coagulante sobre o plasma foi utilizado 200 µl de plasma humano misturado com 20 µg de veneno e 2 µl de soro hiperimune experimental, foi anotado o tempo e início de formação do coágulo de fibrina.

A atividade foi expressada com o tempo de início da formação do coágulo de fibrina induzido pela amostra do veneno *in natura* com respeito ao tempo de início da formação do coágulo.

11. ANALISE IMUNOQUÍMICO

11.1 “WESTERN BLOTTING”

Foi utilizado para analisar as toxinas (antígenos) das amostras do veneno que interagem com o antiveneno (anticorpo). O antiveneno anticrotálico utilizado foi de origem equina, e crotálico, contra o veneno de *C.d.terrificus*.

Após eletroforese Tris-tricina SDS-PAGE segundo item 7.1.1 com 30 µg das amostras do veneno de *C.d.ruruima* as proteínas de transferência foram transferidas sob corrente constante para membrana de nitrocelulose, de acordo com a técnica descrita por TOWBIN *et al.* (1979). O gel foi colocado na sequência: suporte suporte de plástico perfurado, folha de espuma, 2 folhas de papel filtro cortadas no tamanho do suporte, gel Tris-Tricina, a membrana, a membrana de nitrocelulose, 2 folhas de de papel de filtro do tamanho do suporte, folha de espuma e suporte perfurado.

A transferência em “Western Blot” foi realizada com 260 mA, 100 W e 500 V, por 3 horas em tampão de transferência Tris-Glicina-metanol. Após a transferência da região do ânodo para o cátodo (membrana de nitrocelulose), retirou-se a membrana de nitrocelulose e foi corada com “Ponceau-S”, para avaliar a eficiência da transferência das proteínas, e a membrana foi lavada com água ultra pura até sair o “Ponceau-S”.

Logo, colocou-se solução bloqueadora Tris-Salina-Tween 20 (TBS-T) com leite desnatado em pó “Molico” a 5% por 2 horas a temperatura ambiente e agitação constante. Após o bloqueio, as membranas foram lavadas três vezes TBS-T por 15 minutos cada, a seguir, as membranas foram

incubadas por 1 hora e 30 minutos, temperatura ambiente, com antiveneno anticrotálico em Tris-Salina (TBS), na proporção 1:1000.

Após a reação do anti-veneno com veneno, as membranas foram lavadas três vezes por 5 minutos cada, e foram incubadas por 2 horas a temperatura ambiente sob agitação constante em solução de TBS mais conjugado anti-IgG de cavalo e peroxidase (Sigma Co.®, USA) na solução de 1:200

Após a reação do conjugado com anticorpo, as membranas passaram por 3 lavagens com TBS-T por 5 minutos cada. A solução de TBS com 8,3% de 4-cloro 1 α -naftol (substrato cromógeno), 0,14% de peróxido de hidrogênio e 0,57% de metanol foi aplicada sobre as membranas sob agitação constante protegidas da luz do meio ambiente, permitindo que as bandas de proteínas que se ligaram ao anticorpo fosse revelado.

11.2 TESTES ESTATÍSTICOS

Para a análise estatística será utilizado o teste T Student e a análise de variância (ANOVA), com níveis de probabilidades menores que 5% ($p < 0,05$).

12. RESULTADOS

12.1 ELETROFORESE SDS-PAGE

De acordo com o tempo de proteólise o perfil eletroforético do veneno da serpente *Crotalus durissus ruruima* revelou mudanças nas intensidades de proteínas detectadas, sugerimos que este fato está relacionado ao processo de clivagem das ligações peptídicas causadas pelas toxinas proteolíticas, Serinoproteases e Metaloproteases, presentes no veneno.

Tal fato pode ser observado pela intensidade das bandas que vão de 50 KDa e 10 KDa. Nos géis figura 8,9 e 10 podemos observar, que com o decorrer do tempo de proteólise o perfil do veneno muda quando comparado com a amostra controle T0 = veneno *in natura* que não sofreu proteólise.

As proteínas nos géis figuras 8,9 e 10 apresentam variação na massa molecular, de 200 KDa a 10 KDa e na intensidade. No gel da figura 8 são detectadas as proteínas de 20 KDa e 10 KDa para o tempo T0= (zero h) e T1=3h em quanto nos géis das figuras 9 e 10, estas não foram detectadas.

As proteínas de 50 KDa na amostra tempo T6=168h nos géis das figuras: 8,9 e 10 não foram detectadas devido ao processo de proteólise, causado pelas serinoproteases e/ou metaloproteases que clivaram as ligações peptídicas.

Isto sugere que sua estrutura molecular teve sua massa molecular reduzida, gerando peptídeos com massas molecular abaixo de 10 KDa, que não foram detectados no gel.

No gel da figura 10 corado com nitrato de prata foram detectadas proteínas que variam de 200 KDa a 14 KDa. Sugerimos que a detecção das proteínas de 200 KDa e 100 KDa para os tempos T0=(zero h) ao tempo T5=72h esta relacionada a maior sensibilidade do corante para detectar proteínas em baixas concentrações.

Assim, sugerimos que com o processo proteolítico as proteínas tiveram suas ligações peptídicas quebradas consequentemente o estado conformacional da proteína *in natura* foi alterado.

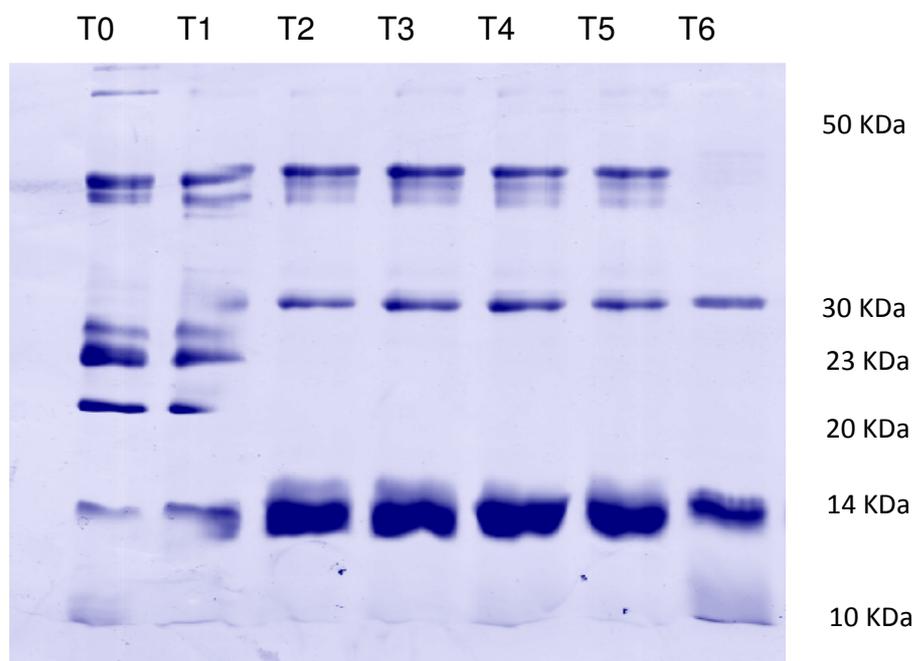


Figura 8. Perfil eletroforético SDS-PAGE em condições não redutoras das amostras do veneno de *Crotalus durissus ruruima* 30 μ g por poço em diferentes intervalos de autoproteólise de incubação a 37°C, Tampão Glicina 100 mM pH 8,3. T=0(veneno *in natura*), T1=3h, T2=6h, T3=24h, T4=48h, T5=72h, T6=168h. Gel corado com Coomassie Blue R-250 a 0,02%.

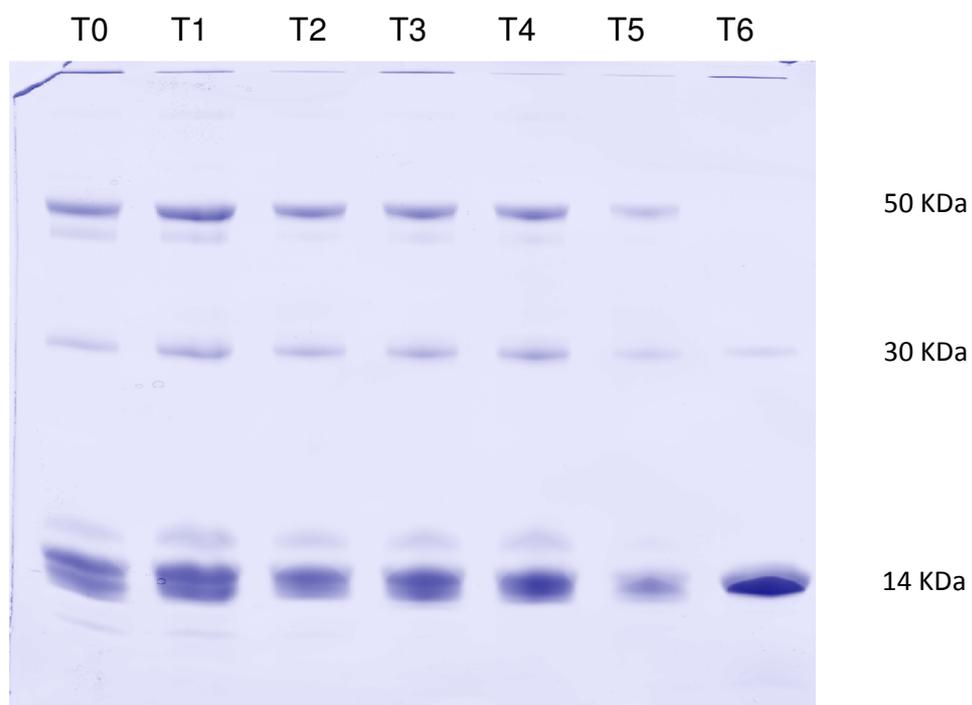


Figura 9. Perfil eletroforetico SDS-PAGE do veneno de *Crotalus durissus ruruima* 30 μg por poço em diferentes tempos de autoproteólise, incubação a 37°C das amostras em Tampão Glicina 100 mM, pH 8,3 em condições redutoras. T=0(veneno *in natura*), T1=3h, T2=6h, T3=24h, T4=48h, T5=72h, T6=168h. Gel corado com Coomassie Blue R-250 a 0,02%.

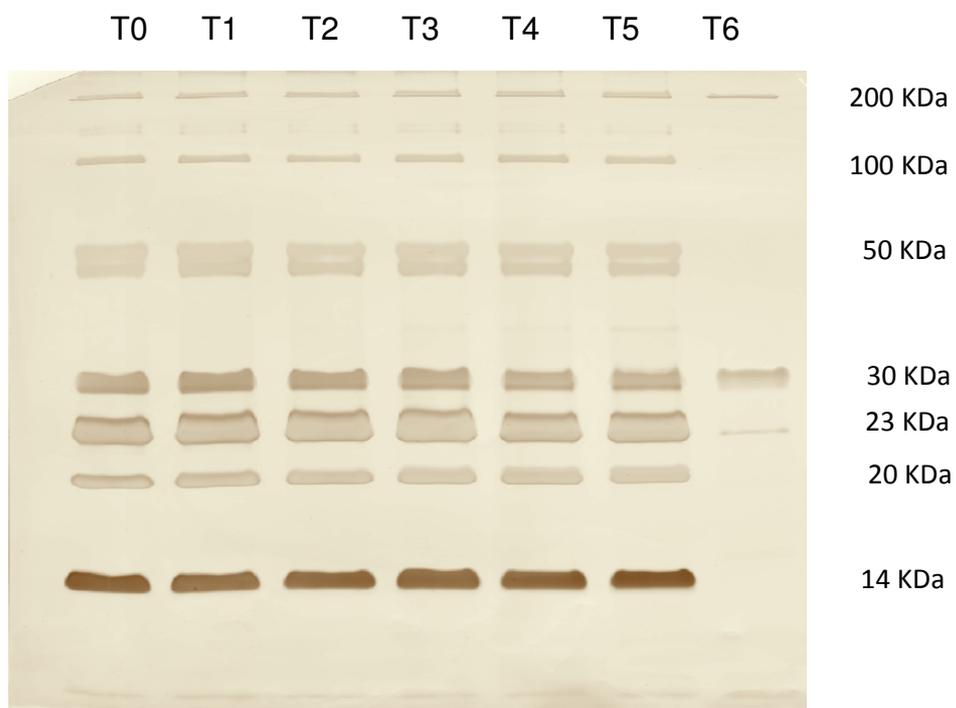


Figura 10 Perfil eletroforético SDS-PAGE do veneno de *Crotalus durissus ruruima* 10 μ g por poço em diferentes tempos de proteólise de incubação a 37°C das alíquotas em Tampão Glicina 100 mM, pH 8,3 em condições redutoras. T=0(veneno *in natura*), T1=3h, T2=6h, T3=24h, T4=48h, T5=72h, T6=168h. Gel corado com Nitrato de prata.

12.2 ATIVIDADE COAGULANTE SOBRE FIBRINOGÊNIO E PLASMA.

Os resultados do gráfico 1 apresentam o tempo de início de formação do coágulo de fibrina, causado pelo consumo de fibrinogênio pelas amostras do veneno obtido em diferentes intervalos de tempo de incubação. Devido ao processo proteolítico das toxinas causado pelas proteases endógenas, sugerimos que com o decorrer do processo as ligações peptídicas presentes nas serinoproteases são clivadas alterando assim sua estrutura conformacional, processo que inicialmente diminui a atividade delas.

Mas com o decorrer do processo possivelmente mais ligações peptídicas são quebradas induzindo assim um arranjo na estrutura/conformação das moléculas causando aumento da atividade enzimática sobre o substrato (Amostra T6)

Análise estrutura/função das serinoproteases purificadas da amostra T6, poderiam ou não corroborar essa hipótese.

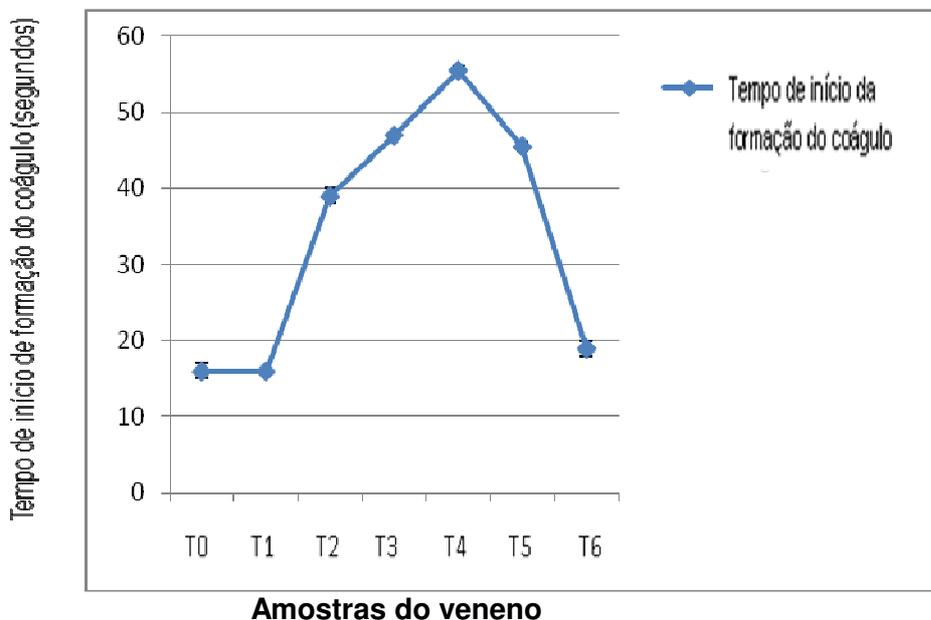


Gráfico 1 Tempo de início da atividade coagulante sobre o Fibrinogênio bovino, 10 µg de veneno de *Crotalus durissus ruruima* tampão PBS pH 7,2 a 37°C dos tempo T0, T1=3h, T2=6h, T3=24h, T4=48h, T5=72h, T6=168h.

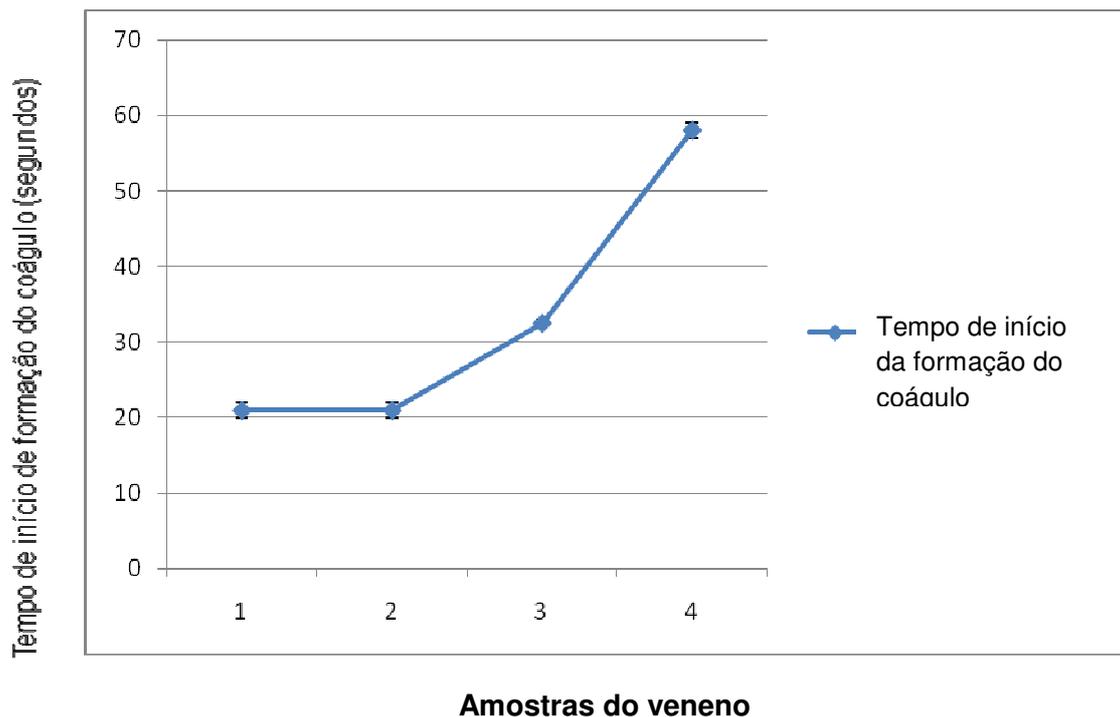


Gráfico 2 Tempo de início da atividade coagulante sobre o plasma humano, 10 µg de veneno de *Crotalus durissus ruruima* tampão PBS pH 7,2 a 37°C dos tempo T0, T1=3h, T3=24h, T6=168h.

O gráfico 2 demonstra que o processo de proteólise do veneno aumenta o intervalo de tempo de início da formação do coágulo, isto sugere que o tempo de incubação a 37 °C do veneno de *Crotalus durissus ruruima* fez com que o mesmo sofresse destruição causado pelas proteases presentes no veneno, com isso as toxinas trombina-símiles tiveram seu estado conformacional alterado perdendo parte de sua estrutura e a atividade biológica, fazendo com que o tempo de formação do coágulo fosse aumentando.

A perda da atividade biológica também estar relacionada com a interação de inibidores de serinoproteases do plasma com as serinoprotease do veneno que sofreram atividade proteolítica e a desnaturação de estrutura/confrmação das toxinas do veneno.

12.2.1 ATIVIDADE FOSFOLIPÁSICA APÓS PROCESSO DE PROTEÓLISE

Para avaliar a atividade fosfolipásica A_2 após o processo de proteólise foi utilizado o método descrito por HABERMANN & HARD, 1972; GUTIERRÉZ *et al.*, (1994). Foi utilizado 10 μg do veneno de *Crotalus durissus ruruima* das amostras de diferentes intervalos de tempo de proteólise citados no item: 6.2

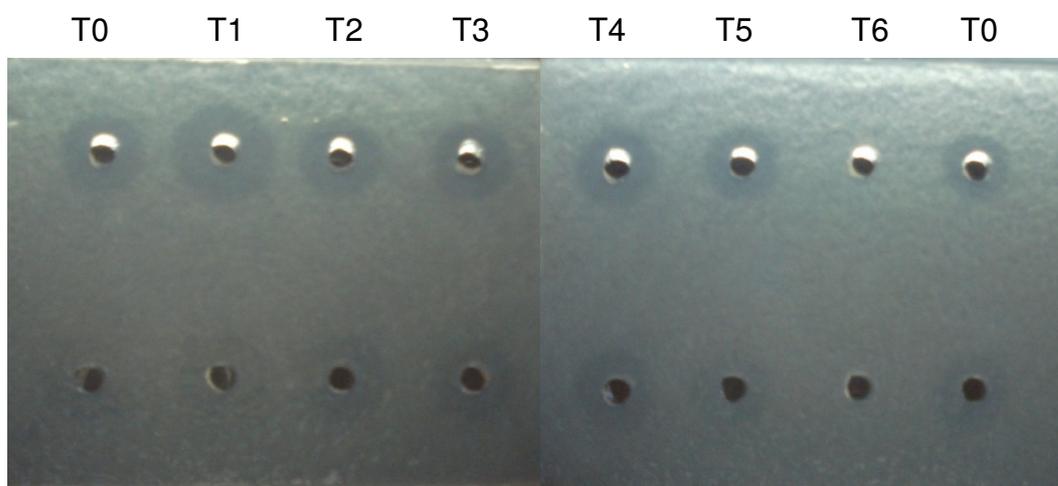


Figura 11 Atividade fosfolipásica A_2 do veneno de *Crotalus durissus ruruima*, 10 μg por poço, Agarose 1%, emulsão de gema de ovo 3%, em tampão PBS pH 8,1 0,04 mM.

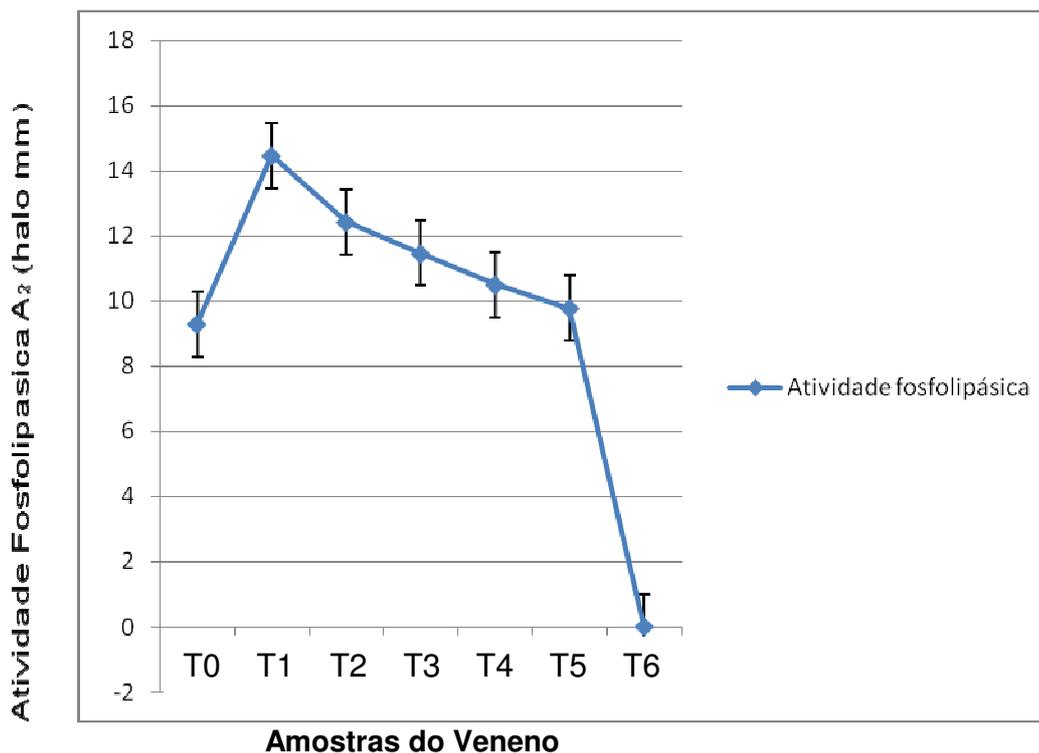


Gráfico 3 Média dos halo em (mm) da atividade fosfolipásica A₂ de *Crotalus durissus ruruima*, 10 µg de veneno Agarose 1%, emulsão de gema de ovo 3%, em tampão PBS 0,04 mM, pH 8,1

O gráfico 3 demonstra a atividade fosfolipásica A₂ em função do processo proteolítico.

Os resultados da (figura 11 e gráfico 3) mostram a variação da atividade fosfolipásica A₂ de aumento e declínio. Isto sugere que no veneno *in natura* no tempo T0= zero h as PLA₂ encontram-se menos ativa quando comparada com as amostras dos tempos T1=3h a T3=24h. É possível que nas amostras T1 e T3 existam maior quantidade de PLA₂ do veneno.

Mas na amostra T6=168h, a estrutura conformacional das fosfolipases A₂ foi alterada de forma negativa pelo processo de proteólise, aumentando a perda da atividade enzimática.

12.2.2 ATIVIDADE HEMORRÁGICA APÓS PROCESSO DE PROTEÓLISE

A figura 12 e gráfico 4 mostra que no tempo T0= veneno *in natura* pode-se constatar atividade hemorrágica, e no decorrer do processo de proteólise, o veneno vai perdendo essa atividade de induzir hemorragia. Isso sugere que as metaloproteases vão perdendo sua estrutura nativa. No tempo T6=168h a atividade hemorrágica não foi constatada, sugerimos que o processo de proteólise causado pelas enzimas proteolíticas endógenas clivou a maioria das metaloproteases e as poucas que restaram não foram o suficiente para induzir um quadro hemorrágico.

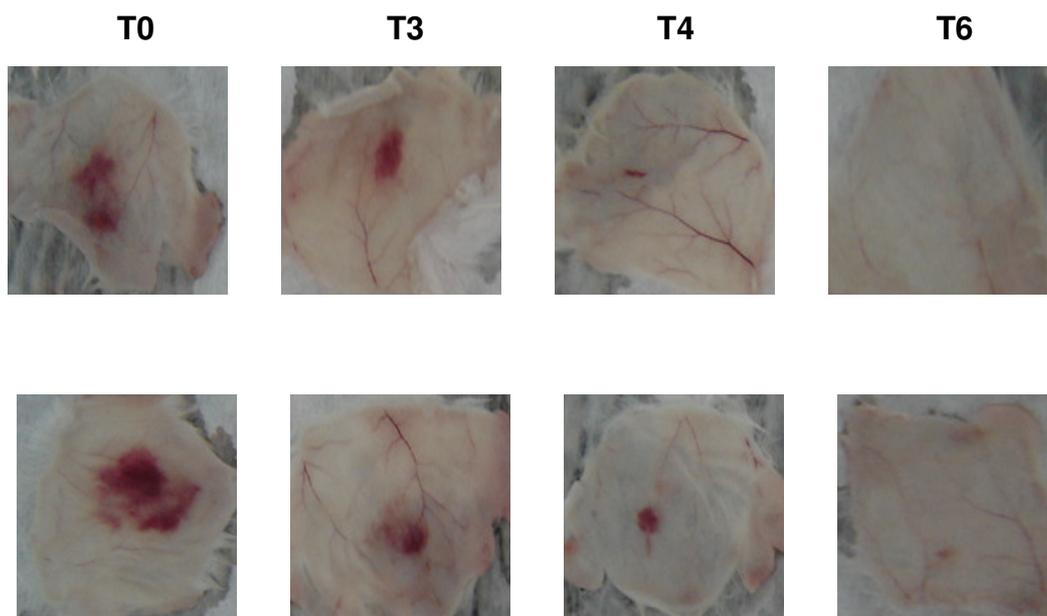


Figura 12 Atividade hemorrágica em camundongos *Mus musculus*, com aplicação das amostras do veneno tempos T=0, T3=24h, T4=48h, T6=168h intradérmica (dose desafio 50 µg do veneno nos camundongos).

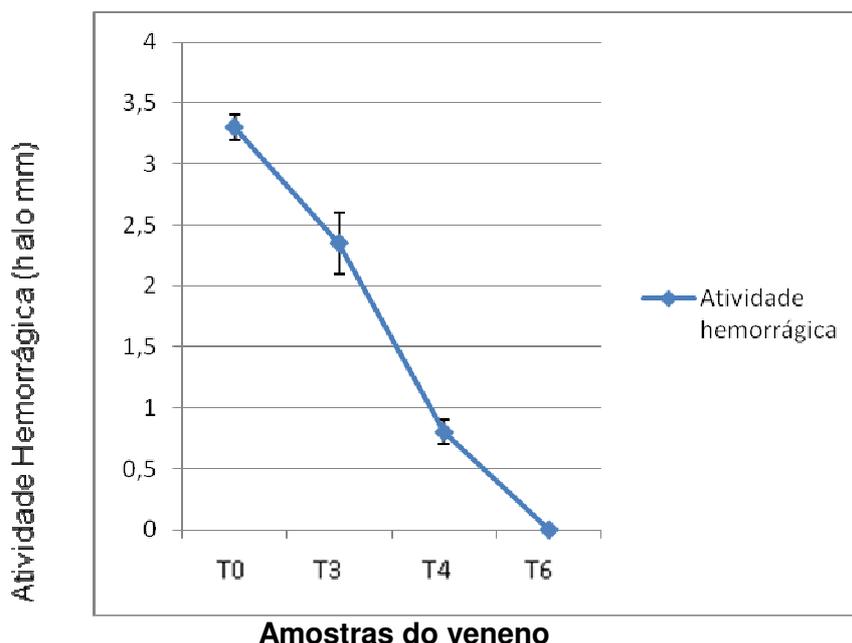


Gráfico 4 Atividade hemorrágica VS proteólise, 50 µg veneno.

12.2.3 ZIMOGRAMA DA ATIVIDADE SOBRE FIBRINOGÊNIO/ GELATINA

No perfil do zimograma da atividade proteolítica sobre o fibrinogênio figura 13 foram detectadas três isoformas de trombina-símile com um perfil diferenciado para cada amostra coletada segundo o temp de incubação a 37 °C.

Na amostra T0= veneno *in natura* foram detectadas três isoformas de trombina-símilie, nas demais amostras após processo de proteólise estas também foram detectadas mais com uma variação da atividade enzimática e proteolítica delas sobre o fibrinogênio.

Essa intensidade detectada, sugere estar relacionada ao processo proteolítico, pois no veneno *in natura* as serinoproteases ainda não se encontram totalmente ativas e após a proteólise essas proteases do veneno tem sua estrutura conformacional/molecular modificada devido à quebra das ligações peptídicas das trombinas-símile contribuindo possivelmente as variações na atividade delas. Mas para o perfil da amostra T6, sugere que a

trombina-símile de 35 KDa é a que perde mais rapidamente a atividade proteolítica sobre o fibrinogênio.

Com o decorrer do processo de proteólise sugerimos que as três isoformas vão sofrendo clivagens nas ligações peptídicas e a sua estrutura molecular sofre alterações da atividade sobre o fibrinogênio diminui (figura 13).

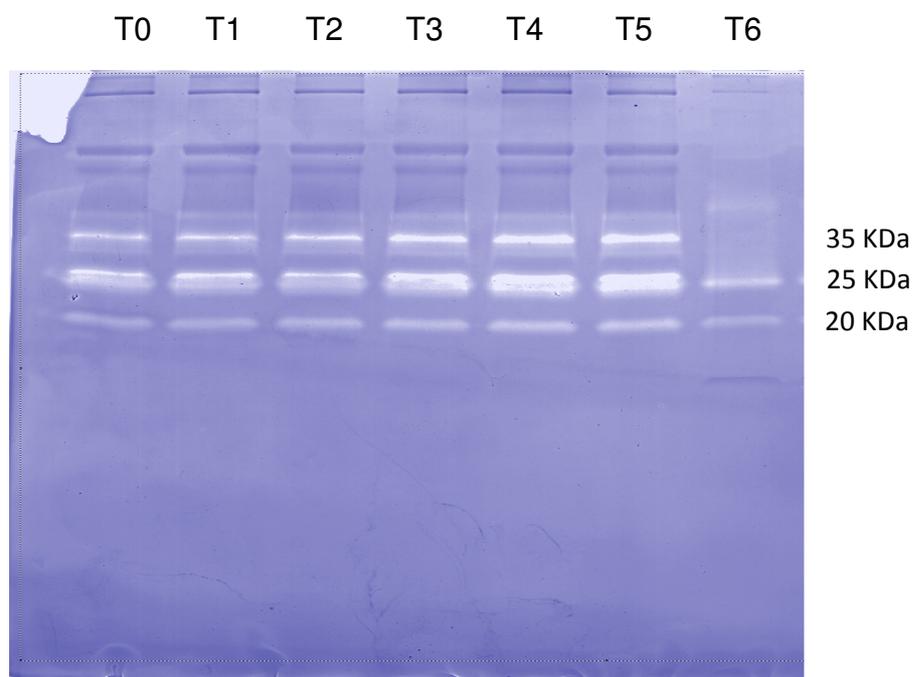


Figura 13 Zimograma da atividade proteolítica sobre o fibrinogênio bovino das amostras do veneno de *Crotalus durissus ruruima* 30 µg por poço em diferentes intervalos de autoproteólise após incubação a 37°C. T=0(veneno *in natura*), T1=3h, T2=6h, T3=24h, T4=48h, T5=72h, T6=168h. Gel corado com Coomassie Blue R-250 a 0,2%.

Segundo o perfil do zimograma da (figura 13), em todas as amostras foram detectadas atividades proteolíticas sobre a gelatina.

As toxinas detectadas com atividade proteolítica sobre a gelatina foram de 100 KDa e de 50 KDa sendo a amostra T0= veneno *in natura* apresetou maior atividade gelatinolítica, não foi detectada, de forma qualitativa

(observação visual), diferenciação na atividade gelatinase nas amostras do veneno avaliadas.

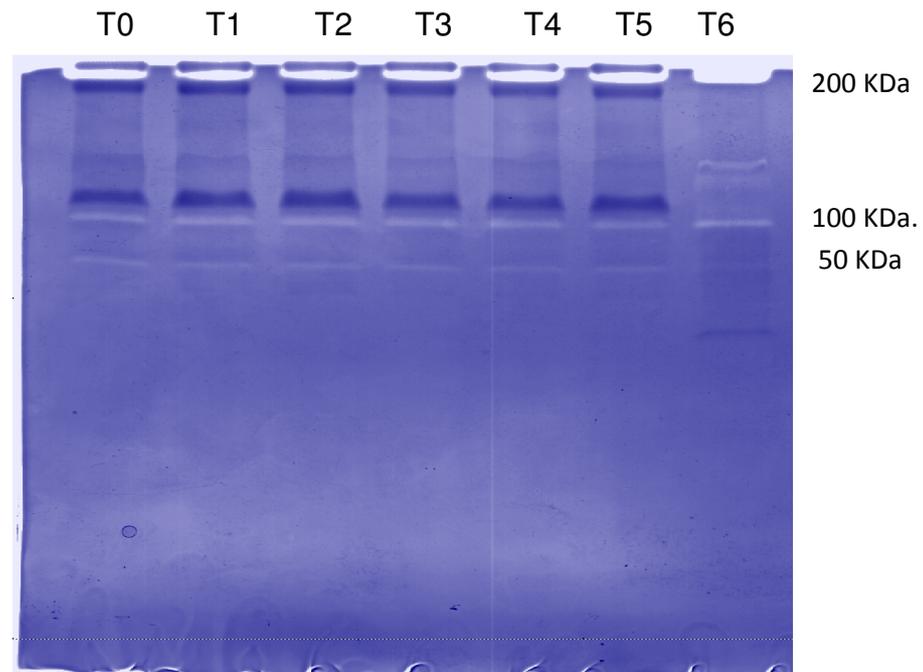


Figura 14 Zimograma da atividade proteolítica sobre a gelatina das amostras do veneno de *Crotalus durissus ruruima* em diferentes intervalos de autoproteólise após incubação a 37°C. T=0(veneno *in natura*), T1=3h, T2=6h, T3=24h, T4=48h, T5=72h, T6=168h. Gel corado com Coomassie Blue R-250 a 0.2%.

Os dados obtidos, segundo ao perfis do zimograma sobre o fibrinogênio bovino e a gelatina, nos sugere que tanto as serino como as metaloproteases são enzimas resistentes à atividade proteolítica do veneno, embora exista perda dessa atividade após um longo processo de proteólise do veneno pelas proteases endogenas.

12.3 NEUTRALIZAÇÃO PELOS SOROS HIPERIMUNES EXPERIMENTAIS DAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS DO VENENO *IN NATURA*

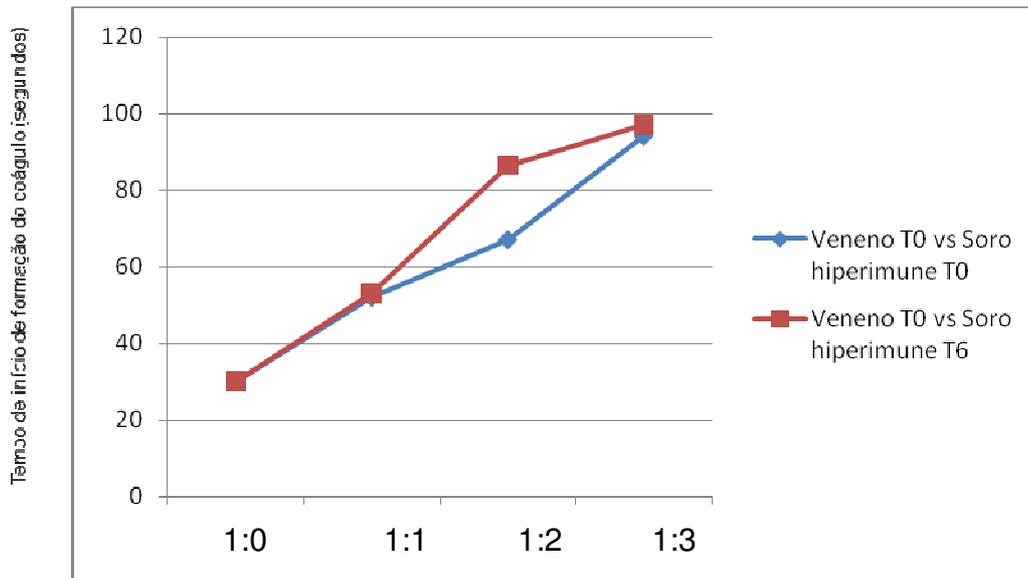
12.3.1 NEUTRALIZAÇÃO DA ATIVIDADE SOBRE FIBRINOGÊNIO E PLASMA.

A neutralização da atividade coagulante para o plasma e o fibrinogênio seguem os mesmos procedimentos citados no item: 18.1 mais com a adição de soro hiperimune de camundongos em proporções 1:1, 1:2 e 1:3

Foram realizados testes para constatar a eficácia do soro hiperimune produzido nos camundongos que foram imunizados com a amostra do veneno na sua forma nativa T0= zero h ou veneno proteolizado T6=168h.

Segundo os gráficos 6 os resultados obtidos sugerem que não houve diferença na indução da resposta imune humoral (produção de anticorpos) contra serinoproteases presentes no veneno de *C.d.ruruima* quando foram usados como antígenos o veneno in natura (T0) e o veneno proteolizado com 1 semana (T6).

Isto sugere que o processo de proteólise preserva epítomos nas toxinas das serinoproteases do veneno, que apresentam a capacidade de induzir uma boa resposta imune.



Veneno/Soro hiperimune

Gráfico 5 Veneno *in natura*, soros hiperimunes T0, T6, fibrinogênio bovino reação 1:0 veneno e fibrinogênio bovino, 1:1, 1:2, 1:3 veneno *in natura*, fibrinogênio e soro T0 e soro T6.

O gráfico 5 representa a eficácia neutralizante entre os soros hiperimunes do plasma descritos acima, onde o soro hiperimune T6 apresentou uma boa resposta ao efeito coagulante sobre o plasma e o soro T0 obteve uma resposta imune moderada pois houve a formação do coágulo em um menor intervalo de tempo, enquanto T6 a formação do coágulo teve seu início de formação em um maior intervalo de tempo.

Isto sugere que após o processo proteolítico das toxinas presentes nas amostras do veneno de *C.d.ruruima* os epítomos presentes fizeram com que o sistema imune obtivesse uma melhor resposta imune.

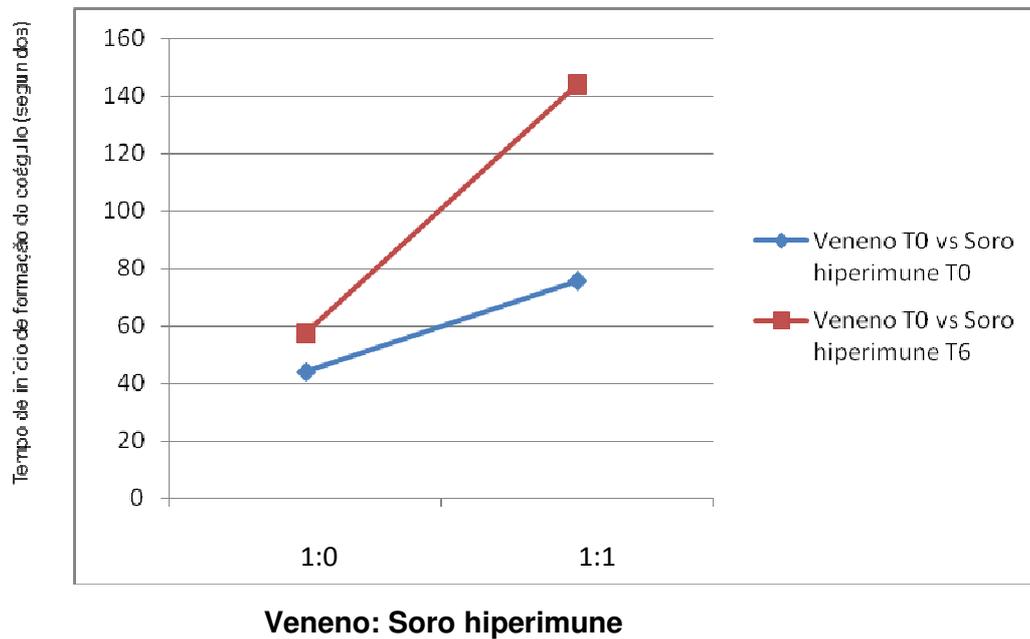


Gráfico 6 Veneno *in natura*, soros hiperimunes T0, T6 , plasma humano reação 1:0 veneno e plasma, 1:1 veneno *in natura* e soro T0 e soro T6.

12.3.2 NEUTRALIZAÇÃO DA LETALIDADE

A neutralização da letalidade foi realizada segundo método descrito no item: 10.1 para avaliar a letalidade, foram imunizados 2 grupos com quatro camundongos cada um com antígeno T0 e outro com antígeno T6. Nos camundongos imunizados foram aplicadas 5 DL₅₀ do veneno por camundongo via intraperitoneal. Após essa etapa os camundongos ficaram em observação por 24 horas para avaliar o número de camundongos vivos.

Tabela 2 Dose desafio 5 DL₅₀ de veneno da serpente *C.d.ruruima* 10 µg/camundongo via intraperitoneal .

	Veneno 10 µg	Nº Vivos
Grupo T0	4 camundongos	***
Grupo T6	4 camundongos	4

Dose desafio 5 DL₅₀ = 10 µg/camundongo

Os resultados da neutralização para os dois grupos mostraram que os camundongos imunizados com antígenos T0 não resistiram à dose desafio (5 DL₅₀) vindo a óbito todos os camundongos, enquanto o grupo de camundongos imunizados com antígenos T6 sobreviveram, e resistiram a dose desafio (5 DL₅₀), sugerimos que o grupo imunizado com antígeno T0 tiveram uma baixa produção de anticorpos pois o antígeno T0 apresenta no seu constituinte mais de 50% de crotoxina, uma toxina que inibe a resposta imune. E o grupo imunizado com antígeno T6 apresenta toxinas proteolizadas inclusive a crotoxina maior constituinte do veneno.

Após a inoculação do veneno *in natura* de *C.d.ruruima* 10 µg nos camundongos imunizados com antígenos T0 ou T6, apresentaram reações diferentes. Com 1 hora de observação os camundongos do grupo T0 apresentavam-se agitados com respiração ofegante, enquanto o grupo T6 caminhava normalmente comendo ração e tomando água, com 8 horas de observação o grupo T0 apresentava reações de falta de ar pela atividade pré-sináptica da crotoxina que bloqueia a liberação da acetilcolina, um neurotransmissor responsável de enviar mensagens dos neurônios para contração muscular. Após 10 horas de observação todo o grupo T0 veio a óbito enquanto o grupo T6 permaneceu vivo sem apresentar nenhuma das características descritas para o grupo T0.

Os dois grupos de camundongos imunizados, T0 e T6 tiveram uma resposta imune diferente, pois o sistema imune produz anticorpos específicos para cada antígeno, o grupo T0 teve uma resposta específicas para as toxinas

in natura, o sistema imune apresentou uma baixa produção de anticorpos, os camundongos não resistiram à dose desafio vindo a óbito.

Para o grupo imunizado com T6, foram imunizados com toxinas proteolizadas com isso os anticorpos produzidos para as proteínas proteolizadas com menor toxicidade, os camundongos tiveram uma melhor resposta imune, pois o processo proteolítico clivou as toxinas, formando peptídeos, mas foram preservados os epítomos para induzir uma boa resposta imune.

13. ANÁLISE IMUNOQUÍMICO

13.1 “WESTERN BLOTTING”

T0 T1 T2 T3 T4 T5 T6

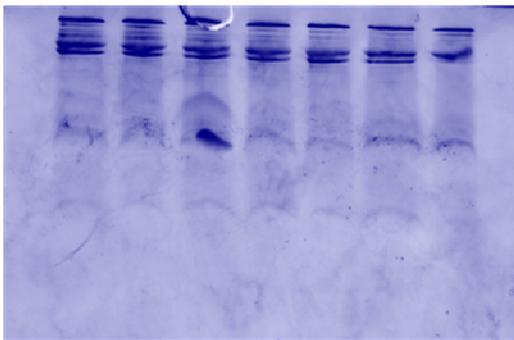


Figura 15 Perfil eletroforético Tris-tricina SDS-PAGE com glicerol após diferentes intervalos de tempo de incubação a 37°C, das amostras do veneno de *Crotalus durissus ruruima* 30 µg com tampão glicina em condições não redutoras: T0=zeroh, T1=3h, T2=6h, T3=24h, T4=48h, T5=72h, T6=168h. Gel corado com Coomassei Blue

T0 T1 T2 T3 T4 T5 T6

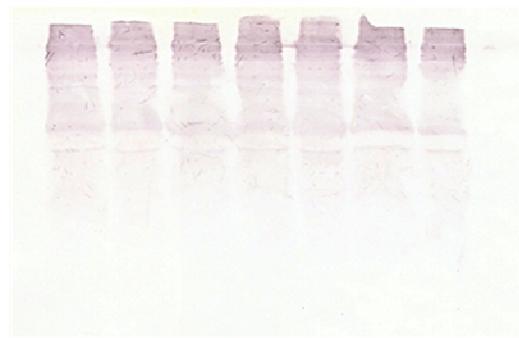


Figura 16 Imunoperfis do veneno de *Crotalus durissus ruruima* não reduzidos com anticorpos policlonais do soro anticrotático de cavalo (INSTITUTO BUTANTAN).

Para análise com Western Blotting, as amostras foram previamente submetidas a eletroforese SDS-PAGE Tris-Tricina segundo a figura 15.

No veneno de *Crotalus durissus ruruima* podemos observar que os anticorpos do soro anticrotálico (INSTITUTO BUTANTAN) reconheceram no veneno tanto, *in natura* e após processo de proteólise, as toxinas com massa molecular entre 10 e 100 kDa.

Sugerimos que no veneno proteolizado epitopos lineares e/ou conformacionais com a capacidade de induzir a produção de anticorpos são preservados.

Isto sugere que epitopos lineares e/ou conformacionais que foram preservados na amostra T6, veneno proteolizado, são suficientes para produzir a produção de anticorpos neutralizantes da atividade letal do veneno de *C.d.ruruima*.

A vantagem desse antígeno proteolizado com respeito ao antígeno *in natura* é que induz uma melhor resposta imune humoral com baixa toxicidade.

14. DISCUSSÃO

As proteínas no seu estado conformacional biologicamente ativas regulam as funções das células. Uma característica notável das proteínas é a sequência de aminoácidos alinhados e enovelados que podem formar diferentes classes de estrutura das proteínas. (Haian Fu *et al.*, 2000).

As toxinas *in natura* presentes no veneno de *Crotalus durissus ruruima* apresentaram atividades coagulante, hemorrágica, neurotóxica e proteases das classes das serino e metaloproteases, com a capacidade de realizar a quebra das ligações peptídicas diminuindo as atividades das toxinas.

No presente trabalho o veneno de *C.d.ruruima* foi submetido ao processo de proteólise por 168 h em tampão glicina pH 8,3, 100 mM. No decorrer do processo proteolítico, ligações peptídicas das toxinas foram quebradas pelas proteases endógenas diminuindo a neurotoxicidade e outras atividades biológicas do veneno.

López-Lozano *et al* (2002), submeteu o veneno e *B.atrox* ao processo de proteólise e constatou que houve uma mudança na massa molecular das proteínas presentes no veneno.

O veneno de *C.d.ruruima* do presente trabalho foi submetido ao processo de proteólise, e apresentou um perfil diferenciado, quando comparado com o veneno *in natura* onde o processo de proteólise quebrou as ligações peptídicas modificando a estrutura/conformação e alterando a atividade biológica do veneno, sugerindo que o processo proteolítico também altera o veneno crotálico como já observado com o veneno de *B.atrox*.

Fox e Serrano (2005), sugerem que metaloproteases do veneno das serpentes chamadas de pré-enzimas não apresentam atividade biológica mas quando clivadas por outras proteases ativas as tornam ativas.

Segundo os resultados obtidos, houve em algumas amostras segundo tempo de incubação, um aumento das atividades da fosfolipase A_2 e da trombina-símile no veneno proteolizado; isto sugere que toxinas enzimáticas das classes acima descritas que inicialmente estiveram inativas foram ativadas pelo processo de proteólise. Possivelmente essas atividades podem estar

relacionadas por mudanças da estrutura/conformação das enzimas PLA₂ e trombinas-símile que inicialmente já apresentavam atividade enzimática.

Apesar do longo período de indução de proteólise, ainda foi detectada atividades das serinoproteases (trombina-símile) e das metaloproteases (atividade gelatinase). Assim os dados sugerem que pode haver isoformas de ambas proteases que são resistentes ao processo proteolítico.

No caso das metaloproteases, é importante salientar que houve perda da atividade hemorrágica, mas preservando a atividade proteolítica (zimograma da gelatina), sugerindo que a região das proteases que participa da atividade do processo hemorrágico é mais fácil de ser destruída pelas proteases endógenas do veneno.

Quando o organismo é exposto pela primeira vez a um antígeno ele desencadeia uma resposta imune chamada antigenicidade.

O linfócito T reconhece o antígeno que no presente trabalho são as amostras do veneno de *C.d.ruruima* T0 e T6, onde as células apresentadoras de antígenos (APCs) realizam a degradação do antígeno reduzindo à epítomos, que em seguida são apresentados aos linfócitos T auxiliares (células CD4), que desencadeiam a produção de linfócitos B. Uma vez reconhecidos os epítomos, os linfócitos B desencadeiam a resposta imune aos antígenos exógenos, produzindo no primeiro contato anticorpos de classe IgM, e a partir de um segundo contato anticorpos da classe IgG (FEILI-HARIRI *et al.*, 2005).

Assim para gerar uma resposta humoral específica contra uma antígeno protéico, só é necessário uma parte dele: o epítomo.

Estudos relacionados à composição do veneno das serpentes do gênero *Crotalus* da América do Sul demonstram que o maior constituinte do veneno é a neurotoxina **Crotoxina** (CTX), descrita pela primeira vez por Slotta; Fraenkel-Conrat (1938).

A crotoxina maior constituinte do veneno é um bloqueador pré-sináptico que impede a liberação da acetilcolina, um neurotransmissor que estimula a

contração da musculatura esquelética (HAWGOOD; SÁ 1979; BON *et al.*, 1979).

Estudos relatam que a crotoxina *in natura* age sobre as células do sistema imune inibindo a resposta imunológica (SAMPAIO *et al.*, 2001).

A crotoxina *in natura* tem efeito inibitório na resposta imune humoral por interferir com a síntese de anticorpos das classes imunoglobulinas IgG, (CARDOSO; MOTA. 1997), e a crotapotina inibe a produção de linfócitos T (GARCIA *et al.*, 2001).

No presente estudo foi avaliada a produção de anticorpos gerados pelo contato de antígenos (epítomos) apresentados ao sistema imune pelo veneno *in natura* e/ou proteólizado do veneno de *C.d.ruruima*.

Os camundongos foram expostos ao antígeno T0 (*in natura*) e T6 (proteolizado), para a indução da resposta imune.

No teste de neutralização da letalidade os camundongos que foram imunizados com antígeno T0 e que, receberam a dose desafio de 5 DL₅₀, estes não resistiram e vieram a óbito observando-se uma forte dificuldade de respirar devido a ação bloqueadora pré-sináptica da crotoxina inibindo a liberação do neurotransmissor acetilcolina.

A morte dos camundongos sugere uma baixa produção de anticorpos neutralizantes da atividade neurotóxica do veneno, efeito produzido pelo bloqueio da resposta imune pela crotoxina *in natura*.

Os resultados observados sugerem que os camundongos imunizados com T0 não produziram um plasma experimental com boa taxa de anticorpos, devido a ação da crotoxina e da crotapotina que inibiram a produção de anticorpos e a produção de linfócitos T, dessa forma todos os camundongos foram a óbito.

Já os camundongos que foram imunizados com T6, os antígenos apresentaram sua estrutura/conformação alterada e devido a esse fato com uma baixa toxicidade neurotóxica. Assim o maior constituinte do veneno, a crotoxina, apresenta-se com sua estrutura/conformação modificada devido ao processo de proteólise do veneno, diminuindo assim sua função biológica, mas foram preservados e/ou gerados epítomos lineares, conformacionais e neo-epítomos que foram reconhecidos pelo sistema imune levando à produção de mais anticorpos neutralizantes da atividade letal da dose (10 µg) do veneno utilizado.

A utilização de doses maiores de veneno poderia nos fornecer dados para conhecer a real potência neutralizante da atividade letal do plasma hiperimune experimental obtido, utilizando como antígeno o veneno proteolizado de *C.d.ruruima* já que os camundongos imunizados com esse antígeno foram melhor protegidos da atividade letal do veneno e não foram a óbito.

Embora os dados experimentais obtidos sugerem que o veneno proteolizado apresenta-se como melhor antígeno quando comparado com o veneno *in natura*, precisa-se mais dados experimentais para estabelecer o real potencial biotecnológico do veneno hemorrágico proteolizado de *C.d.ruruima* para a produção de soros anticrotálicos mais potentes e/ou para o desenvolvimento de vacinas para uso veterinário e/ou humano.

15. CONCLUSÃO

- O perfil molecular do veneno de *C.d.ruruima*, nas condições redutoras ou não redutoras após processo de proteólise pelas proteases endógenas metalo e serinoproteases em tampão glicina pH 8,3, apresentou diferenças quantitativas nas proteínas de 50 KDa, 30 KDa e 14 KDa, sugerindo perda da estrutura pela quebra de ligações e com a liberação de peptídeos.
- No processo de proteólise do veneno, as serino e metaloprotease de *C.d.ruruima* apresentaram perda de atividade biológica devido a quebra das ligações peptídicas alterando a estrutura/conformação delas.
- A proteólise “*in vitro*”, segundo o tempo de incubação a 37 °C leva a perda, total das atividades fosfolipásicas A₂ e hemorrágica e parcial das atividades neurotóxica e letal.
- O veneno hemorrágico proteolizado usado como antígeno, induz uma melhor resposta imune humoral com a produção de plasma hiperimune com maior eficácia neutralizante da atividade letal quando comparado com a resposta imune humoral induzido pelo veneno *in natura*.
- A proteólise do veneno hemorrágico pode apresentar e/ou gerar epítomos e/ou lineares, conformacionais com a capacidade de induzir uma boa resposta imune humoral na produção de anticorpos neutralizantes das atividades biológicas do veneno crotálico.
- A destruição da crotoxina pelo processo proteolítico, diminui o efeito letal e neurotóxico do veneno, mas potencializa uma boa resposta imune humoral.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, Abul K.; LICHTMAN, Andrew H.; POBER, Jordan S. ***Imunologia Celular e Molecular***. 6 ed. Rio de Janeiro: Revinter, 2006

ADAME, B.L.; SOTO, J.G.; SECRAW, D.J. PEREZ, J.C.; GLENN, J.L.; STRAIGHT, R.C. ***Regional variation of biochemical characteristics and antigenicity in great basin rattlesnake (Crotalus viridis lutosus) venom***. Comp. Biochem. Physiol. 97b: 95-110,1990.

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

BAIRRO, A. ***Groxin, a new neurotoxin of Crotalus durissus terrificus venom***. Acta Physiol. Latinoamer, 11: 224, 1961.

BARRABIN, A. GRUTHUSEN, J.; ZEPADA, H. and SCHWARTZMAN, R.J. ***Gyroxin, a Toxin from the venom of Crotalus durissu terrificus, Is a Trombin-Like Enzyme***. Toxicon, 26: 953-960, 1978.

BARRAVIERA, B.; BONJORNIO JÚNIOR, J.C.; ARARAKI, D.; DOMINGUES, M.A.C.; PEREIRA, P.C.M.; MENDES, M.P.; MACHAO, J.M.; MEIRA, D.A.A. – ***Retrospectivi study of Crotalus snake bites. Analysis of the hepatic necrosis observed in inoe patient***. Ver. Soc. Bras. Med. Trop. 22: 5-12, 1989.

BIERBER, A.L & BERGSTRON, J.D. ***Characterization of purified guanine aminohydrolase***. Arch Biochem Biophys. Apr 15;194(1):107-16, 1979.

BON, C.; CHAGEUS, 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.

BOUCHIER, C., BOULAIN, J.C., BON, C., ME'NEZ, A., 1991. ***Analysis of cDNAs encoding the two subunits of crotoxin, a phospholipase A2 neurotoxin from rattlesnake venom: the acidic non enzymatic subunit***

derives from a phospholipase A2-like precursor. *Biochim. Biophys. Acta* 1088, 401–408.

BREITHAUPT, H. **Enzymatic characteristic of *crotalus* phospholipase A₂ and the crotoxin complex.** *Toxicon*, 14: 221-233, 1976.

CALMETTE, A. – **Propriétés du sérum des animaux immunisés contre le venin des serpentes, et thérapeutique de l'envenimation.** *C. R. Acad. Sci.* 68, 720, 1894.

CARDOSO, D.F., MOTA, I., 1997. **Effect of *Crotalus* venom on the humoral and cellular immune response.** *Toxicon* 35, 607–612.

_____, D.F., YAMAGUCHI, I.K., MOURA da SILVA, A.M., 2001. **Produção de soros antitoxinas e perspectivas de modernização por técnicas de biologia molecular.** In: Cardoso, J.L.C., Franca, F.O.S., Wen, F.H., Maí laque, C.M.S., Haddad, V.(Eds.), *Animais Peçonhentos no Brasil. Biologia, Clínica e Terapêutica dos Acidentes*, Sarvier, São Paulo, pp. 367–379.

CHANG CC., LEE JD. **Crotoxin, the neurotoxin of South American rattlesnake venom, is a presynaptic toxin acting like β -bungarotoxin. *Naunyn-Schmiedeberg's*.** *Arch. Pharmacol.*, 1977, 296, 159-68.

CAMARA, P.R., ESQUISATTO, L.C., CAMARGO, E.A., RIBELA, M.T., TOYAMA, M.H., MARANGONI, S., De Nucci, G., Antunes, E., 2003. **Inflammatory oedema induced by phospholipases A₂ isolated from *Crotalus durissus* sp. in the rat dorsal skin: a role for mast cells and sensory C-fibers.** *Toxicon* 41, 823–829.

CAMPBELL, J.A.; LAMAR, W.W. **The venomous reptiles of Latin América,** Comstock Publishing Associates, New York, 1989.

CUPO, P.; AZEVEDO-MARQUES, M.M.; HERING, S.E. ***Clinical and laboratory feature of South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*) envenimation in children.*** *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 82: 924-929, 1988.

DIAS DA SILVA, W.; GUIDOLIN, R.; RAW, I.; HIGASHI, H.G.; CARICATI, C.P.; MORAIS, J.F.; LIMA, M.L.S.R.; YAMAGUCHI, I.K.; NISHIKAWA, A K;

STEPHANO, M.A.; MARCELINO, J.R.; PINTO, J.R.; SANTOS, M.J. **Cross-reactivity of horse monovalent antivenoms to venoms of ten *Bothrops* species**. Men. Inst. Butantan, 51: 153-168, 1989.

FINNEY, D.J. **Probit analysis**. 3 Ed. Cambridge: Cambridge University Press, 1971.

FRAENKEL-CONRAD, H. **Snake venom neurotoxins related to phospholipase A₂** *J. Toxicon* Ver. 1: 205-221. 1982.

FAURE, G.; BON, C. **Crotoxin, A phospholipase A₂ neurotoxin from the South America rattlesnake *Crotalus durissus terrificus***. Purification of several isoforms and a comparison of their molecular structure and of their biological activities. **Biochem**, 27 (2): 730-738, 1987.

FOX J. W. ; SERRANO S. M. Insights into and speculations about snake venom metalloproteinase (SVMP) synthesis, folding and disulfide bond formation and their contribution to venom complexity. **The FEBS journal** 275(12); 3016-30, 2008.

FOX J. W. ; SERRANO S. M. Timeline of key events in snake venom metalloproteinase research. **Journal of Proteomics** 72; 200-209, 2009.

FOX, J. W. ; SERRANO, M. T. Structural considerations of the snake venom metalloproteinases, key members of the M12 reprotolysin family of Metalloproteinases. **Toxicon** 45; 969-985, 2005.

_____ ; GUILAUME, J.L.; CAMOIN, L.; SALIOU, B. and BON, C. **Multiplicity of acidic subunit isoforms of crotoxin, the phospholipase A₂ neurotoxin from *Crotalus durissus terrificus* venom, results from posttranslation modifications**. *Biochem*, 30(32): 8074-8083, 1991.

GENÉ, J.A.; ROY, A.; ROJAS, G.; GUTIÉRREZ, J.M.; CERDAS, L. **Comparative study on coagulant, defibrinating, fibrinolytic and fibrinogenolytic activities of Costa Rican crotaline snake venoms and their neutralization by a polyvalent antivenom**. *Toxicon*, 27: 841-848, 1989.

GONÇALVES, J.M. and VIEIRA, L.G. **Estudos sobre venenos de serpentes brasileiras I**. Análise eletroforética. *Ana. Acad. Bras. Ciên.* 22: 141, 1950.

GOPALAKRISHNAKONE, P., HAWGOOD, B.J., 1984. **Morphological changes induced by crotoxin in murine nerve and neuromuscular junction.** *Toxicon* 22, 791–804.

HABERMANN, E.; HARDT, K.L. 1972. **A sensitive and specific plate test for the quantitation of phospholipase .** *Anal. Biochem.* 50, 163-173.

HAIAN FU, ROMESH R. SUBRAMANIAN, SHANE C. MASTERS. **Proteins: Structure, Function, and Regulation** Annual Review of Pharmacology and Toxicology, April 2000, Vol. 40, Pages 617-647 (doi: 10.1146/annurev.pharmtox.40.1.617)

HARRIS, J.B. **Polypeptides from Snake Venoms which act on nerve and muscle.** In: PROGRESS IN MEDICAL CHEMISTRY (Ed. G.P. Ellis and G.B. West. Elsevier Sci. Publishers B.V.), VOL. 21, p. 65-109, 1984.

HAWGOOD, B.J., SANTANA DE SA´, S., 1979. **Changes in spontaneous and evoked release of transmitter induced by crotoxin complex and its component phospholipase A2 at the frog neuromuscular junction.** *Neuroscience* 4, 293–303.

HENDON, R.A., Fraenkel-Conrat., **Biological roles of the two components of crotoxin,** *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 68 (1971) 1560– 1563.

HOGUE, A. R., 1965. **Preliminary account on Neotropical Crotalinae** (Serpentes: Viperidae). *Memóriasdo Instituto Butantan*, 32:109-84.

IWANGA, S. ; SUZUKI, T. **Enzymes in Snake venomom Venom.** In: **Snake. Handbook of Experimental Pharmacology.** Lee, C.Y. vol. 52, cap. 4, pp 105. Springer-Verlag Berli Heidelberg-new York. 1979.

IWANGA, SUZUKI.; OHSHIMA, I. **Proteases from the venom of Agkistrodon halys blomhoffii.** In: Lorand, L. (Ed). *Methodos in Enzimology* vol XLVB. Academic Press. 1976.

JANEWAY, C.A.; TRAVERS, P.; WALPORT, M. ; SHLOMCHIK, M. **Imunologia: O sistema Imune na saúde e na doença,** ARTMED, 6ª Ed., Porto Alegre – RS 2002.

JORGE, M.T., RIBEIRO, L.A., 1992. **The epidemiology and clinical picture of an accidental bite by the South American rattlesnake (*Crotalus durissus*).** Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo 34, 347–354.

KARLSSON, E. **Chemistry of protein toxic in snake venom.** In Lee, C.Y. Ed. Handbook of experimental pharmacology, p. 159-219. Springer- Velag Berlin Heidelberg, 1979.

LAEMMLI, U.K. **Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.** Nature, 27: 680-685, 1970.

LAURE, C.J. (1990) *Crotalus durissus terrificus* Venom: **Crotoxin and Inter-Cro** Mem.Inst.Butantan Vol.52 (Supl.) p.17-19.

LENCHOW, D.J.; WALUNAS, T.L. ; BLUESTONE, J.A. **CD28/B7 System of T cell costimulation.** *Ann Review of Immun.* 1996 Apr; 14: 233-258.

LÓPEZ-LOZANO, J.L.; MUNIZ, E.G.; BUHRNHEIM, P.F. **Intraspecific variations in the biological properties of venoms of adult rattlesnake (*Crotalus durissus ruruima*)** from Roraima State, Brazil. Resumos do IV Simpósio da SBTx, 134-135, 1996.

_____; SOUSA, M.V.; RICART, C.A.; CHÁVEZ-OLÓRTEGUI, C.; SANCHEZ, E.F.; MUNIZ, E.G.; BUHRNHEIM, P.F. **Ontogenetic variation of metalloproteinases and plasma coagulant activity in venoms of wild *Bothrops atrox* specimens from Amazonian rain Forest.** *Toxicon* 40; 997-1006, 2002.

NELSON, D.L.; COX, M.M., **Lehninger Principles of Biochemistry.** 4. ed. Sarvier, Wisconsin, 2007.

MANDELBAUM, F.R.; REICEL, A.P.; ASSAKURA, M,T. Some physical and biochemical characteristics of HF₂, one of the hemorrhagic factors in the venom of *Bothrops jararaca*. In: Animal, plant and microbial toxins, Vol.1, pp3. (Ohsaka, A.; Hayashi, K and Sawai, Y. eds), London, Plenum Press. 1976.

MARKLAND, F. **Snake venoms and the hemostatic system.** *Toxicon* 36:1749-1800, 1998.

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

MCDEVITT, H.O. **Discovering the Role of the Major Histocompatibility Complex in the Immune Response.** *Ann. Review of Immun.* 2000 Apr; 18:1-17.

MIKOLA, J. **Proteinases, Peptidases and inhibitors of Endogenous Proteases in Germinating Seeds.** In: SEEDS PROTEINS. Daussant, J.; mossè, J. and Vaughan, J., eds, p. 35-51. Annual Proceedings of the phytchymical society of Europe. Acad. Press., 1983.

MINTON, S.A.; WEINSTEIN, S.A. **Geografic and ontogenic variation in venom of the western diamondback rattlesnake (*Crotalus atrox*).** *Toxicon*, 24: 71-80, 1986.

MONTERREY, F. **Trabajo de Grado.** Facultad de Ciencias, UCV, Caracas, Venezuela, 2001.

MOSMANN, T.R.; CHERWINSKI, H.; BOND, M.W.; GIEDLIN, M.A.; COFFMAN, R.L. **Two types of murine T cell clone. I. Definition according profiles of lymphokine activities and secreted proteins.** *J. Immunol.* 1986 136: 2348-2357.

MUNIZ, G.M. **VENENO DE CROTALUS DURISSUS RURUIMA-Propriedades moleculares, farmacológicas e imunológicas** (Dissertação de Mestrado - UFAM). 2002 80p.

NASCIMENTO, S.P. **Aspectos epidemiológicos dos acidentes ofídicos ocorridos no Estado de Roraima,** Brasil, entre 1992 e 1998. *Cad. Saúde Pública*, Rio de Janeiro, 16: 271-276, 2000.

NEURAT, H.; WALSH, K.A. **Role of Proteolytic Enzymes in Biological Regulation (A Review).** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 73 (11): 3825-32, 1976.

_____. **Evolution of Proteolytic Enzymes.** *Sci.* 224: 350-7, 1983.

OWNBY, C. L.; GEREN, C.R. ***Pathogenesis of hemorrhage induced by hemorrhagic proteinase IV from timber rattlesnake (Crotalus horridus horridus) venom.*** *Toxicon*, 25: 517-526, 1987.

PEAKMAN, M.; VERGANI, D. ***Imunologia Básica e Clínica.*** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999.

PRADO – FRANCESCHI; J. VITAL-BRAZIL. ***O Convulxin, a new toxin from the venom of the South America rattlesnake Crotalus durissus terrificus.*** *Toxicon*, 19: 875-887, 1981.

QUIJADAS-MASCARENÃS; JULIA E. FERGUSON; CATHARINE E; POOK MARIA DAS GRAÇAS SALOMÃO; ROGER S; THORPE E WOLFGANG. Phylogeographic patterns of trans-Amazonian vicariants and Amazonian biogeography: the Neotropical rattlesnake (*Crotalus durissus* complex) as an example. *Journal of Biogeography (J. Biogeogr.)* (2007) 34, 1296–1312.

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

RESENDE, C.C.; ARAÚJO, F.A.A.; SALLENAVE, R.S.U.R. ***Análise epidemiológica dos acidentes ofídicos.*** Ministério da Saúde, 37p, 1989

ROCHA, H.; ROHAT, C.; MIRANDA, F.; Lissitzky, S. and Edman, P. ***The amino acid sequence of neurotoxin I of Androctonus astralis Hector.*** *Eur. J. Biochem.* 17, 262, 1970.

ROSENFELD, G. ***Symptomatology, pathology and treatment of snakes bites in south America.*** In: W. Bucherl and Bucley. Ed. *Venomous animals and their venoms. Vol. II. Venomous Vertebrates.* Academic Press, New York, 345-383, 1971.

SCHAGGER, H., JAGOW, V.G., 1987. ***Tricine-sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa.*** *Anal. Biochem.* 166, 368–379.

RUSSELL, F.E. **Snake venom poisoning in the United States of America.** In: Bon, C., Goyffon, M. (Eds.), *Envenomings and Their Treatments*. Editions Fondation Marcel Mérieux Lyon, 235-245, 1996.

RYEN, 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.

SCHENBERG, S. **Análise de crotamina no veneno individual de cascavéis recebidas pelo Instituto Butantan.** *Mem. Inst. Butantan*, 29: 213-226, 1959.

SCHWARTZ, R.H. **T Cell Energy.** *Ann. Review of Immun.* 2003 Apr; 21: 305-334.

SLOTTA, K. H.; FRAENKEL-CONRAT, H. L. **Schlangengifte, III:** Mitteilung Reinigung und Krystallization des Klapperschlangengiftes. *Ber. Dich. Chem. Ges.* 71: 1076-1081.1938.

STRICHATZ, G.R.; WANG, G.K. **Rapid voltage-dependent dissociation of scorpion α -toxins coupled to Na channel inactivation in myelinated nerve.** *J. Gen. Physiol.* 88: 413-435, 1986.

THEAKSTON, R.D.G.; REID, H.A 1983. Development of simple standard assay procedures for the characterization of snake venoms. *Bulletin of the World Health Organization*, 61: 949 – 956.

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.

_____; 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.

TU, A.T. Chemistry of rattlesnake venoms. In: **Rattles venoms, their actions and treatment.** New York, Marcel Dekker. 1982.

VANZOLINI, P. E., (1986). **Paleoclimas e Especiação em Animais da América do Sul Tropical**. São Paulo: Associação Brasileira de Estudos do Quaternário.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Progress in the characterization of venoms and standardization of antivenoms**. Geneva, W.H.O. 1981, nº 58.

YANG, C.C. **Chemistry and evolution of toxins in snakes venoms**. *Toxicon* 12, 1, 1974.

ZAHA, A., FERREIRA, H. B., PASSAGLIA, L. M. P. **Biologia Molecular Básica**. 3.ed. Porto Alegre, Editora Mercado Aberto, 2003.

ZLOTKIN, E.; FRAENKEL, F.; MIRANDA, F. and LISSITZKY, S. (1971) **The effect of scorpion on blowfly larvea** – a new method for the evolution of scorpion venoms potency *Toxicon*, 9: 1-8.