

Luciana Curtolo de Barros

Atividade coagulante e da toxicidade da gioxina nativa e irradiada com Cobalto-60 isolada do veneno de *Crotalus durissus terrificus*.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Doenças Tropicais da Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, para obtenção do título de Mestre em Doenças Tropicais.

Orientador: Professor Doutor Rui Seabra Ferreira Junior

Botucatu

2010

Luciana Curtolo de Barros

Atividade coagulante e da toxicidade da gioxina nativa e irradiada com Cobalto-60 isolada do veneno de *Crotalus durissus terrificus*.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Doenças Tropicais da Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, para obtenção do título de Mestre em Doenças Tropicais.

Orientador: Professor Doutor Rui Seabra Ferreira Junior

Botucatu

2010

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. E TRAT. DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: *ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE*

Barros, Luciana Curtolo de.

Atividade coagulante e da toxicidade da gioxina e irradiada com Cobalto-60 isolada do veneno de *Crotalus durissus terrificus* / Luciana Curtolo de Barros. - Botucatu, 2010

Dissertação (mestrado) – Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, 2010

Orientador: Rui Seabra Ferreira Junior

Assunto CAPES: 40100006

1. Toxicidade – Teses. 2. Cobra – Veneno.

Palavras-chave: Atividade coagulante; Gioxina; Irradiação; Toxicidade.

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

Leonardo da Vinci

DEDICATÓRIA

Não há palavras que possam descrever meu profundo agradecimento aos meus pais, que merecem mais do que eu este título que agora obtenho, pelo esforço e dedicação incansáveis em auxiliar minha formação profissional e em me ensinar sempre bons valores.

Dedico também aos meus irmãos, que durante todos estes anos confiaram em mim, compreendendo meus ideais e minha ausência.

Ao meu sobrinho João Vitor, a maior alegria da minha vida.

Ao Airton, pela transparência, sinceridade e por ter me ensinado o valor de uma amizade verdadeira, onde sempre existiu o respeito e a confiança mútua e também por ter estado presente nos momentos mais críticos e mais felizes destes últimos anos.

Amo todos vocês!!!

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Doutor Rui Seabra Ferreira Junior, meu orientador, pela amizade, constante incentivo e apoio, por acreditar na minha capacidade de trabalho e por me mostrar sempre o melhor caminho, principalmente nos momentos de dúvida. Obrigada por tudo!!!

Ao Professor Doutor Benedito Barraviera pela orientação, confiança, paciência, amizade e principalmente pelas preciosas oportunidades de desenvolvimento profissional e pessoal.

Aos funcionários, pós-graduandos, aprimorandos e estagiários do Centro de Estudos de Venenos e Animais Peçonhentos.

Ao Professor Doutor Andreimar Martins Soares, do Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto-USP, pelo isolamento e purificação da giroxina.

À Professora Doutora Izolete Aparecida Thomazini Santos, do Laboratório de Hemostasia da Faculdade de Medicina de Botucatu-UNESP, por sua colaboração nos ensaios de Atividade Coagulante.

Á Professora Doutora Márcia Gallacci, do Departamento de Farmacologia do Instituto de Biociências de Botucatu – UNESP, por sua colaboração nos ensaios de Atividade Neurotóxica “*in vitro*”.

Às minhas melhores amigas (Marina, Juliana, Jacke e Josi) pelo total apoio, confiança, dedicação e por dividirem comigo os melhores momentos da minha vida.

A todos aqueles que, direta ou indiretamente, colaboraram para a realização deste trabalho, meu sincero obrigada.

SUMÁRIO

SÚMARIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	13
2.1. Objetivos gerais	14
2.2. Objetivos específicos	14
3. MATERIAL E MÉTODOS	15
3.1. Material	16
3.1.1. Veneno	16
3.1.2. Animais	16
3.1.3. Plasma humano	16
3.1.4. Fonte de irradiação	16
3.2. Métodos	17
3.2.1. Extração de veneno	17
3.2.2. Isolamento da serinoprotease	17
3.2.3. Irradiação da serinoprotease	18
3.2.4. Análise eletroforética	18
3.2.5. Focalização isoeletrica	20
3.2.6. Determinação da sequência N-terminal	22
3.2.7. Especificidade sobre substratos sintéticos cromogênicos	22
3.2.8. Atividade coagulante sobre o plasma humano	23
3.2.9. Toxicidade <i>in vivo</i>	23
3.2.10. Toxicidade <i>in vitro</i>	24
3.2.11. Aprovação do projeto de pesquisa pelo Comitê de Ética de pesquisa em Experimentação Animal	25
3.2.12. Análise estatística	25
4. RESULTADOS	26
4.1. Isolamento e purificação da serinoprotease	27
4.2. Avaliação do grau de pureza da serinoprotease	28
4.3. Determinação da sequência N-terminal	30

4.4. Análise eletroforética da gioxina irradiada com Cobalto-60	31
4.5. Especificidade sobre substratos sintéticos cromogênicos	31
4.6. Atividade coagulante sobre o plasma humano	34
4.7. Toxicidade <i>in vivo</i>	39
4.8. Toxicidade <i>in vitro</i>	39
5. DISCUSSÃO	41
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	51
7. RESUMO	54
8. ABSTRACT	56
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58
10. ANEXO	68

1.INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

Os venenos de serpentes representam uma mistura muito rica de compostos orgânicos e inorgânicos. Seus componentes ativos podem ser utilizados como ferramentas importantes para a elucidação de diversos mecanismos farmacológicos, destacando-se entre eles, a neurotransmissão na junção neuromuscular, a função e a estrutura de receptores nicóticos, a cascata de coagulação, a fibrinólise, o sistema complemento e o processo inflamatório (1).

Sabe-se que mais de 100 espécies de serpentes peçonhentas produzem substâncias capazes de causar alterações no sistema hemostático de suas presas, geralmente pequenos mamíferos, por meio de uma variedade de mecanismos (2). Estes componentes podem estimular ou inibir várias etapas da hemostasia, como interferindo na cascata de coagulação sanguínea, causando fibrinólise e hipotensão, inclusive alterando a integridade vascular e função plaquetária (3, 4).

Dentre todas estas substâncias, os principais componentes ativos, derivados de venenos de serpentes, que interferem na hemostasia (5), podem ser agrupados em:

- a) Pró-coagulantes: pertencem a este grupo os ativadores de fatores V, X, IX e a protrombina, além de proteases com ação similar à trombina, conhecidas como enzimas trombina-símile;
- b) Anticoagulantes: ativadores da proteína C, proteínas que ativam a formação do complexo fator IX/X, inibidores de trombina e fosfolipase A₂;
- c) Fibrino(geno)líticos: proteínas que degradam o fibrinogênio e/ou a trombina e as toxinas ativadoras de plasminogênio;
- d) Proteínas que interagem com superfícies vasculares, denominadas hemorraginas;

e) Toxinas com atividade sobre as plaquetas que induzem ou inibem a agregação plaquetária;

f) Ativadores de proteínas do plasma, denominadas inibidores Serpinas.

A possibilidade de utilizar o veneno de serpentes em distúrbios hemostáticos vem sendo amplamente investigada. O primeiro registro experimental de alteração da coagulação induzido pelos venenos data de 1781, no entanto, sem dúvida este efeito já era conhecido clinicamente pelos sintomas apresentados pelas vítimas de picadas (6).

Desde então, inúmeros estudos foram realizados visando entender como os diferentes venenos agem na coagulação sanguínea (7), qual a sua importância no quadro clínico dos envenenamentos (8, 9) e como os soros anti ofídicos neutralizam essa atividade (10, 11).

Entre as diversas proteínas existentes nos venenos encontram-se diferentes tipos de proteases que exibem atividade enzimática sobre vários tipos de substratos. Os dois grupos mais estudados destas proteases são as serinoproteases (12) e as metaloproteases (13), as quais são enzimas responsáveis pela interrupção da hemostasia, ou seja, manutenção das propriedades hemodinâmicas do sangue envolvendo tanto a formação do coágulo quanto sua dissolução. Entretanto, vários outros tipos de enzimas são encontrados nos venenos, como: fosfolipases, fosfodiesterases, colinesterases, aminotransferases, L-amino ácido oxidases, catalases, ATPases, hialuronidases, NAD nucleosidases e L-glicosaminidases (4).

As serinoproteases são enzimas proteolíticas encontradas desde vírus e bactérias, até em seres eucarióticos (14). São abundantes especialmente nos venenos de serpentes da família Viperidae, onde constituem aproximadamente 20% do total de proteínas. Elas pertencem a uma família de peptidases conhecidas como Tripsina S1 de clan SA (15, 16).

Estas enzimas têm como propriedade estrutural um mecanismo catalítico altamente conservado, possuindo no sítio ativo um resíduo de serina que é estabilizado pela presença de resíduos de histidina e ácido aspártico, formando assim a tríade catalítica Ser₁₉₅, His₅₇, Asp₁₀₂, representada na Figura 1, que as classificam como serinoproteases (2, 17).

Apesar do mecanismo catalítico semelhante, as serinoproteases diferem na especificidade sobre substratos tais como fibrinogênio, cininogênio e plasminogênio (3,18). Desempenham ainda muitos papéis biológicos, principalmente na digestão (tripsina e quimotripsina), hemostasia (fatores de coagulação), resposta imune medida por IgA (triptase e quimase encontradas em células citotóxicas e em mastócitos) entre muitas outras atividades importantes. Por essa razão essas proteases têm relevância farmacêutica e biomédica como alvo de drogas relacionadas à hemostasia e ativação do sistema complemento.

Alguns exemplos de medicamentos derivados de proteínas extraídas do veneno de serpentes e “explorados” pela indústria farmacêutica estão listados na Tabela 1.

Medicamento/Nome comercial®	Função/Tratamento	Fonte	Referências
Captopril / Capoten	Inibidor da enzima conversora de angiotensina / Hipertensão arterial	<i>Bothrops jararaca</i>	(19-21)
Eptifibatide / Integrilin	Inibidor de agregação plaquetária / Infarto do miocárdio	<i>Sistrurus miliaris barbouri</i>	(22-24)
Tirofiban / Aggrastat	Inibidor de Glicoproteína IIb-IIIa / Síndrome coronariana aguda	<i>Echis carinatus</i>	(25-27)
Arwin / Ancrod	Inibidor de fibrinogênio / Derrame	<i>Agkistrodon rhodostoma</i>	(28-30)
Batroxobin / Defibrase	Inibidor de trombina e protrombina / Acidente vascular cerebral	<i>Bothrops moojeni</i>	(31, 32)
Batroxobin / Reptilase	Diagnóstico de desordens na coagulação sanguínea	<i>Bothrops atrox</i>	(33-35)

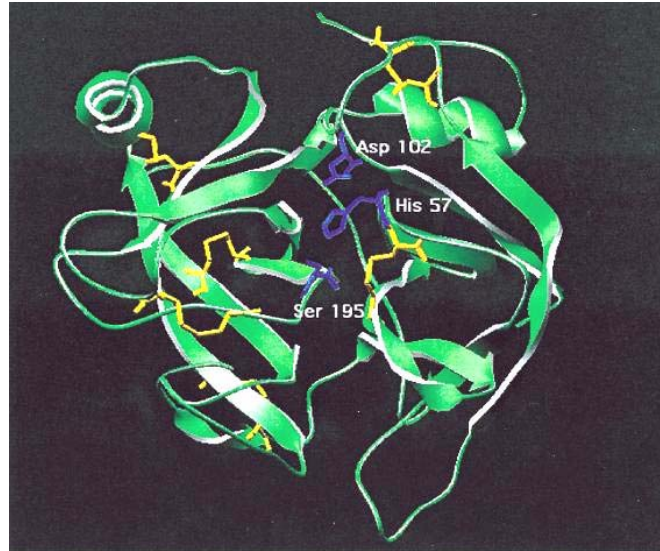
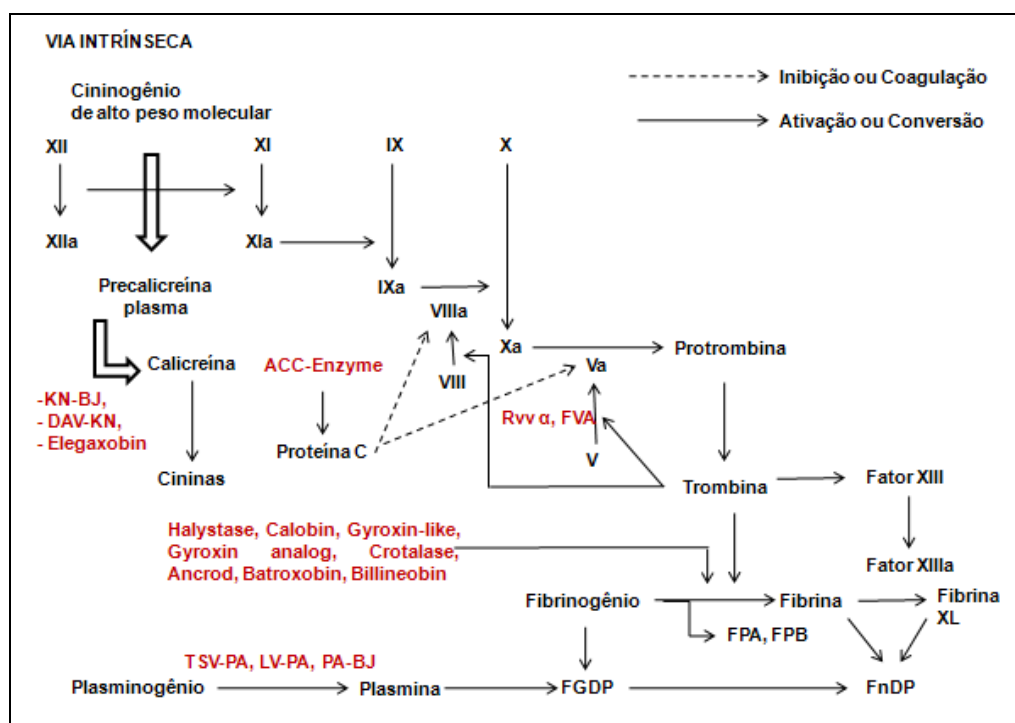


Figura 1. Sítio ativo de uma serinoprotease, demonstrando a tríade catalítica Ser₁₉₅, His₅₇, Asp₁₀₂ em azul e as pontes dissulfeto em amarelo (3).

As serinoproteases do veneno de serpentes (SVSPs – *Snake venom serine proteases*) apresentam muitas dessas funções, sendo bem estabelecidas suas ações na cascata de coagulação, principalmente na sua via intrínseca (2), como é possível verificar na Figura 2.



FndP: produtos da degradação da fibrina; **FGDP:** produtos da degradação do fibrinogênio; **FPA:** fibrinopeptídeo A; **FPB:** fibrinopeptídeo B; **KN-BJ:** *Bothrops jararaca*; **DAV-KN:** *Agkistrodon acutus*; **Eleganobin:** *Trimeresurus elegans*; **ACC-Enzyme** (enzima ativadora da Proteína C): *Agkistrodon contortrix contortrix*; **Rvvα:** *Daboia russelli siamensis*; **FVA** (enzima ativadora do fator V): *Vipera lebetina*; **Halystase:** *Agkistrodon halys blomhoffi*; **Calobin:** *Agkistrodon caliginosus*; **Gyroxin-like:** *Crotalus durissus terrificus*; **Gyroxin analog:** *Lachesis muta muta*; **Crotalase:** *Crotalus adamanteus*; **Ancrod:** *Agkistrodon rhodostoma*; **Batroxobin:** *Bothrops atrox*; **Billineobin:** *Agkistrodon billineatus*; **TSV-PA:** *Trimeresurus stejnegeri*; **LV-PA:** *Lachesis muta muta*; **PA-BJ:** *Bothrops jararaca*.

Figura 2. Local de ação de algumas serinoproteases do veneno de serpentes (destacado em vermelho) agindo na cascata de coagulação. Modificado de Markland, 1998 (2).

Estas enzimas sozinhas não são letais, mas contribuem para o efeito tóxico quando associadas com outras proteínas do veneno. Além disso, as serinoproteases afetam diversos passos da cascata de coagulação, muitas vezes não especificamente através da degradação proteolítica, mas seletivamente por meio da ativação ou inativação de fatores da coagulação envolvidos na agregação plaquetária, coagulação e fibrinólise (12).

Algumas serinoproteases presentes nos venenos ofídicos são altamente específicas em atuar no fibrinogênio convertendo-o em fibrina. Quando as cadeias de aminoácidos do fibrinogênio são expostas a essas enzimas há uma liberação de fibrinopeptídeos A e/ou B, dependendo do local em que o fibrinogênio é clivado, observando-se a formação de um coágulo de fibrina (atividade trombina-símile) ou ainda a destruição da molécula de fibrinogênio (atividade fibrinogenolítica) (36).

Duas das principais proteínas envolvidas na coagulação sanguínea são a trombina e o fibrinogênio. A trombina é uma enzima multifuncional presente nos mamíferos que desempenha importante função na homeostasia. Além de atuar sobre o fibrinogênio produzindo fibrina, a trombina também é um potente ativador de plaquetas, promovendo a ativação e a agregação das mesmas. Apresenta também propriedades anticoagulantes, uma vez que interage com a trombomodulina e ativa a proteína C, importante fator anticoagulante (18). Já o fibrinogênio é uma proteína de 340 kilodaltons (kDa) circulante no plasma, principalmente sintetizada pelos hepatócitos, composta de duas moléculas simétricas com dois pares de três cadeias polipeptídicas denominadas A α (70 kDa), B β (56 kDa) e C γ (48 kDa), ligadas umas as outras por pontes de dissulfeto (Figura 3) (37, 38).

A conversão do fibrinogênio em fibrina é decorrente da ação da trombina que libera fibrinopeptídeos A e B clivando a Arg16-Gly17 e a Arg14-Gly15 da porção amino-terminal das cadeias A α e B β , respectivamente. A trombina também transforma o zimogênio do fator XIII da cascata de coagulação em sua forma ativa XIIIa, que tem como função estabilizar o coágulo de fibrina (36).

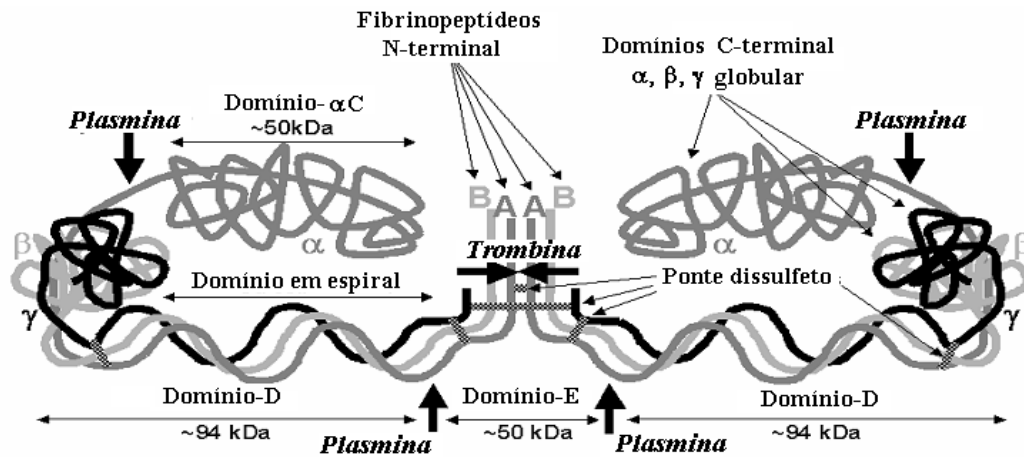


Figura 3. Diagrama esquemático de degradação do fibrinogênio demonstrando as cadeias α , β e γ ligadas por ponte de dissulfeto e liberação de fibrinopeptídeos. Modificado de Herrick *et al.*, 1999 (37).

As enzimas presentes no veneno de serpentes que mimetizam algumas funções da trombina humana e animal, como a capacidade de converter o fibrinogênio em um coágulo de fibrina são as serinoproteases denominadas trombina-símile (17, 39, 40). O interesse por estas enzimas com funções semelhantes à trombina ganhou nova importância devido à possibilidade de sua utilização no tratamento de doenças trombóticas e como anticoagulantes (41). Assim a partir da década de 70 os fatores responsáveis por esses efeitos começaram a ser isolados e caracterizados (42).

Essas enzimas possuem algumas propriedades físico-químicas em comum: são glicoproteínas, com cadeia única e massa molecular calculada entre 28 a 60 kDa; são ativas em substratos sintéticos específicos de trombina, com sítio ativo nas posições Ser₁₉₅, His₅₇, Asp₁₀₂; apresentam entre si um alto grau de homologia, aproximadamente de 60 a 68%, no entanto mostram menos de 40% de homologia com a trombina endógena humana (2).

Sendo assim, as atividades das enzimas trombina-símile não são exatamente idênticas às desempenhadas pela enzima multifuncional trombina (43), como demonstrado na Tabela 2.

Tabela 2. Presença ou ausência de algumas especificidades funcionais da trombina humana comparadas à enzimas trombina-símile isoladas de venenos de serpentes. Adaptado de Stocker *et al.*, 1982 (36)

Substrato	Produto	Trombina humana	Batroxobin (<i>Bothrops atrox</i>)	Trombocitina (<i>Bothrops atrox</i>)
Cadeia A α do fibrinogênio	Monômeros de fibrina I	+	+	+
Cadeia B β do fibrinogênio	Monômeros de fibrina II	+	-	-
Plaquetas	Agregação plaquetária	+	-	+
Fator XIII	XIIIa	+	-	+
Fator VIII	VIIIa	+	-	+
Fator V	Va	+	-	+
Fator VIIIa	Inativação	+	-	+
Fator Va	Inativação	+	-	+

(+) atividade presente, (-) atividade ausente

Uma vez que não ativam o fator XIII da cascata de coagulação e liberam preferencialmente apenas um fibrinopeptídeo, as enzimas trombina-símile produzem monômeros de fibrina que não formam ligações cruzadas, levando a formação de coágulos de fibrina que são rapidamente dissolvidos (44, 45).

Atualmente, aproximadamente 100 enzimas de serpentes foram descritas com atividade trombina-símile e apenas 21 destas tiveram suas sequências de aminoácidos determinadas parcial ou completamente (46). Estas foram isoladas do veneno de serpentes dos gêneros *Agkistrodon*, *Bitis*, *Bothrops*, *Cerastes*, *Crotalus*, *Lachesis*, *Trimeresurus* (47).

No Brasil, estudos vêm sendo conduzidos com a serinoprotease giroxina, que é uma enzima isolada do veneno de *Crotalus durissus terrificus* e apresenta atividades trombina-símile e neurotóxica. Esta possui um único domínio tripsina semelhante ao subdomínio serinoprotease da trombina apresentando atividades esterásica e amidásica (48) que tem a propriedade de clivar o fibrinogênio liberando preferencialmente o fibrinopeptídeo A da cadeia A α do fibrinogênio.

Raw *et al.*, (49), em 1986 determinaram por análise em eletroforese resultante de três etapas cromatográficas de purificação (precipitação com sulfato de amônio, Sephadex G-75 e Sepharose-1,4-butanediol-diglycil-p-aminobenzamidina) que a giroxina é uma proteína de cadeia única, apresentando uma massa molecular estimada em 34 kilodaltons (kDa), uma alta atividade coagulante sobre o fibrinogênio humano com pH ótimo de 8,0.

Além de atuar sobre a coagulação a giroxina apresenta uma marcante atividade neurotóxica diferenciando das outras serinoproteases existentes, ocasionando uma síndrome denominada “rolamento em barril”. Esta síndrome foi observada pela primeira vez por Barrio (50) em 1961, que descreveu os efeitos da giroxina isolada do veneno de *Crotalus durissus terrificus*, entretanto, somente em 1975 este conceito foi introduzido na neurociência (51). Este mesmo comportamento também pode ser observado após administrações de alguns peptídeos, tais como: somatostatina, arginina-vasopressina (52) e endotelina-3 (53).

Após sua administração endovenosa ou intraperitoneal em ratos e camundongos, a giroxina induz sintomas como falta de coordenação dos movimentos resultando em perda de equilíbrio, e após uma breve fase tônica o animal gira ao longo do eixo longitudinal do corpo lembrando o rolar de um barril, fazendo o animal girar sempre para o mesmo lado com 3% de exceções (54). Alguns animais morrem, em geral por dificuldades respiratórias, enquanto outros se recuperam ficando completamente assintomáticos em aproximadamente uma hora. Muitos animais que não desenvolvem o rolamento

em barril apresentam um ou mais sintomas, tais como imobilidade, ataxia, extensão dos membros posteriores e limpeza excessiva (55).

Por outro lado, várias pesquisas têm sido realizadas com as toxinas animais de uma maneira geral, no sentido de se obter um produto menos tóxico, mas que preserve, no entanto, suas propriedades biológicas e imunogênicas originais. Neste sentido podemos citar o uso de formaldeído (56), carboximetil-celulose (57), irradiação com raios X (58), ultravioleta (59), glutaraldeído (60) e outros reagentes, com resultados variáveis. Dentre estes métodos, a radiação gama produzida por Cobalto-60 (^{60}Co) vem demonstrando excelentes resultados na atenuação da toxicidade dos venenos de serpentes, sendo capaz de diminuí-la, sem alterar as propriedades biológicas e sem adicionar nenhuma substância nova, tornando-se extremamente útil na minimização de suas atividades tóxicas (61-65).

A radiação gama é uma radiação eletromagnética cujas características são a alta energia associada à ausência de massa. Possui elevado poder de penetração e capacidade de promover ionizações e excitações no meio onde se propaga. Classificada como radiação ionizante, atravessa qualquer tipo de matéria removendo elétrons da camada periférica dos átomos, resultando na formação de pares de íons positivos e negativos. Este tipo de radiação eletromagnética pode ainda levar a uma excitação onde elétrons das camadas externas dos átomos absorvem energia suficiente para atingir o estado energético mais alto, permanecendo associados ao átomo e emitindo energia sob a forma de luz visível ou ultravioleta (66).

A irradiação de proteínas em seu estado seco ou em solução leva a alterações químicas, físico-químicas e estruturais bastante significativas. Estas mudanças resultam em uma diminuição e inativação de algumas atividades biológicas destas proteínas, tais como atividades tóxicas, enzimáticas e/ou imunológicas (67). Murata *et al.*, (68), estudando a detoxificação do veneno de *Crotalus durissus terrificus*, em solução, através da irradiação com raios gama em várias doses, concluíram que a dose de 2,0 Kilograys (kGy) é a mais eficaz na detoxificação deste veneno.

O isolamento de toxinas ou proteínas objetivando elucidar as ações dos raios gama na detoxificação de venenos torna a gioxina um modelo ideal para o estudo dos efeitos dessa radiação, podendo diminuir ou seus efeitos tóxicos observados em animais. Este modelo poderá ser utilizado para outras tantas importantes toxinas, que apesar de inegáveis efeitos farmacológicos úteis ao homem, ainda possuem elevada atividade tóxica, o que inviabiliza seu uso muitas vezes.

2.OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

O presente estudo teve como objetivo avaliar os efeitos *in vitro* e *in vivo* da gioxina nativa e irradiada com Cobalto-60 (^{60}Co) isolada e purificada do veneno de *Crotalus durissus terrificus*.

2.2. Objetivos específicos

- Isolamento e purificação da gioxina a partir do veneno de *Crotalus durissus terrificus*;
- Irradiação da enzima com ^{60}Co ;
- Comparação da dose coagulante mínima da gioxina nativa e irradiada;
- Comparação da toxicidade *in vivo* da gioxina nativa e irradiada;
- Avaliação da toxicidade *in vitro* da gioxina nativa.

3.MATERIAL E MÉTODOS

3.MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material

3.1.1. Veneno

O veneno utilizado foi obtido a partir do “pool” de venenos extraídos de serpentes adultas da subespécie *Crotalus durissus terrificus*, de ambos os sexos e microchipadas individualmente, criadas e mantidas no serpentário do Centro de Estudos de Venenos e Animais Peçonhentos (CEVAP), localizado na Fazenda Experimental Lageado - UNESP, Campus de Botucatu.

3.1.2. Animais

Foram utilizados camundongos Swiss, de ambos os sexos, com aproximadamente 21 dias de idade, com peso entre 18g a 22g, mantidos em gaiolas abastecidas com água e ração *ad libitum* em ambiente com temperatura controlada ($24 \pm 2^\circ\text{C}$) e ciclo claro-escuro (12/12 horas), fornecidos pelo Biotério Central da UNESP, Campus Botucatu.

3.1.3. Plasma humano

O plasma humano utilizado para os experimentos de coagulação foi obtido de doadores de sangue voluntários, de ambos os sexos, com idades compreendidas entre 18 a 42 anos, que se dispuseram a doar sangue para o Banco de Sangue da Divisão Hemocentro da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP.

3.1.4. Fonte de irradiação

Foi utilizada uma fonte de Cobalto-60 (Gama Cell 220, Atomic Energy Agency of Canada), disponível no Departamento de Aplicações de Técnicas Nucleares do IPEN/CNEN – USP, São Paulo.

3.2. Métodos

3.2.1. Extração do veneno

A extração do veneno foi realizada segundo metodologia desenvolvida pela equipe técnica do Laboratório de Extração de Venenos do CEVAP. Após a anestesia da serpente em gás carbônico (CO₂), o veneno foi coletado em microtubos tipo Eppendorf®, congelado a -20°C, liofilizado, pesado, aliquotado, identificado e estocado em freezer a -20°C.

3.2.2. Isolamento da serinoprotease

Aproximadamente 1,0g do veneno de *Crotalus durissus terrificus* foi suspenso em tampão Formiato de amônio (0,05 M pH 3,5) e a seguir fracionado em coluna de gel filtração Sephadex G-75 (110 x 4,0 cm) previamente equilibrada com o mesmo tampão. Foram coletados cerca de 10 mL/tubo em fluxo de 30mL/h a temperatura ambiente em sistema de coletor de frações LKB-Pharmacia, para a obtenção das frações de diferentes pesos.

Posteriormente, para a obtenção da serinoprotease trombina-símile do veneno de *Crotalus durissus terrificus*, os tubos com atividade coagulante resultantes da primeira etapa cromatográfica foram reunidos (100 mg da serinoprotease concentrada em 5 mL), centrifugados a 12.000 *xg* por 10 minutos e aplicados em coluna de afinidade Benzamidina-Sepharose 6B (8,5 x 2,5 cm) previamente equilibrada com tampão Tris-HCl 0,05M pH 7,4 (tampão 1). A eluição foi realizada com 30 mL de Tris-HCl 0,05M pH 7,4 + NaCl 0,5M (tampão 2) e 20 mL de glicina 0,02M pH 3,2 (tampão 3) sendo que as frações eluídas em glicina foram neutralizadas diretamente no tubo coletor com 400 µL de Tris-HCl 1,0M pH 9,0. O fluxo de coleta foi de 30 mL/hora, sendo coletados 3,0 mL/tubo à temperatura de 25°C.

Para a análise do grau de pureza, aproximadamente 1mg da serinoprotease isolada foi diluída em 250µL de ácido trifluoracético (TFA) 0,1% (v/v) e submetida em um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência em coluna de fase reversa (RP-HPLC) C-2/C-18 (2,0 x 25,0cm). A eluição da amostra foi inicialmente realizada em ácido trifluoracético (TCA) 0,1% (v/v),

seguindo com gradiente de concentração linear de acetonitrila 70% em um fluxo de 1mL/min à temperatura ambiente. O pico único da serinoprotease em questão foi separado e liofilizado para a determinação da atividade coagulante e toxicidade.

O isolamento desta serinoprotease foi realizado em colaboração com o Prof. Dr. Andreimar Martins Soares do Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto-USP.

3.2.3. Irradiação da serinoprotease com Cobalto-60 (⁶⁰Co)

As amostras isoladas foram diluídas em solução de cloreto de sódio 0,15M, acidificada com ácido clorídrico 1,0M até o pH de 3,5 e centrifugada a 17.300 *xg* durante 10 minutos a 4°C. Estas foram submetidas à fonte de ⁶⁰Co com uma taxa/dose de 2,36 kGy/h, nas doses de 0,5; 1,0 e 2,0 kGy e concentração de 2mg/mL. A irradiação das amostras ocorreu sempre na presença de oxigênio, a temperatura ambiente e de forma homogênea e ininterrupta (69).

3.2.4. Análise eletroforética

As eletroforeses em gel de poliacrilamida a 13,5% na presença de SDS (SDS-PAGE) em um sistema desnaturante e reduzido foram realizadas conforme a técnica descrita por Laemmli (70).

Para o gel de separação foram utilizadas as seguintes soluções:

- Tampão de separação Tris-HCl pH 8,8;
- SDS (Dodecil sulfato de sódio) (Sigma Chem. Co) a 10%;
- Água destilada;
- Acrilamida:Bis 30:0,8 (Sigma Chem. Co);
- Persulfato de amônio (Sigma Chem. Co) a 10%;
- Temed (N',N',N',N' - tetrametilenodiamino) (Sigma Chem. Co).

Para o gel de empilhamento (4%) foram utilizados:

- Tampão de empilhamento Tris-HCl pH 6,8;
- SDS (Dodecil sulfato de sódio) (Sigma Chem. Co) a 10%;
- Água destilada;
- Acrilamida:Bis 30:08 (Sigma Chem. Co);
- Persulfato de amônio (Sigma Chem. Co) a 10%;
- Temed (N',N',N',N'- tetrametilenodiamino) (Sigma Chem. Co).

Uma solução contendo Tris-base, glicina e SDS 10% com pH 8,6 foi utilizada como tampão de corrida para o cátodo e a mesma solução para o ânodo.

As amostras contendo 8 μ g de serinoprotease nativa e 6 μ g de serinoprotease irradiada (0,5; 1,0 e 2,0 kGy) foram dissolvidas em 20 μ L do tampão de amostra constituído por:

- β -mercaptoetanol (Sigma Chem. Co);
- SDS (Dodecil sulfato de sódio) (Sigma Chem. Co) 10%;
- Tampão de empilhamento Tris-HCl pH 6,8;
- Glicerol;
- Azul de bromofenol (Sigma Chem. Co);
- Água destilada.

Em seguida, as amostras foram aquecidas por cinco minutos a 70°C. A eletroforese foi conduzida a uma voltagem constante de 150V, com a amperagem aberta (corrente variável), por aproximadamente 15 minutos. Após o término desta corrida, a fonte foi programada para uma voltagem de 200V, com a amperagem aberta por 40 minutos até o indicador azul de bromofenol alcançar a porção inferior do gel.

Terminada a migração das proteínas, o sistema foi desligado e o gel foi transferido para um recipiente contendo a solução corante composta por

Coomassie Brilliant Blue R250 (Sigma Chem. Co), metanol, água destilada e ácido acético. Este gel foi corado por aproximadamente quarenta minutos e então descorado com uma solução contendo ácido acético, etanol comercial e água destilada. Esta solução foi trocada periodicamente até que as bandas fossem visualizadas.

O peso molecular foi estimado pelo padrão de peso molecular (Sigma Chem. Co), contendo as seguintes proteínas:

- soroalbumina bovina (66 kDa);
- ovoalbumina (45 kDa);
- gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase (36 kDa);
- anidrase carbônica (29 kDa);
- tripsinogênio (24 kDa);
- inibidor de tripsina (20.1 kDa) e
- α -lactoalbumina (14.2 kDa).

A análise eletroforética da toxina nativa e irradiada foi realizada em colaboração com o Prof. Dr. Andreimar Martins Soares do Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto-USP.

3.2.5. Focalização isoeétrica

A eletrofocalização da serinoprotease nativa isolada e purificada do veneno de *Crotalus durissus terrificus* foi realizada segundo o método descrito por Vesterberg (71), com algumas modificações como descrito a seguir. O experimento foi realizado no Departamento de Física e Química da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP, com a colaboração da Profa. Dra. Eliane C. A. Braga.

O gel foi preparado a 7% (m/v) em acrilamida (solução estoque: bis-acrilamida 0,8:30), contendo:

- 1,3g de sacarose;
- 650 μ L de anfólitos (Pharmacia);
- 40% de pl variável de 3,0 a 10,0;
- 0,17% de Temed (N',N',N',N'- tetrametilenodiamino) (v/v) e
- 0,075% de persulfato de amônio (m/v)

A solução do gel foi completada para um volume final de 10mL de água destilada e polimerizada em placa de vidro 12x14cm utilizando como suporte uma borracha em forma de U. O gel foi colocado sobre uma placa refrigerada ligada a um banho termostaticado a 4°C. A placa milimetrada foi previamente umedecida com glicerina, para melhor refrigeração do gel. Dois *strips* da Pharmacia Biotech® foram utilizados para conectar o gel e os eletrodos de platina, sendo o cátodo embebido em uma solução de NaOH 1M e o ânodo em ácido fosfórico 1M. Os eletrodos de platina foram centralizados sobre as tiras de papel e o sistema então fechado. A fonte de alta voltagem foi ajustada para valores máximos de 500V, 10mA, 3 Watts e 30 minutos para a realização de uma pré-corrída.

Em seguida, as amostras foram aplicadas sempre no cruzamento de duas linhas azuis, exatamente sobre a linha mais central do gel. A fonte foi programada para 500V, 15mA, 10 Watts durante cinco horas. O final da corrida foi determinado quando a fonte marcasse uma alta voltagem e uma baixa amperagem (cerca de 1mA).

Após a focalização isoeétrica, foram seccionados cerca de 1cm de largura (no sentido do comprimento) de cada extremidade do gel e colocados em tubos de ensaio contendo 200 μ L de água destilada para a leitura do pH após duas horas em repouso. Em seguida, foi construído o gráfico de determinação do gradiente de pH. O restante do gel contendo as amostras foi fixado em solução de ácido tricloroacético por 30 minutos, prosseguindo com a

utilização de um kit para coloração por prata seguindo o protocolo da Pharmacia Biotech®.

3.2.6. Determinação da sequência N-terminal

A análise da sequência N-terminal da serinoprotease purificada nativa foi realizada em um sequenciador automático de proteínas da Shimadzu (modelo PPSQ-23A). Uma solução com aproximadamente 1mg/mL da enzima foi aplicada no sequenciador e sua sequência foi determinada pelo método de degradação de Edman (72).

Após a determinação da sequência da serinoprotease, foi comparada a sua homologia de aminoácidos com outras quatro serinoproteases anteriormente sequenciadas e obtidas no NCBI (*National Center for Biotechnology Information*), a saber: Trombina-símile semelhante à gioxina de *Lachesis muta muta*; Ancrod de *Agkistrodon rhodostoma*; Crotalase de *Crotalus adamanteus* e Gioxina da *Crotalus durissus terrificus*. As seqüências foram analisadas por alinhamento usando programa BLAST (73). Estes experimentos foram realizados em colaboração com o Prof. Dr. Andreimar Martins Soares do Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto-USP.

3.2.7. Especificidade sobre substratos sintéticos cromogênicos

A habilidade da enzima nativa purificada em hidrolisar os substratos cromogênicos S-2238 (para enzima trombina-símile) e S-2288 (para serinoproteases) (Chromogenix) na concentração final de 0,5mM foi realizada em leitor de microplacas Thermomax (Molecular Devices, Menlo Park, CA) e monitorada a 405nm por 20 minutos a uma temperatura de 37°C. Quando indicado os inibidores de serinoprotease (Fenilmetanosulfonilfluoridro (PMSF) 20mM e benzamidina 150mM) e metaloprotease (Ácido etilendiaminotetracético (EDTA) 20mM e 1,10-fenantrolina 10mM), os tampões com diferentes pHs (3,5; 4,5; 5,5; 6,8; 7,5; 8,5; 11; 13) e metais divalentes 10mM (Ca^{2+} ; Ba^{2+} ; Mn^{2+} ; Cu^{2+}) foram pré-incubados por 20 minutos

a 37°C com 20µg/mL de gioxina nativa, sendo que a reação enzimática foi desencadeada pela adição do substrato cromogênico S-2238 (74).

3.2.8. Atividade coagulante sobre o plasma humano

A atividade coagulante é caracterizada pelo imediato aparecimento da rede de fibrina, sendo que a Dose Coagulante Mínima (DCM) é definida pela quantidade de uma determinada enzima capaz de coagular 200 µL de plasma em 60 segundos (75).

As amostras de sangue foram coletadas de doadores sadios em presença de citrato de sódio a 3,8%, na proporção de 9:1 e centrifugadas a 2500 *xg* a 4°C por 15 minutos para a obtenção do plasma. Para a dosagem do nível de fibrinogênio contido no plasma foi utilizado um analisador automático de coagulação sanguínea (Sysmex CA-1500).

A atividade foi realizada utilizando 200 µL de plasma humano citratado incubados em diferentes concentrações da gioxina nativa e irradiada (3 a 25 µg) diluídas em água milliQ com diferentes pHs (4,0; 6,0 e 7,4) na concentração de 1mg/mL. Esta mistura foi incubada em banho-maria a 37°C e o tempo de formação da rede de fibrina foi cronometrado. Cada dose foi efetuada em triplicata. O período máximo de observação para a formação da rede de fibrina foi de cinco minutos, após este tempo é caracterizado como sem atividade coagulante.

Os testes de atividade coagulante da gioxina foram realizados em colaboração com o Profa. Dra. Izolete Aparecida Thomazini Santos do Laboratório de Hemostasia da Faculdade de Medicina de Botucatu-UNESP.

3.2.9. Toxicidade *in vivo*

O comportamento característico causado pela gioxina é o rolamento em barril. Para observação desse efeito neurotóxico foram utilizados camundongos Swiss, de ambos os sexos, pesando entre 18 a 22g, divididos em dois grupos (Grupo 1: gioxina nativa, Grupo 2: gioxina irradiada), cada um constituído de 12 animais.

A toxina nativa e irradiada (0,5 kGy) na concentração de 1mg/mL foi administrada via intraperitoneal nas doses de 2 a 12µg/20g de peso corpóreo. Os animais ficaram sob observação e filmagem por aproximadamente 90 minutos para registro do efeito (55).

3.2.10. Toxicidade *in vitro*

A atividade da giroxina nativa sobre as contrações musculares foi avaliada em preparações nervo frênico músculo diafragma de camundongos por meio de registros miográficos *in vitro*. O experimento foi realizado no Departamento de Farmacologia do Instituto de Biociências de Botucatu – UNESP, com a colaboração da Profa. Dra. Márcia Gallacci.

Os camundongos foram sacrificados por deslocamento cervical e exanguinado por secção dos grandes vasos cervicais. Após toracotomia ampla, a preparação do nervo frênico-músculo diafragma foi removida (76). Durante este período a preparação foi umedecida intermitentemente com solução nutriente de Ringer mM constituída por: NaCl 135; KCl 5; MgCl₂ 2; NaHCO₃ 15; Na₂HPO₄ 1; CaCl₂ 2; e glicose 11. A seguir, o hemidiafragma esquerdo foi cortado em forma de triângulo e montado verticalmente em cuba para órgão isolado, contendo 10 mL de solução nutriente, constantemente borbulhada com carbogênio (95% O₂ e 5% CO₂). O bordo costal diafragmático foi conectado a um suporte de vidro em forma de L. O centro tendíneo do músculo foi conectado a um transdutor de tensão isométrica (Grass, FT03), acoplado a um amplificador de sinal (Gould Systems, 13-6615-50). Os registros foram efetuados em um computador, através de um sistema de aquisição de dados (Gould Systems, Summit ACQUIRE e Summit DataViewer).

Para evocar as contrações musculares através de estímulos indiretos, a extremidade livre do nervo frênico foi aspirada por um eletrodo de platina “de sucção”, que se encontrava acoplado a um estimulador elétrico (Grass, S88). O eletrodo de referência, constituído por um fio de platina enrolado no suporte de vidro em forma de L, servia também para fixar o músculo.

As contrações musculares foram evocadas indiretamente, por pulsos elétricos retangulares com duração de 0,5 ms, intensidade supramáxima e frequência de 0,2 Hz.

Em todos os experimentos, as preparações foram mantidas a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ e submetidas a um período de estabilização de 45 minutos, durante os quais o líquido nutriente foi trocado a cada 15 minutos. A seguir, foram registrados 15 minutos de contração controle (na ausência de qualquer toxina). Subseqüentemente, a gioxina nativa foi preparada individualmente nas concentrações de 25 μg e 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de solução nutriente contidas na cuba, e então foi adicionada ao banho onde foi avaliado o decréscimo percentual das contrações indiretas após 90 minutos.

3.2.11. Aprovação do projeto de pesquisa pela Comissão de Ética em Experimentação Animal.

A referida pesquisa foi certificada pela CEEA (Comissão de Ética em Experimentação Animal) no dia 27 de março de 2008 pelo protocolo n° 657, conforme anexo. Convém salientar que a mesma está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) (Anexo).

3.2.12. Análise estatística

A análise dos resultados da especificidade sobre os substratos sintéticos cromogênicos foi realizada através de média e desvio padrão, onde o nível de significância estabelecido foi de $P < 0.05$.

Os resultados referentes à atividade coagulante foram agrupados em média, desvio padrão e erro padrão da média através da análise de variância (ANOVA). Para obter a Dose Coagulante Mínima (DCM) foi utilizado o teste de Análise de Regressão Potencial do tipo: $y = A \cdot x^{-B}$.

Os resultados experimentais do teste de toxicidade *in vitro* foram agrupados em média e erro padrão da média (EPM). As diferenças entre os valores médios foram testadas através do teste "t Student".

4.RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. Isolamento e purificação da serinoprotease

Um perfil típico de cromatografia de gel filtração em coluna Sephadex G-75 do veneno nativo de *Crotalus durissus terrificus* é mostrado na Figura 4, destacando-se quatro picos bem definidos, onde o segundo pico foi eluído na posição correspondente ao peso molecular da enzima trombina-símile de interesse.

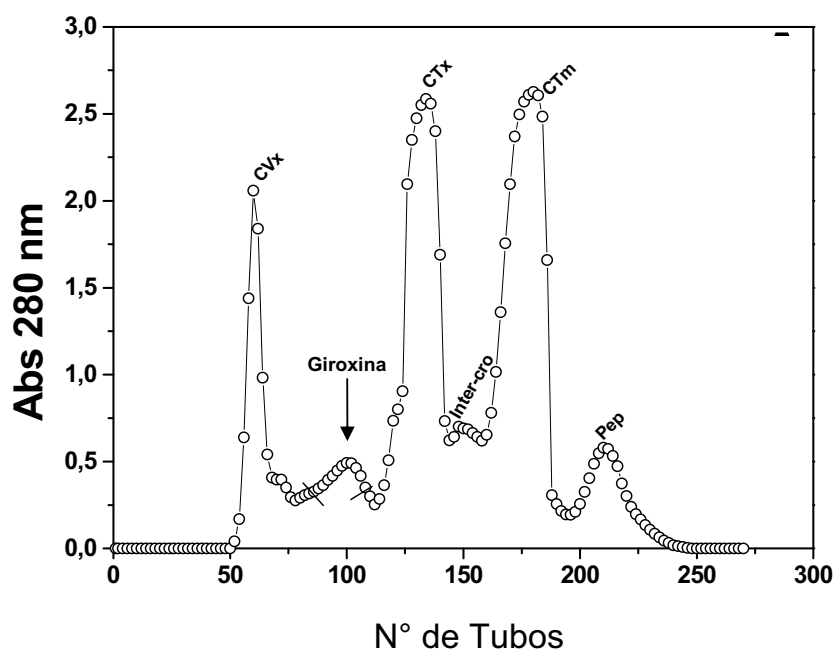


Figura 4. Fracionamento do veneno de *Crotalus durissus terrificus* em coluna de gel filtração por exclusão de peso molecular em Sephadex G-75 revelando quatro picos característicos (CVx: Convulxina, Giroxina, CTx: Crotoxina e CTm: Crotamina). A amostra foi eluída em tampão Formiato de amônio 0,05M pH 3,5 a um fluxo de 30mL/h, coletando-se frações de 10mL/tubo a temperatura ambiente (25°C).

Os tubos com atividade coagulante, contendo 100 mg da amostra do pico II isolados na etapa de gel filtração, foram reunidos e aplicados em coluna de afinidade Benzamidina-Sepharose 6B, gerando três picos de serinoproteases conforme Figura 5.

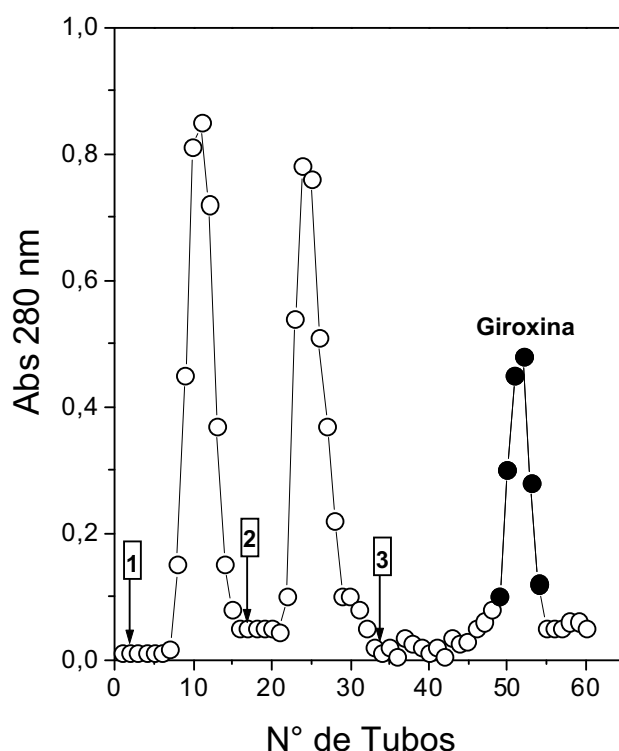


Figura 5: Cromatografia de afinidade em Benzamidina-Sepharose 6B (8,5 x 2,5cm) do pico II isolado por gel filtração. A coluna foi equilibrada com o tampão Tris-HCl 0,05M pH 7,4 (Tampão 1). Amostra: 100mg da amostra isolada do pico II concentrada em 5mL e centrifugada a 12.000 xg por 10 minutos foi aplicada à coluna. A eluição foi feita respectivamente, com 30mL de Tris-HCl 0,05M pH 7,4 + NaCl 0,5M (Tampão 2) e 20mL de Glicina 0,02M pH 3,2 (Tampão 3), sendo as frações eluídas em Glicina, neutralizadas diretamente no tubo coletor com 400µL de Tris-HCl 1,0M pH 9,0. Fluxo de 30mL/hora, sendo coletados 3,0mL/tubo a temperatura ambiente (25°C).

4.2. Avaliação do grau de pureza da serinoprotease

Os tubos com atividade coagulante, resultantes da separação e purificação cromatográfica referentes ao terceiro pico da Figura 5, foram

reunidos e avaliados em relação ao seu grau de pureza. A análise eletroforética realizada em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) a 13,5% revelou o aparecimento de uma única banda, demonstrando o alto grau de pureza obtido pelas etapas cromatográficas, com uma massa molecular de aproximadamente 30 kDa (Figura 6A). A serinoprotease apresentou uma única banda na focalização isoeétrica, confirmando ser uma proteína de cadeia única e com um valor aproximado de 5,5 para o seu ponto isoeétrico (pI) conforme Figura 6B. A cromatografia líquida de alta eficiência em coluna de fase reversa revelou um único pico referente à proteína de interesse que foi eluída em torno de 47 minutos, demonstrando assim, o alto grau de pureza da amostra (Figura 6C).

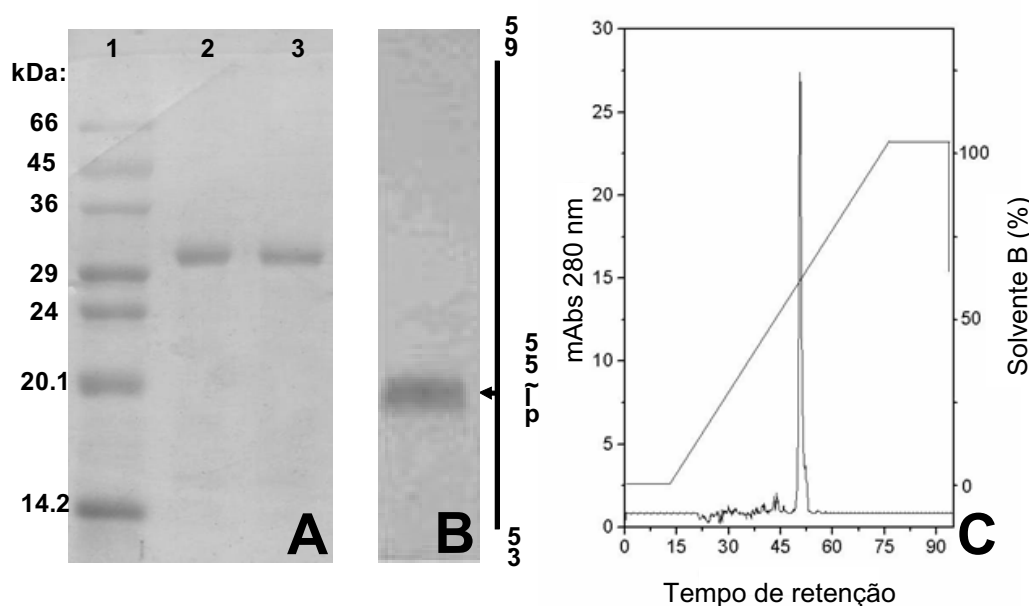


Figura 6. Análise do grau de pureza da serinoproteinase isolada e purificada. (A) Gel de poliacrilamida a 13,5% (SDS-PAGE). (1) Padrão de Peso Molecular e (2, 3) Serinoprotease nativa purificada; (B) Determinação do ponto isoeétrico da enzima trombina-símile nativa através de eletroforese em gel de poliacrilamida. Escala de pHs 3,5 a 9,5; (C) Cromatografia líquida de alta eficiência em coluna de fase reversa C2/C18 (4,6 x 100 mm) de 1mg da proteína purificada revelando um único pico. A coluna foi equilibrada nos solventes de corrida (solvente A: acetonitrila 5%, TFA 0,1%; solvente B: acetonitrila 60%, TFA 0,1%) e a eluição seguiu com um gradiente de

0 – 100% de concentração do solvente B, com um fluxo de 1,0mL/min. durante 110 minutos. A proteína de interesse foi eluída em torno de 47 minutos. Os picos foram monitorados na absorvância de 280nm, e registrados por software Dataq (Dataq, Inc.).

4.3. Determinação da sequência N-terminal

O sequenciamento do N-terminal da serinoprotease purificada foi similar a outras serinoproteases trombina-símile. Os 20 aminoácidos obtidos da giroxina mostraram uma identidade de aproximadamente 100% quando comparadas com as proteínas previamente depositadas no NCBI (National Center for Biotechnology Information) sendo elas: Trombina-símile análoga à giroxina de *Lachesis muta muta*, Ancrod de *Agkistrodon rhodostoma*, Crotalase de *Crotalus adamanteus* e Giroxina de *Crotalus durissus terrificus*, conforme demonstrado na Figura 7.

	10	20	30	40	48
1 Lmm	VIGGDECNIN	EHRFLVALYD	GLSG-TFLCG	GTLINQEWVL	TAQH CNRS
2 Anc	VIGGDECNIN	EHRFLVALYD	GTNW-TFICG	GVLHPEWVL	TAEHCARR
3 Cro	VIGGDECNIN	EHRFLVALYD	YWXQ-XFL		
4 Gyr	VIGGDECNIN	EHRFLVALYE	YWS-ESFL	CGG	
5 Gir	VIGGDECNIN	EHRFLVALYE			

Figura 7. Comparação entre as seqüências N-terminais do sequenciamento da (1-Lmm) trombina-símile análoga à giroxina de *Lachesis muta muta*, (2-Anc) Ancrod de *Agkistrodon rhodostoma*, (3-Cro) Crotalase de *Crotalus adamanteus* e (4-Gyr) Giroxina da *Crotalus durissus terrificus* e (5-Gir) a seqüência obtida por meio do sequenciamento realizado na serinoprotease purificada.

Diante do resultado deste sequenciamento podemos classificar a serinoprotease isolada e purificada do veneno de *Crotalus durissus terrificus* como giroxina.

4.4. Análise eletroforética da gioxina irradiada com Cobalto-60 (^{60}Co).

A mesma metodologia foi utilizada para a análise eletroforética da gioxina irradiada com a fonte de ^{60}Co nas doses de 0,5; 1,0 e 2,0 kGy. O perfil eletroforético das amostras mostrou uma difusão crescente da proteína no gel, à medida que a dose de radiação aumentou.

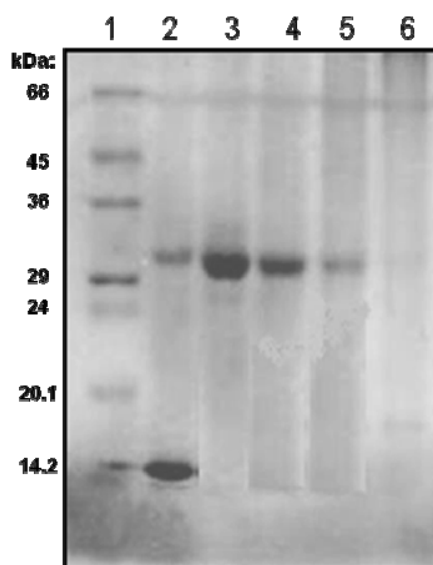


Figura 8. Análise eletroforética da gioxina nativa e irradiada. (1) Padrão de Peso Molecular; (2) Veneno bruto de *Crotalus durissus terrificus*; (3) gioxina nativa; (4) gioxina irradiada 0,5 kGy; (5) gioxina irradiada 1,0 kGy e (6) gioxina irradiada 2,0 kGy.

4.5. Especificidade sobre substratos sintéticos cromogênicos

A gioxina nativa foi capaz de hidrolisar os substratos cromogênicos S-2238 (enzima trombina-símile) e S-2288 (serinoprotease) em uma concentração-dependente (Figura 9A), confirmando ser uma enzima trombina-símile da classe serinoprotease. A atividade enzimática da gioxina sobre o substrato S-2238 foi inibida por PMSF e benzamidina, sendo que estes são considerados inibidores de serinoproteases, enquanto que EDTA e 1,10-fenantrolina não foram capazes de sensibilizar a atividade proteolítica sobre o

substrato, pois são descritos como inibidores de metaloproteases (Figura 9B). A atividade da giroxina foi maior no pH com valores de 5,5 a 8,5. Não houve detecção de atividade da giroxina sobre o substrato S-2238 nos pHs de 3,5; 4,5 e 13 (Figura 9C). Também foi testada a influência de diferentes íons divalentes na hidrólise de S-2238 induzida pela giroxina. Como mostrado na Figura 8D, nenhuma atividade foi observada na presença de Mn^{2+} ou Cu^{2+} , mas com a adição de Ca^{2+} toda a atividade da giroxina sobre o substrato foi restaurada. Em paralelo, a adição de Ba^{2+} não foi capaz de restaurar a atividade da giroxina.

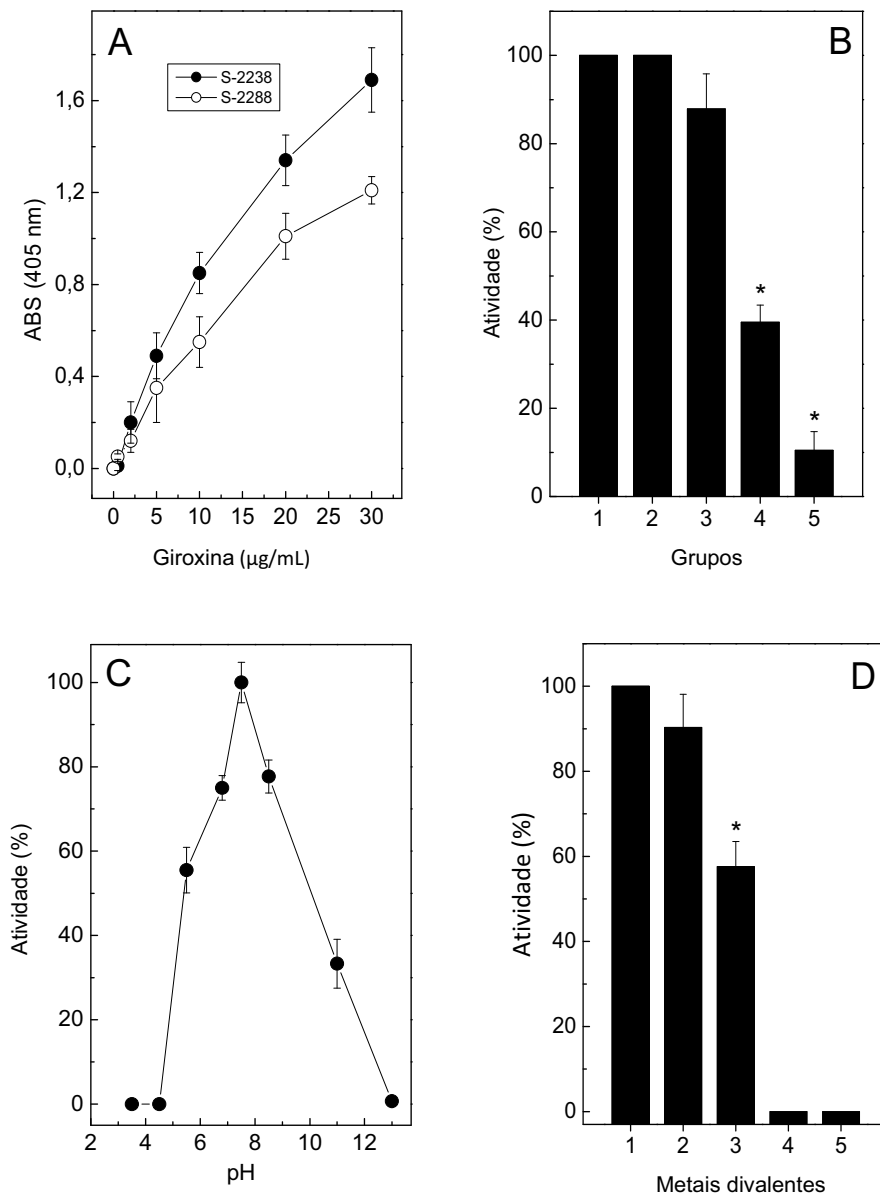


Figura 9. Atividade da gioxina sobre substratos sintéticos cromogênicos (0.5 mM). (A) Hidrólise concentração-dependente de S-2238 e S-2288, (B) Efeito dos inibidores, ausência de inibidor (coluna 1), EDTA 20 mM (coluna 2); 1,10-fenantrolina 10 mM (coluna 3); PMSF 20 mM (coluna 4) ou benzamidina 150 mM (coluna 5), (C) Efeito do pH (3,5; 4,5; 5,5; 6,8; 7,5; 8,5; 11; 13) e (D) Efeito dos metais divalentes 10 mM, ausência de adição (coluna 1), Ca^{2+} (coluna 2), Ba^{2+} (coluna 3), Mn^{2+} (coluna 4), Cu^{2+} (coluna 5) na hidrólise de S-2238 induzida por 20 µg/mL de gioxina nativa após 10 minutos a 37°C. Dados expressados por média \pm desvio padrão de dois experimentos individuais (n=3). (*) representa nível de significância ($P < 0.05$) comparado a coluna 1.

4.6. Atividade coagulante sobre o plasma humano

A giroxina isolada do veneno de *Crotalus durissus terrificus* apresentou alta atividade coagulante sobre o plasma humano, o qual apresentava um nível de fibrinogênio de 292 mL/dL no momento dos testes. A giroxina nativa, em diferentes concentrações, foi capaz de induzir a formação da rede de fibrina e conseqüente formação do coágulo (Figura 10).

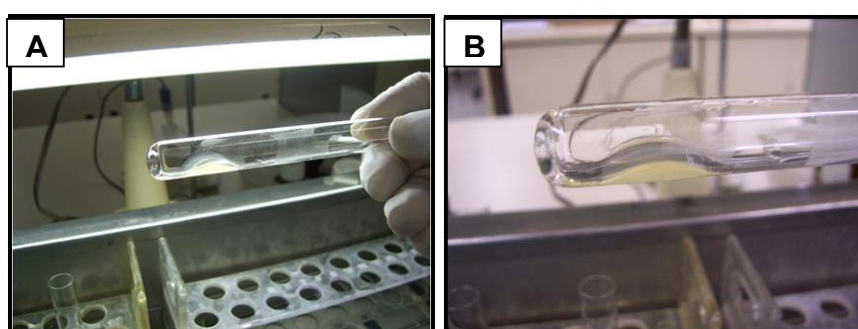


Figura 10. Atividade Coagulante da giroxina nativa. (A) Coágulo de fibrina formado após incubação do plasma humano com giroxina nativa; (B) Detalhe da formação da rede de fibrina.

As concentrações da giroxina nativa (pH 4,0), o tempo de coagulação de cada teste realizado em triplicata e as respectivas médias em segundos, estão listadas na Tabela 3.

Tabela 3. Concentrações da gioxina nativa (pH 4,0) utilizada para a avaliação do tempo de coagulação, média das triplicatas, desvio padrão e erro padrão da média. Intervalo de Confiança 95%.

Concentração (µg)	Média (segundos)	Desvio Padrão	Erro Padrão da Média
5 µg	70	± 2,0	1,15
10 µg	55	± 1,0	0,57
15 µg	45	± 0,0	0,0
20 µg	31,3	± 1,52	0,88
25 µg	28	± 0,0	0,0

A atividade coagulante da gioxina nativa no pH 4,0 também foi confirmada por meio da atividade dose-dependente realizada para obtenção da dose coagulante mínima (DCM) que pela análise de regressão potencial foi determinada em 0,037 µg/µL de plasma humano (Figura 11).

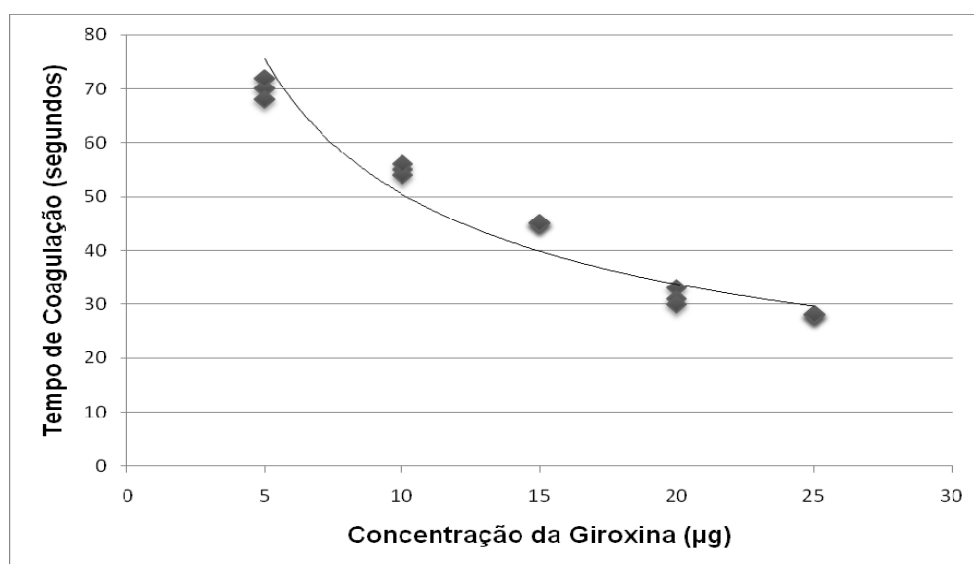


Figura 11. Avaliação da Dose Coagulante Mínima da gioxina nativa (pH 4,0) pela análise de regressão potencial. $y=192,93x^{-0,582}$, $R^2=0,9337$.

As concentrações da gioxina nativa (pH 6,0), o tempo de coagulação de cada teste realizado em triplicata e as respectivas médias estão listadas na Tabela 4.

Tabela 4. Concentrações da gioxina nativa (pH 6,0) utilizada para a avaliação do tempo de coagulação, média das triplicatas, desvio padrão e erro padrão da média. Intervalo de Confiança 95%.

Concentração (μg)	Média (segundos)	Desvio Padrão	Erro Padrão da Média
3 μg	65,3	$\pm 1,52$	0,88
5 μg	36	$\pm 1,0$	0,57
10 μg	23,7	$\pm 0,57$	0,33
15 μg	22,7	$\pm 0,57$	0,33
20 μg	17	$\pm 0,0$	0,0
25 μg	15,7	$\pm 1,15$	0,66

A atividade coagulante da gioxina nativa no pH 6,0 também foi confirmada por meio da atividade dose-dependente realizada para obtenção da dose coagulante mínima (DCM) que pela análise de regressão potencial foi determinada em 0,015 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de plasma humano (Figura 12).

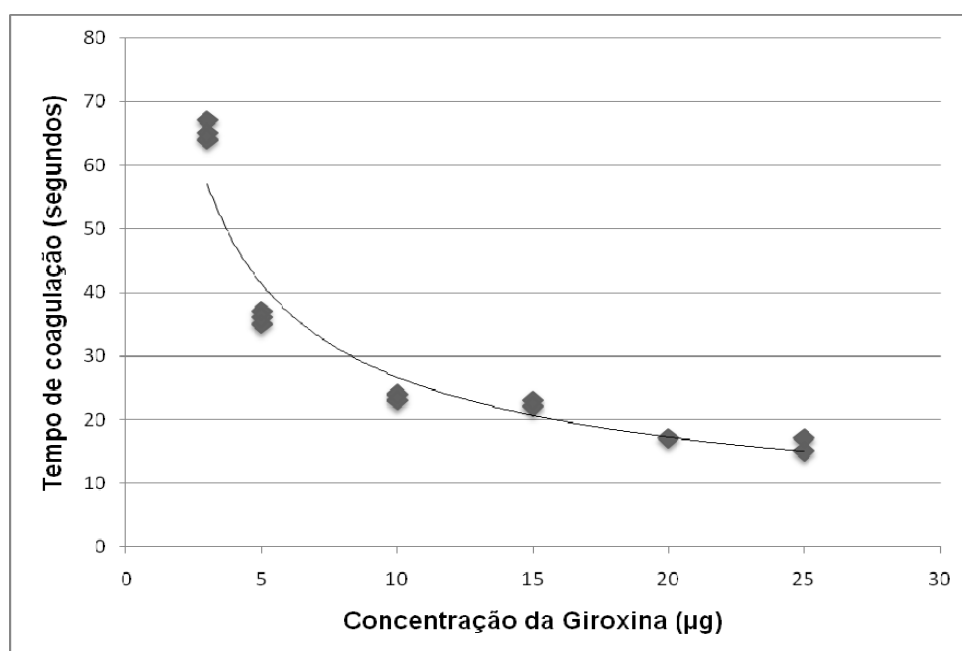


Figura 12. Avaliação da Dose Coagulante Mínima da gioxina nativa (pH 6,0) pela análise de regressão potencial. $y=114,02x^{-0,631}$, $R^2=0,9524$.

As concentrações da gioxina nativa (pH 7,4), o tempo de coagulação de cada teste realizado em triplicata e as respectivas médias estão listadas na Tabela 5.

Tabela 5. Concentrações da gioxina nativa (pH 7,4) utilizada para a avaliação do tempo de coagulação, média das triplicatas, desvio padrão e erro padrão da média. Intervalo de Confiança 95%.

Concentração (µg)	Média (segundos)	Desvio Padrão	Erro Padrão da Média
3 µg	84	± 3,60	2,08
5 µg	50,7	± 0,57	0,33
10 µg	32,7	± 0,57	0,33
15 µg	20	± 0,0	0,0
20 µg	14,7	± 0,57	0,33
25 µg	13,3	±0,57	0,33

A atividade coagulante da gioxina nativa no pH 7,4 também foi confirmada através da atividade dose-dependente realizada para obtenção da dose coagulante mínima (DCM) que pela análise de regressão potencial foi determinada em 0,021 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de plasma humano (Figura 13).

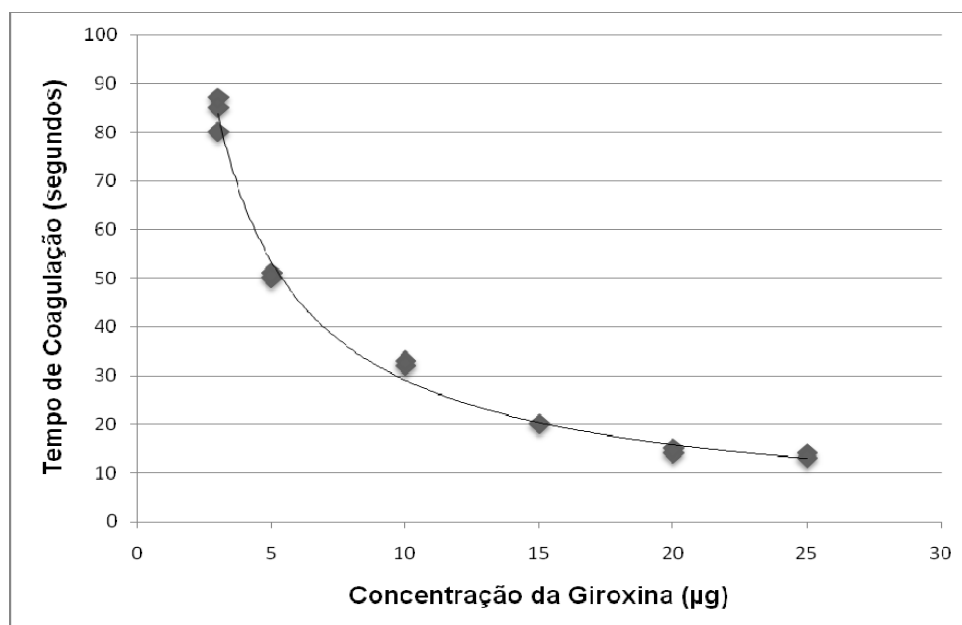


Figura 13. Avaliação da Dose Coagulante Mínima da gioxina nativa (pH 7,4) pela análise de regressão potencial. $y=220,13x^{-0,879}$, $R^2=0,9899$.

A gioxina isolada do veneno de *Crotalus durissus terrificus* e irradiada nas doses de 0,5; 1,0 e 2,0 kGy não apresentou atividade coagulante sobre o plasma humano. Mesmo em diferentes concentrações não foi capaz de induzir a formação da rede de fibrina e conseqüente formação do coágulo (Figura 14).



Figura 14. Atividade Coagulante da giroxina irradiada em diferentes doses de ^{60}Co evidenciando a não formação do coágulo de fibrina após incubação do plasma humano

4.7. Neurotoxicidade *in vivo*

O efeito neurotóxico da giroxina nativa nas doses de 0,1 a 0,6 $\mu\text{g/g}$ (2 a 12 $\mu\text{g}/20\text{g}$ de camundongo) foi observado e filmado durante 90 minutos e ocorreu entre 5 e 15 minutos após a sua administração intraperitoneal. Os sintomas observados foram agitação inicial seguida de aumento na respiração, extensão dos membros posteriores e limpeza excessiva. Os animais não apresentaram o rolamento em barril e se recuperaram em aproximadamente uma hora após a administração da giroxina e após 24 horas não apresentaram qualquer sintoma.

As mesmas doses de giroxina irradiada foram administradas via intraperitoneal, sendo que neste caso não foram observados qualquer tipo de efeito neurotóxico.

4.8. Neurotoxicidade *in vitro*

A giroxina nativa não promoveu o bloqueio progressivo e tempo-dependente das contrações musculares evocadas indiretamente nas preparações nervo frênico músculo diafragma de camundongos, conforme a Figura 15.

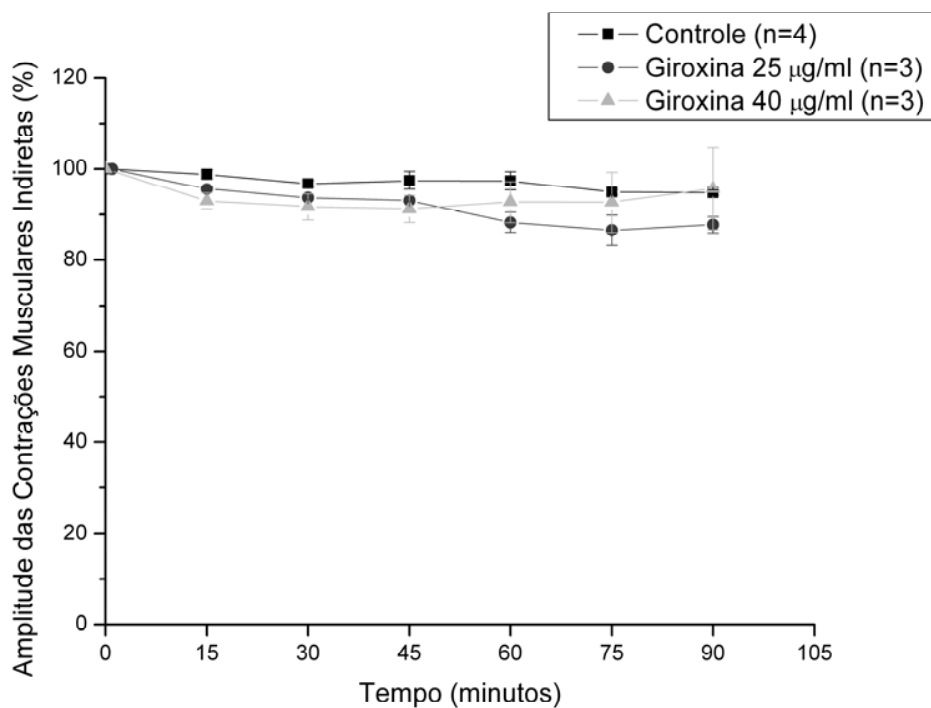


Figura 15. Efeito da aplicação da giroxina nas concentrações de 25 e 40 µg/ml sobre as contrações musculares evocadas indiretamente nas preparações do nervo frênico do músculo diafragma de camundongos.

5.DISSCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

O uso de produtos naturais com propriedades terapêuticas é tão antigo quanto à própria civilização humana. Atualmente a busca de novas moléculas a partir de extratos de plantas, venenos e peçonhas animais vem contribuindo para originar novos medicamentos (77). Estima-se que 60% das drogas anti tumorais e anti-infecciosas que se encontram disponíveis comercialmente no mercado, ou que estão em estudos na fase clínica, são de origem natural. Assim as toxinas animais também ganharam seu espaço no mercado farmacêutico, inclusive as ofídicas (78).

Diante deste desafio, o isolamento de toxinas e enzimas com propriedades trombina-símile a partir de venenos de serpentes tem se tornado de grande interesse para a comunidade científica devido ao possível desenvolvimento de reagentes para diagnósticos e no tratamento de alterações hemostáticas (44).

Atualmente, as técnicas mais utilizadas para isolar e purificar estas toxinas têm sido cromatografias em gel filtração e seguidas de afinidade (48, 79), com pequenas alterações, buscando as condições ideais para melhor resolução e rendimento. No entanto, Markland *et al.*, (80), em 1971, isolaram e caracterizaram uma trombina-símile de *Crotalus adamanteus*, a Crotalase, utilizando para isso cinco etapas cromatográficas (Sephadex G-100, DEAE-Celulose, Hidroxiapatita, Sephadex G-100 e DEAE-Celulose).

Outra importante enzima com característica trombina-símile é a giroxina, uma serinoprotease isolada e purificada do veneno de *Crotalus durissus terrificus*. Para sua obtenção, vários métodos e técnicas cromatográficas estão descritas como: Seki *et al.*, em 1979 (81), que utilizaram quatro etapas cromatográficas de purificação (Sephadex G-75, Sephadex G-75, CM-Sephadex C-50 e Sephadex G-75), enquanto que em 1988, Alexander *et al.*, (48), isolaram a giroxina utilizando um processo resultante de apenas duas etapas (Sephadex G-75 e Benzamidina-Sepharose 6B).

Neste trabalho, a enzima trombina-símile isolada e purificada do veneno de *Crotalus durissus terrificus* denominada giroxina foi obtida com a

combinação de duas etapas cromatográficas. A primeira de gel filtração utilizou uma coluna de Sephadex G-75 e a segunda de afinidade em uma coluna Benzamidina-Sepharose 6B. Esta dinâmica pode ser considerada relativamente rápida e eficiente quando comparada a outros métodos, onde geralmente são utilizadas mais técnicas cromatográficas.

No processo de isolamento, em coluna de gel filtração Sephadex G-75, do veneno de *Crotalus durissus terrificus* foi utilizado um tampão de eluição de caráter ácido (Formiato de amônio pH 3,5), o qual manteve a integridade das frações impedindo a degradação das mesmas e promovendo uma melhor separação resultando em quatro picos distintos, sendo convulxina, giroxina, crotoxina e crotamina (Figura 4). Outros estudos que envolveram fracionamento do veneno de *Crotalus durissus terrificus* e utilizaram para isso a cromatografia de exclusão molecular, também resultaram em quatro picos principais, que representam as toxinas acima mencionadas (82, 83).

A partir desta primeira separação, devido à alta atividade coagulante da giroxina, correspondente ao pico II, esta porção em separado, foi submetida à cromatografia de afinidade em Benzamidina-Sepharose 6B. Com isso, a proteína de interesse foi eluída por diferença brusca de pH (tampão 2 pH 7,4 e tampão 3 pH 3,2), resultando em três picos distintos, sendo que a enzima de interesse localizou-se no terceiro e menor pico após a eluição com glicina (Figura 5). Diferindo destes resultados, Raw *et al.*, (49), apresentaram apenas dois picos resultantes da cromatografia de afinidade em Sepharose-1,4-butanediol-diglycil-p-aminobenzamidina, onde o segundo e menor pico, após eluição com benzamidina, demonstrou atividade trombina-símile. Já Alexander *et al.*, (48) em 1988, em sua cromatografia de afinidade em Benzamidina-Sepharose 6B, obtiveram dois picos protéicos após a eluição com benzamidina, verificando também que somente o segundo e menor pico apresentou atividade coagulante trombina-símile, característica esta da giroxina.

Após o isolamento e purificação, a avaliação do grau de pureza da giroxina isolada do veneno de *Crotalus durissus terrificus* foi demonstrada a

partir do seu perfil eletroforético, da focalização isoeétrica e cromatografia líquida de alta eficiência em coluna de fase reversa C2/C18.

Várias preparações de serinoproteases de venenos de serpentes apresentam diferentes massas moleculares e pontos isoeétricos (pIs), devido à variação na sua composição em aminoácidos e conteúdo de carboidratos (12, 84). A crotalase, uma serinoprotease isolada do veneno de *Crotalus adamanteus*, apresenta uma massa molecular de 32,7 kDa (80). No veneno de *Bothrops jararaca* foram isoladas a Bothrops protease A com 67 kDa (85) e a Bothrombin com 35 kDa (86).

A massa molecular da giroxina de *Crotalus durissus terrificus* tem sido estimada por vários autores em 29 kDa (48), 33 kDa (81, 87), 34 kDa (49) e 36 kDa (88). Segundo análise eletroforética, realizada em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes na presença de agentes redutores, da giroxina isolada neste estudo a massa molecular foi de aproximadamente 30 kDa (Figura 6A). Este resultado corrobora com estudos recentemente realizados por de Oliveira *et al.*, (89). O ponto isoeétrico (pI) de aproximadamente 5,5 da serinoprotease purificada indicou o caráter ácido da proteína (Figura 6B), concordando com estudos que indicam um pI variável entre 4,6 a 6,6 para as serinoproteases (84).

Tendo a giroxina apresentado em SDS-PAGE um satisfatório grau de pureza com o aparecimento de uma única banda que é característico de glicoproteínas, devido à micro-heterogeneidade da molécula (12), procedeu-se a confirmação do grau de pureza da giroxina através da cromatografia líquida de alta eficiência em coluna de fase reversa C2/C18 (Figura 6C), que apresentou um pico único e homogêneo. Portanto, a enzima trombina-símile de *Crotalus durissus terrificus*, denominada giroxina, isolada neste estudo, apresentou características comuns às outras já isoladas até o momento.

Outras serinoproteases já descritas também são glicoproteínas com massas moleculares relativas que variam entre 28 a 64 kDa, apresentando pI ácido, como a Jararassin-I de *Bothrops jararacussu* com 28 kDa e pI 5,0 (90); a BjuSSU-SP-I de *Bothrops jararacussu* com massa molecular de 61 kDa e pI 3,8 (91) e a Gabonase de *Bitis gabonica* com 30,6 kDa e pI 5,3 (92). Existem

algumas exceções como é o caso da Calobin I de *Agkistrodon caliginosus* com 35 kDa e um pI levemente ácido de 6,2 (93); a trombina símile Calobin II isolada da mesma espécie de serpente que apresenta uma massa molecular de 41 kDa e um pI neutro de 7,4 (94) e a trombina-símile BpSP-I de *Bothrops pauloensis* com uma massa molecular de 34 kDa e um pI também levemente ácido de 6,4 (95). Recentemente uma nova serinoprotease do veneno de *Bothrops marajoensis* foi isolada apresentando um peso molecular de 33 kDa e um pI levemente ácido de 6,47 (96).

O sequenciamento do N-terminal de proteínas tem sido utilizado para mostrar a similaridade e identidade de proteínas isoladas com outras já caracterizadas previamente. Neste estudo, a enzima isolada e purificada mostrou aproximadamente 100% de similaridade com outras enzimas trombina-símile quando analisados os 20 aminoácidos (Figura 7), sugerindo uma ancestralidade molecular comum. Essa alta homologia entre as enzimas coagulantes é confirmada pela presença da valina (V) como primeiro resíduo N-terminal, característica esta comum na maioria das serinoproteases com atividade trombina-símile (97), classificando a serinoprotease isolada como giroxina.

A etapa de isolamento e purificação da enzima de interesse foi concluída com os resultados esperados, ou seja, obteve-se giroxina com um alto grau de pureza e quantidade suficiente para os ensaios de irradiação, atividade coagulante e toxicidade.

Os efeitos da irradiação por ^{60}Co da giroxina foram demonstrados primeiramente no perfil eletroforético, onde houve mudanças após sua irradiação quando comparado com a giroxina nativa. O desaparecimento da banda referente à giroxina, conforme a Figura 8, mostrou que a degradação da proteína cresceu conforme o aumento da dose de irradiação vindo a desaparecer quase totalmente quando utilizada a dose de 2,0 kGy. Este decréscimo pode ser causado pela agregação das proteínas (98). Vários pesquisadores demonstraram que o perfil eletroforético de proteínas de venenos foi totalmente modificado após sua irradiação (68, 69, 99, 100).

Esta possível perda protéica causada pela irradiação pode influenciar diretamente nas atividades biológicas da gioxina.

Por outro lado, é sabido que a maioria das serinoproteases atua em diversos substratos naturais e sintéticos e suas propriedades enzimáticas são geralmente acometidas por inibidores específicos tais como: PMSF, leuceptina, aprotinina e benzamidina (3, 12). A gioxina nativa catalisou a hidrólise dos substratos cromogênicos S-2238 e S-2288, demonstrando que esta enzima é uma serinoprotease pertencente à classe das enzimas trombina-símile (Figura 9A). Esses peptídeos H-D-Phe-pipecolyl-Arg-pNA.2HCl (S-2238) e H-D-Ile-pro-Arg-pNA.2HCl (S-2288) são os substratos mais susceptíveis para hidrólise pela gioxina, pois o centro ativo da enzima tem uma natureza aniônica que exige alta especificidade e preferências por aminoácidos como a arginina. Essa observação é confirmada pela especificidade enzimática da enzima em clivar ligações Arg-Gly na cadeia A α do fibrinogênio, sendo que este comportamento é bastante comum em outras trombina-símiles (16, 101).

A benzamidina foi capaz de inibir eficientemente a atividade da enzima pelo substrato S-2238, em contraste para uma inibição parcial quando o PMSF foi utilizado, pois estes são denominados inibidores de serinoproteases. Enquanto que os inibidores EDTA e 1,10-fenantrolina não foram capazes de inibir esta atividade (Figura 9B). O PMSF tem a capacidade de ligar-se a um aminoácido dessa classe de proteínas, que é a serina do sítio catalítico, provocando uma ligação irreversível e inativando-a. Estes dados corroboram com experimentos realizados com a trombina-símile isolada do veneno de *Bothrops pauloensis* denominada de BpSP-I (95).

Zhang *et al.*, (102) isolaram e caracterizaram uma enzima fibrinogenolítica denominada stejnobin do veneno de *Trimeresurus stejnegeri*. Esta trombina-símile foi previamente tratada com inibidores específicos para enzimas da classe serinoprotease, como PMSF e Fluorofato de di-isopropila (DFP), e com EDTA, um quelante do metal zinco, sendo posteriormente testada sua capacidade proteolítica sobre o fibrinogênio. A enzima stejnobin teve sua atividade completamente inibida por PMSF e DFP que se ligaram ao

resíduo serina do sítio catalítico das serinoproteases, e não apresentou nenhuma mudança na sua atividade quando tratada com EDTA, indicando, portanto que esta enzima isolada do veneno de *Trimeresurus stejnegeri* tratava-se de uma serinoprotease.

A giroxina mostrou ser bastante estável, permanecendo com sua atividade normal sobre o substrato S-2238 quando pré-incubada em pHs que variaram de 5,5 a 8,5 e, em pHs muito ácidos (3,5 a 4,5) e muito básicos, acima de 13,0, a enzima perdeu sua atividade (Figura 9C). Este comportamento foi semelhante à enzima Calobin II isolada do veneno de *Agkistrodon caliginosus*, que apresentou um pH ótimo de 8,0, sendo drasticamente influenciado em pH abaixo de 6,0 e acima de 10,0 (94).

Na presença do metal divalente Ca^{2+} a atividade da giroxina permaneceu estável. Observou-se também que na presença dos metais Mn^{2+} e Cu^{2+} a atividade da giroxina foi inibida (figura 9D). Com base nesses dados podemos sugerir que estes íons provoquem alguma mudança conformacional direta ou indireta sobre o sítio catalítico da proteína, diminuindo, portanto, sua eficiência (103).

Em contrapartida as serinoproteases são responsáveis por apresentarem atividade coagulante sobre o plasma humano *in vitro*, sendo esta atividade uma característica da giroxina (48, 49). No presente estudo, a giroxina nativa obteve uma alta atividade coagulante com uma baixa Dose Coagulante Mínima quando incubada em diferentes pHs (0,037 a 0,015 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) quando comparada aos resultados de um estudo publicado em 2009 (89) sobre esta enzima e o veneno total de *Crotalus durissus terrificus*, onde a Dose Coagulante Mínima foi de 1,5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ e aproximadamente 8,2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ respectivamente.

A atividade coagulante da giroxina nativa foi testada em diferentes pHs e manteve-se estável, apresentando um pH ideal para sua atividade sobre o plasma humano entre 6,0 (Figura 12) e 7,4 (Figura 13), semelhante ao pH ótimo da trombina que é 7,3 e do sangue (7,35 e 7,45). Outras trombina-símeis isoladas de venenos de serpentes, como por exemplo, ancrod do veneno de *Agkistrodon rhodostoma* (104), batroxobin de *Bothrops atrox* (105), crotalase

de *Crotalus adamanteus* (106), giroxina análoga do veneno de *Lachesis muta muta* (79) e as trombinas-símile dos venenos de *Bothrops pauloensis* (95) e *Bothrops marajoensis* (96) também são estáveis em diferentes pHs, como a maioria das serinoproteases do veneno de serpentes.

Segundo Barros *et al.*, (42), devido ao excelente DCM da giroxina, seu uso como trombina-símile na composição de selantes de fibrina pode e deve ser considerado como uma excelente alternativa, já que sua aplicação substitui o uso de trombina humana na composição destes produtos, minimizando assim, o risco de transmissão de doenças infecto contagiosas.

Além da alteração no perfil eletroforético da giroxina irradiada, a sua atividade considerada relevante, ou seja, a atividade coagulante foi avaliada, sendo detectada a anulação desta. A giroxina irradiada nas doses de 0,5; 1,0 e 2,0 kGy quando incubada com o plasma humano não foi capaz de coagulá-lo (Figura 14). Sendo assim, a radiação ionizante pode alterar as propriedades biológicas e antigênicas de uma proteína pela destruição de sua estrutura molecular (107). Isto é bem determinado e esclarecido quando utilizado o veneno total (63), mas quando utilizamos a irradiação sobre proteínas isoladas, a degradação protéica causada pela irradiação pode limitar ou até anular suas atividades. A menor resistência à radiação das enzimas com atividade coagulante foi observada por Herrera *et al.*, em 1986, com venenos de *Lachesis muta* e *Bothrops atrox* irradiados (108).

Na avaliação da toxicidade *in vivo* da giroxina nativa não foi possível ser evidenciado o característico rolamento em barril nas doses administradas, ou seja, de 0,1 a 0,6 µg/g de camundongo, mas foram observados alguns efeitos comportamentais como: agitação inicial seguida de aumento na respiração, extensão dos membros posteriores e limpeza excessiva, corroborando com resultados obtidos na literatura (87). No entanto, Camillo *et al.*, observaram o rolamento em barril quando a giroxina foi administrada intravenosa em camundongos com apenas a dose de 0,25 µg/g (88).

Existem algumas curiosidades importantes sobre o rolamento em barril como, por exemplo:

- a) É um fenômeno “tudo ou nada”, sem relação dose/resposta (54).

b) Sofre sensibilização. Uma segunda injeção de arginina-vasopressina, via intracerebroventricular induz o rolamento em barril em um número maior de ratos e causa uma diminuição do tempo de latência em relação ao primeiro dia (109, 110). No entanto, a síndrome do rolamento em barril não é induzida por uma nova injeção de gioxina logo após a recuperação do animal (48).

Também foi observado neste estudo, que a irradiação da gioxina, mesmo na dose mais baixa, ou seja, 0,5 kGy, também causou anulação da sua atividade tóxica, pois a mesma não foi capaz de apresentar efeitos tóxicos *in vivo* observados quando utilizada as mesmas doses que sua forma nativa. Para efeito comparativo com outra toxina do veneno de *Crotalus durissus terrificus*, Moreira *et al.*, demonstraram que a radiação do tipo gama (irradiação) anulou as alterações comportamentais da crotoxina, sugerindo que isto ocorra devido à radiação clivar aproximadamente seis pontes dissulfeto por molécula de crotoxina (111). Já a letalidade da crotoxina irradiada foi atenuada em 15 vezes quando comparada com a enzima nativa (69).

Os resultados de estudos realizados com irradiação do veneno total de várias serpentes mostram apenas uma atenuação da toxicidade de forma exponencial com o aumento da dose da irradiação, como demonstrado com o veneno de *Crotalus durissus terrificus* onde o veneno irradiado com doses de 2,0 e 3,0 kGy foi atenuado em 2,7 e 13,5 vezes respectivamente, quando comparado com o veneno nativo (67). Esse fato sugere que toxinas purificadas são mais sensíveis à radiação do que amostras não purificadas, provavelmente devido a proteção mútua dos componentes presentes, corroborando com as conclusões de Baride *et al.* (112).

Por outro lado, a ação da maioria das neurotoxinas tem seu efeito revelado no sistema nervoso periférico, devido ao fato de não atravessarem a barreira hematoencefálica. No entanto, a ação do veneno e de suas toxinas na junção neuromuscular pode ser discutida. As serpentes têm desenvolvido, através de diferentes mecanismos genéticos, a capacidade de expressar potentes toxinas, capazes de inibir a transmissão neuromuscular pré e pós-sináptica em determinados sítios específicos (113).

Para a verificação do efeito da gioxina sobre o sistema nervoso periférico, foram analisadas suas alterações sobre as contrações musculares. Sua avaliação se deu por meio de registros miográficos *in vitro*, a partir de preparações nervo frênico isolado do músculo diafragma de camundongos. Não foi evidenciado o bloqueio neuromuscular, podendo assim, sugerir que a ação da gioxina não tem efeito sobre o sistema nervoso periférico nas concentrações utilizadas.

Estudos realizados com as frações isoladas do complexo crotoxina do veneno de *Crotalus durissus terrificus* (crotopotina e fosfolipase A₂) demonstraram a ausência do efeito neurotóxico na junção neuromuscular e também foram consideradas como desprovidas de atividade farmacológica (114). Em contrapartida, embora os acidentes com as serpentes do gênero *Bothrops* não promovam nenhum sinal clínico de neurotoxicidade, algumas fosfolipases A₂ isoladas de vários venenos botrópicos bloqueiam o processo de transmissão neuromuscular *in vitro* (115, 116).

Alguns autores sugerem que a síndrome do rolamento em barril é semelhante à lesão labiríntica (81, 50), enquanto que outros acreditam que a enzima trombina-símile teria um efeito indireto sobre o sistema nervoso central (48, 117). Esta hipótese parece ser a mais provável, pois Camillo *et al.*, demonstraram que a gioxina não modifica a liberação *in vitro* de dopamina ou acetilcolina em tecido estrial de camundongos (88).

A gioxina por ser uma serinoprotease, pode estar correlacionada com os receptores PARs (*protease activated receptors*), uma vez que as atividades fisiológicas das serinoproteases, como a trombina, tripsina e as enzimas trombina-símile são medidas por estes receptores (118). Os PARs foram descritos em cérebros de mamíferos e a sua ativação faz com que algumas serinoproteases aumentem a permeabilidade das células endoteliais. Esses receptores podem estar relacionados com a neurotoxicidade da gioxina (119). No entanto os mecanismos no qual a gioxina induz o rolamento em barril assim como os processos patológicos envolvidos nesta síndrome ainda são desconhecidos (88).

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

- O isolamento e purificação da gioxina a partir do veneno total de *Crotalus durissus terrificus* foi realizado a partir de uma metodologia rápida e eficiente. Este processo envolveu apenas duas etapas cromatográficas, a saber: uma etapa de gel filtração em coluna Sephadex G-75 seguida de uma de afinidade em coluna Benzamidina-Sepharose 6B, resultando em uma amostra protéica purificada;
- O alto grau de pureza foi confirmado pela cromatografia líquida de alta eficiência em coluna de fase reversa C2/C18, bem como pela análise eletroforética em gel de poliacrilamida a 13,5% com agentes desnaturantes (SDS-PAGE), assegurando que as etapas cromatográficas de isolamento e purificação foram adequadas. O grau de pureza obtido permitiu a credibilidade dos bioensaios;
- Quando incubada em diferentes substratos sintéticos cromogênicos (S-2288 e S-2238), bem como por meio da sua atividade coagulante, a enzima foi caracterizada como uma serinoprotease do tipo trombina-símile, demonstrando seu melhor potencial de ação entre os pHs 7,0 e 8,0; semelhante ao pH ótimo da trombina sanguínea;
- A gioxina quando irradiada com ^{60}Co nas doses de 0,5; 1,0 e 2,0 kGy teve sua atividade coagulante totalmente anulada, perdendo portanto a sua capacidade nestas condições de atuar como trombina-símile;
- Os ensaios de toxicidade *in vivo* não demonstraram o rolamento em barril característico da gioxina, sendo observados alguns sintomas tóxicos como: aumento da frequência respiratória, extensão dos membros posteriores e limpeza excessiva, evidenciando assim, sua toxicidade;

- A irradiação da giroxina, mesmo na dose mais baixa estudada (0,5 kGy) teve sua atividade tóxica *in vivo* anulada. Este fato sugere que toxinas purificadas são mais sensíveis à irradiação quando comparadas a amostras não purificadas, provavelmente devido a proteção mútua dos componentes presentes no veneno total.
- O bloqueio da contração neuromuscular *in vitro* não foi evidenciado, sugerindo que a ação da giroxina não tem efeito sobre o sistema nervoso periférico.

Por fim, estudos futuros para a melhor compreensão do mecanismo de ação da giroxina na indução de efeitos *in vivo* deverão ser considerados. Os efeitos biológicos desta enzima aparecem como um potencial candidato na bioprospecção de novos fármacos. Sua clonagem e expressão gênica utilizando técnicas de biologia molecular poderão ser o meio mais adequado para a sua efetiva utilização pela indústria farmacêutica.

7.RESUMO

7. RESUMO

A giroxina isolada do veneno de *Crotalus durissus terrificus* apresenta atividades coagulante e neurotóxica, caracterizada pelo “rolamento em barril”. É uma serinoprotease do tipo trombina-símile que tem a capacidade de converter o fibrinogênio em fibrina. Visando a atenuação destas atividades, a irradiação com ^{60}Co aparece como uma importante ferramenta. O presente estudo teve por objetivo isolar e purificar a giroxina e avaliar o efeito da irradiação com ^{60}Co sobre suas atividades coagulante e tóxica. O isolamento da giroxina envolveu duas etapas cromatográficas: gel filtração em coluna Sephadex G-75 e afinidade em coluna Benzamidina-Sepharose 6B. O alto grau de pureza foi confirmado por RP-HPLC C2/C18 e pela análise eletroforética, que revelou uma massa molecular de aproximadamente 30 kDa. A giroxina nativa catalisou a hidrólise dos substratos cromogênicos S-2238 e S-2288, demonstrando tratar-se de uma serinoprotease pertencente à subclasse das enzimas trombina-símile, estável em diferentes pHs (5,5 a 8,5), sensível aos metais Mn^{2+} e Cu^{2+} e aos inibidores de serinoprotease PMSF e benzamidina. Apresentou melhor atividade coagulante sobre o plasma humano entre os pHs 6,0 e 7,4. A irradiação da giroxina nas doses de 0,5; 1,0 e 2,0 kGy anulou completamente suas atividades coagulante e tóxica. Os ensaios de toxicidade *in vivo* mostraram apenas alterações comportamentais sem demonstrar o rolamento em barril. Este fato sugere que as toxinas purificadas são mais sensíveis à irradiação, pois não há proteção mútua entre as proteínas presentes no veneno total. A giroxina nativa também não causou o bloqueio da contração neuromuscular *in vitro* sugerindo que a sua ação não tem efeito sobre o sistema nervoso periférico nas concentrações utilizadas.

Palavras chave: Giroxina; irradiação; toxicidade, atividade coagulante.

8.ABSTRACT

8. ABSTRACT

Gyroxin isolated from *Crotalus durissus terrificus* venom presents coagulant and neurotoxic activities. It belongs to the thrombin-like enzyme group capable of converting fibrinogen into fibrin. To reduce these toxic activities, the irradiation with Cobalt-60 appears to be an important tool. The present study was carried out in order to isolate and purify the gyroxin and evaluate the effects of irradiation with Cobalt-60 on coagulant and toxic activities. The gyroxin isolation consisted of two chromatographic steps: gel filtration (Sephadex G-75) and affinity (Benzamidine-Sepharose 6B). The high purity level of gyroxin was confirmed by RP-HPLC C2/C18 and electrophoretic analysis that showed a molecular weight of 30 kDa. The native gyroxin hydrolyzed the chromogenic substrates S-2238 and S-2288, indicating that this enzyme is a serine proteinase that belongs to the group of thrombin-like enzymes, stable when submitted to pHs from 5.5 to 8.5 and inhibited by Mn^{2+} , Cu^{2+} , PMSF and benzamidine. It was capable of coagulating human plasma at pH 6.0 and 7.4. The gyroxin irradiated at 0.5, 1.0 and 2.0 kGy doses neutralized the coagulant and toxic activities. The *in vivo* toxic study showed only behavioral alterations with no barrel rotation. This fact suggests that purified toxins are more sensitive to the irradiation because they e mutual protection with the other proteins present in the total venom. The native gyroxin was not able to block *in vitro* neuromuscular contraction, suggesting that the action of gyroxin, in the concentration used in this study, has no effect on the peripheral nervous system.

Key words: Gyroxin; irradiation; neurotoxicity, coagulant activity.

9.REFERÊNCIAS *

* Segundo normas de Vancouver: "*Uniform Requeriments for Manuscripts to Biomedical Journal*" (*International Comitte of Medical Journal Editors*, 2008. <http://www.icmje.org>) e por deliberação do Programa de Pós-Graduação em Doenças Tropicais da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP.

9. REFERÊNCIAS

1. Theakston RGD, Kamiguti AS. A list of animal toxins and some other natural products with biological activity. *Toxicon*. 2002;40(5):579-651.
2. Markland FS. Snake venoms and the hemostatic system. *Toxicon*. 1998;36(12):1749-800.
3. Braud S, Bon C, Wisner A. Snake venom protein acting on hemostasis. *Biochimie*. 2000; 82(9-10):851-9.
4. Matsui T, Fujimura Y, Titani K. Snake venom proteases affecting hemostasis and thrombosis. *Biochim Biophys Acta*. 2000;1477(1-2):146-56.
5. White J. Snake venoms and coagulopathy. *Toxicon*. 2005;45(8):951-67.
6. Marsh NA. Snake venoms affecting the haemostatic mechanism – a consideration of their mechanism, practical applications and significance. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 1994;5(3):399-410.
7. Gené JA, Roy A, Rojas G, Gutiérrez JM, Cerdas L. Comparative study on coagulant, defibrinating, fibrinolytic and fibrinogenolytic activities of Costa Rica crotaline snake venoms and their neutralization by a polyvalent antivenom. *Toxicon*. 1989;27(8):841-8.
8. Bolaños R, Rojas O, Flores CE. Aspectos biomédicos de cuatro casos de mordeduras de serpientes por *Lachesis muta* em Costa Rica. *Ver Biol Trop*. 1982;30(1):53-8.
9. Sanchez EF, Freitas TV, Ferreira-Alves DL, Velarde DT, Diniz MR, Cordeiro MN, et al. Biological activities of venoms from South American snakes. *Toxicon*. 1992;30(1):95-103.
10. Rosenfeld G, Kelen EMA. Cross neutralization of the coagulant activity of some snake venoms by antivenoms. *Toxicon*. 1966;4(1):7-15.
11. Bard R, Lima JCR, Saneto RP, Oliveira SG, Santos MC. Ineficácia do antiveneno botrópico na neutralização da atividade coagulante do veneno de *Lachesis muta muta*. Relato de caso e comprovação experimental. *Ver Inst Med Trop SP*. 1994;36(10):77-81.
12. Serrano SMT, Maroun RC. Snake venom serine proteinase: sequence homology vs. substrate specificity, a paradox to be solved. *Toxicon*. 2005;45(8):1115-32.
13. Bjarnason JB, Fox JW. Hemorrhagic metalloproteinases from snake venoms. *Pharmacol Ther*. 1994;62(3):325-72.
14. Rawlings ND, Barret AJ. Evolutionary families of peptidases. *Bioche J*. 1993;290(Pt 1):205-18.

15. Lesk AM, Fordham WD. Conservation and variability in the structure of serine proteinase of the chymotrypsin family. *J Mol Biol.* 1996;258(3):501-37.
16. Silva Junior FP, De-Simone SG. S1 subsite in snake venom thrombin-like enzymes: can S1 subsite lipophilicity be used to sort binding affinities of trypsin-like enzymes to small-molecule inhibitors? *Bioorg and Med Chem.* 2004;12(10):2571-87.
17. Pirkle H. Thrombin-like enzymes from snake venoms: an updated inventory. *Thromb Haemost.* 1998;79(3):675-83.
18. Maroun RC. Molecular basis for the partition of the essential functions of thrombin among snake serine proteinases: the case of thrombin-like enzymes. *Haemostasis.* 2001;31(3-6):247-56.
19. Ferreira SH. University discoveries and intellectual property rights: from *Bothrops jararaca* bradykinin potentiating peptides to angiotensin converting enzymes inhibitors. *Bras J Med Biol Res.* 1994;27(8):1693-8.
20. Romankiewicz JA, Brodgen RN, Hell RC, Speight TM, Avery GS. Captopril: an update review of its pharmacological properties and therapeutic efficacy in congestive heart failure. *Drugs.* 1983;25(1):6-40.
21. Cushman DW, Ondetti MA. History of captopril and related inhibitors of angiotensin converting enzyme. *Hypertension.* 1991;17(4):589-92.
22. Phillips DR, Scarborough RM. Clinical pharmacology of eptifibatide. *Am J Cardiol.* 1997;80(4A):11B-20B.
23. Scarborough RM. Development of eptifibatide. *Am Heart J.* 1999;138(6 Pt1):1093-104.
24. Rossi ML, Zavalloni D. Inhibitors of platelet glycoprotein IIb/IIIa (GPIIb /GPIIIa) receptor: rationale for their use in clinical cardiology. *Mini Rev Med Chem.* 2004;4(7):703-9.
25. Rasmussen S, Husted SE. Tirofiban (Aggrastat). A non-peptide glycoprotein IIb/IIIa receptor inhibitor. *Ugeskr Laeger.* 2001;163(4):461-5.
26. Bennett JS. Novel platelet inhibitors. *Annu Rev Med.* 2001;52:161-84.
27. Cook JJ, Bednar B, Lynch JJ, Gould RJ, Egbertson MS, Halczenko W, et al. Tirofiban (Aggrastat). *Cardiovasc Drug Rev.* 1999;17(3):199-224.
28. Steinmetzer T, Sturzebecker J. Progress in the development of synthetic thrombin inhibitors as new orally active anticoagulants. *J Curr Med Chem.* 2004;11(7):2297-321.
29. Samsa GP, Matchar DB, Williams GR, Levy DE. Cost effectiveness of ancrod treatment of acute ischemic stroke: results from the stroke treatment with ancrod trial (STAT). *J Eval Clin Prac.* 2002;8(1):61-70.
30. Bell WR, Shapiro SS, Martinez J, Nossel HL. The effects of ancrod, the coagulating enzyme from the venom of Malayan pit viper (*Agkistrodon rhodostoma*) on prothrombin and fibrinogen metabolism and fibrinopeptide A release in man. *J Lab Clin Med.* 1978;91(4):592-604.

31. Egberg N. Coagulation studies in patients treated with defibrase. *Acta Med Scand.* 1973;194(4):291-302.
32. Martin M, Engelken HJ, Tambert F, Martin U, Hirdes E, Auel H. Defibrination therapy using a thrombin-like enzyme (Defibrase). *Blood-coagulation physiological studies and clinical experiences. Vasa Suppl.* 1976;5:1-39.
33. Funk C, Gmür J, Herold R, Straub PW. Reptilase-R – A new reagent in blood coagulation. *Brit J Haematol.* 1971;21(1):43-52.
34. Okuno T, Nelson CA. Plasma fibrinogen stimulation by reptilase clotting time. *Am J Med Technol.* 1973;39(12):503-6.
35. Blomback B, Blomback M, Nilsson IM. Coagulation studies on “reptilase”, an extract of the venom from *Bothrops jararaca*. *Thromb Diath Haemorrh.* 1958;1(1):76-86.
36. Stocker K, Fisher H, Meier J. Thrombin-like snake venom proteases. *Toxicon.* 1982;20(1):265-73.
37. Herrick S, Balnc-Brude O, Gray A, Laurent G. Fibrinogen. *Int J Biochem Cell Biol.* 1999;31(7):741-6.
38. Doolittle RF. Fibrinogen and fibrin. *Annu Rev Biochem.* 1984;53:195-229.
39. Castro HC, Zingali RB, Albuquerque MG, Pujol-Luz M, Rodrigues CR. Snake venom thrombin-like enzymes: from reptilase to now. *Cell Mol Life Sci.* 2004;61(7-8):843-56.
40. Oyang C, Teng CM, Huang TF. Characterization of snake venom components acting on blood coagulation and platelet function. *Toxicon.* 1992;30(9):945-66.
41. Reid HA, Chan KE. The paradox in therapeutic defibrination. *Lancet.* 1968;1(7541):485-6.
42. Barros LC, Ferreira Junior RS, Barraviera SRCS, Stolf HO, Thomazini-Santos IA, Mendes-Giannini MJS, et al. A new fibrin sealant from *Crotalus durissus terrificus* venom: Applications in medicine. *J Toxicol Environ Health. Part B, Crit Rev.* 2009;12(8):553-71.
43. Kini RM, Rao VS, Joseph JS. Procoagulant proteins from snake venoms. *Haemostasis.* 2001;31(3-6):218-24.
44. Marsh N, Williams V. Practical applications of snake venom toxins in hemostasis. *Toxicon.* 2005;45(8):1171-81.
45. Marsh NA. Diagnostic uses of snake venom. *Haemostasis.* 2001;31(3-6):211-7.

46. Castro HC, Silva DM, Craik C, Zingali RB. Structural features of a snake venom thrombin-like enzyme: thrombin and trypsin on a single catalytic platform?. *Biochim Biophys Acta*. 2001;1547(2):183-95.
47. Pirkle H, Stocker K. Thrombin-like enzymes from snake venom: an inventory. *Thromb Haemost*. 1991;65(4):444-50.
48. Alexander G, Grothusen J, Zepeda H, Schwartzman RJ. Gyroxin, a toxin from the venom of *Crotalus durissus terrificus*, is a thrombin-like enzyme. *Toxicon*. 1988;26(10):953-60.
49. Raw I, Rocha MC, Esteves MI, Kamiguti AS. Isolation and characterization of a thrombin-like enzyme from the venom of *Crotalus durissus terrificus*. *Braz J Med Biol Res*. 1986;19(3):333-8.
50. Barrio A. Gyroxin, a new neurotoxin of *Crotalus durissus terrificus* venom. *Acta Physiol Latinoamer*. 1961;11:224-32.
51. Cohn ML, Cohn M. Barrel rotation induced by somatostatin in the non-lesioned rat. *Brain Res*. 1975;96(1):139-41.
52. Kruse H, Greidanus VWTB, De Wied D. Barrel rotation induced by vasopressin and related peptides in rats. *Pharmacol Biochem Behav*. 1977;7(4):311-3.
53. Kannan H, Tanaka H, Ueta Y, Hayashida Y, Kunitake T, Yamashita H. Effects of centrally administered endothelin-3 on the renal sympathetic nerve activity and renal blood flow in conscious rats. *J Auton Nerv Syst*. 1994;49(2):105-13.
54. Wurpel JN, Dundore RL, Barbella YR, Balaban CD, Keil LC, Severs WB. Barrel rotation evoked by intracerebroventricular vasopressin injections in conscious rats. I. Description and general pharmacology. *Brain Res*. 1986;365(1):21-9.
55. Barrabin H, Martiarena JL, Vidal JC, Barrio A. Isolation and characterization of gyroxin from *Crotalus durissus terrificus* venom. In: Rosemberg P. *Toxins: Animals, plant and microbial*. New York: Pergamon Press; 1978. 113-33.
56. Costa LM, Takeda AK, Barbosa SFC, Berra JAP, Adelino MGF, Soerensen B, et al. Estudo comparativo da resposta imune de cavalos ao veneno de *Crotalus durissus terrificus*, in natura, tratado com formaldeído e submetido à ação térmica. *Vac Soros*. 1985;1:24-29.
57. Moroz C, Goldblum N, Devries A. Preparation of *Vipera palestinae* antineurotoxin using carboxymethyl-cellulose-bound neurotoxin as antigen. *Nature*. 1963;200:697-8.

58. Flowers HH. The effects of X-irradiation on the biological activity of Cottonmouth Moccasin (*Agkistrodon piscivorus*) venom. *Toxicon*. 1963;1(3):131-2.
59. Tejasen P, Ottolenghi A. The effect of ultra-violet light on the toxicity and the enzymatic and antigenic activities of snake venom. *Toxicon*. 1970;21(3):225-33.
60. Guidolin R, Dias da Silva W, Higashi HG, Caricati CP, Lima MLR, Moraes JF, et al. Hiperimunização de cavalos soroprodutores com venenos botrópico e crotálico tratados por glutaraldeído. *Mem Inst Butantan*. 1989; 51(3):85-90.
61. Cardi BA, Nascimento N, Andrade Junior HF. Irradiation of *Crotalus durissus terrificus* crotoxin with ⁶⁰Co gamma-rays induces its uptake by macrophages through scavenger receptors. *Int J Radiat Biol*. 1998;73(5):557-64.
62. Boni-Mitake M, Costa H, Spencer PJ, Vassilieff VS, Rogero JR. Effects of ⁶⁰Co gamma radiation on crotoxin. *Braz J Med Biol Res*. 2001;34(12):1531-8.
63. Ferreira Junior RS, Nascimento N, Martinez JC, Alves JB, Meira DA, Barraviera B. Immunization with native and cobalt 60-irradiated *Crotalus durissus terrificus* venom in Swiss mice: assessment of the neutralizing potency of antisera. *J Venom Anim Toxins incl Trop Dis*. 2005;11(3):299-314.
64. Ferreira Junior RS, Nascimento N, Martinez JC, Alves JB, Meira DA, Barraviera B. Immunological assessment of mice hyperimmunized with native and Cobalt-60-irradiated *Bothrops* venoms. *J Venom Anim Toxins incl Trop Dis*. 2005;11(4):447-64.
65. Ferreira Junior RS, Nascimento N, Couto R, Alves JB, Meira DA, Barraviera B. Laboratory evaluation of young ovines inoculated with natural or ⁶⁰Co-irradiated *Crotalus durissus terrificus* venom during hyperimmunization process. *J Venom Anim Toxins incl Trop Dis*. 2006;12(4):620-31.
66. Rogero JZ, Nascimento N. Detoxification of snake venom using ionizing radiation. *J Venom Anim Toxins*. 1995;1(1):7-10.
67. Clissa PB, Nascimento N, Rogero JR. Toxicity and immunogenicity of *Crotalus durissus terrificus* venom treated with different doses of gamma rays. *Toxicon*. 1999;37(8):1131-41.
68. Murata Y, Nishikawa AK, Nascimento N, Higashi HG, Dias da Silva W, Rogero JR. Gamma irradiation reduces the toxic activities of *Crotalus durissus terrificus* venom but does not affect their immunogenic activities. *Toxicon*. 1990; 28(6):617-8.
69. Nascimento N, Seebart CS, Francis B, Rogero JR, Kaiser II. Influence of ionizing radiation on crotoxin: biochemical and immunological aspects. *Toxicon*. 1996;34(1):123-31.
70. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970;227:680-5.

71. Vesterberg O. Isoelectric focusing of proteins in polyacrylamide gels. *Biochim Biophys Acta*. 1972;257(1):11-9.
72. Edman P, Begg G. A protein sequenator. *Eur J Biochem*. 1967;1(1):80-91.
73. Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res*. 1997;25(17):3389-402.
74. Erlanger BF, Kokowsky N, Cohen W. The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. *Arch Biochem Biophys*. 1961;95:271-8.
75. Theakston RDG, Reid HA. Development of simple standard assay procedures for the characterization of snake venoms. *Bull World Health Organ*. 1983;61(6):949-56.
76. Bülbring E. Observations on the isolated phrenic nerve diaphragm preparation of the rat. *Br J Pharmacol Chemother*. 1946;1(1):38-61.
77. De Pasquale A. Pharmacognosy: the oldest modern science. *J Ethnopharmacol*. 1984;11(1):1-16.
78. Soares AM, Januário AH, Lourenço MV, Pereira AMS, Pereira PS. Neutralizing effects of brazilian plants against snake venoms. Review. *Drugs Future*. 2004;29(11):1105-17.
79. Silveira AMV, Magalhães A, Diniz CR, Oliveira EB. Purification and properties of the thrombin-like enzyme from the venom of *Lachesis muta muta*. *Int J Biochem*. 1989;21(8):863-71.
80. Markland FS, Damus PS. Purification and properties of a thrombin-like enzyme from the venom of *Crotalus adamanteus* (Eastern diamondback rattlesnake). *J Protein Biol Chemistry*. 1971;246(21):6460-73.
81. Seki C, Vidal JC, Barrio A. Purification of gyroxin from a South American rattlesnake *Crotalus durissus terrificus* venom. *Toxicon*. 1980;18(3):235-47.
82. Nascimento N. Estudo comparativo entre crotoxina nativa e irradiada. Aspectos bioquímicos, imunogênicos e farmacológicos [Dissertação]. São Paulo (SP): Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares; 1991.
83. Takeda AK, Barbosa SFC, Costa LM, Adelino MGF. Fracionamento do veneno de *Crotalus durissus terrificus* por cromatografia de exclusão molecular. *Rev Inst Med Trop*. 1985;27(3):115-22.
84. Markland Jr FS. Snake venom fibrinogenolytic and fibrinolytic enzymes: An updated inventory. *Thromb Haemost*. 1998;79(3):668-74.
85. Murayama N, Saguchi K, Mentele K, Assakura MT, Ohi H, Fujita Y, et al. The unusual high molecular mass of Bothrops protease A, a trypsin-like serine-protease peptidase from the venom of *Bothrops jararaca*, is due to its high carbo hydrase content. *Biochim Biophys Acta*. 2003;1652(1):1-16.

86. Nishida S, Fujimura Y, Miura S, Ozaki Y, Usami Y, Suzuki M, et al. Purification and characterization of bothrombin, a fibrinogen-clotting serine protease from the venom of *Bothrops jararaca*. *Biochemistry*. 1994;33(7):1843-9.
87. Ruiz de Torrent RM, Bongiovanni B, Leiva LC, Evangelista de Duffard AM, Rodríguez JP, Pérez OCA, Duffard R, et al. Neurotoxicological effects of a thrombin-like enzyme isolated from *Crotalus durissus terrificus* venom (preliminary study). *Toxicon*. 2007;50(1):144-52.
88. Camillo MAP, Arruda Paes PC, Troncone LRP, Rogero JR. Gyroxin fails to modify in vitro release of labelled dopamine and acetylcholine from rat and mouse striatal tissue. *Toxicon*. 2001;39(6):843-53.
89. De Oliveira DGL, Murakami MT, Cintra ACO, Franco JJ, Sampaio SV, Arni RK. Functional and structural analysis of two fibrinogen-activating enzymes isolated from the venoms of *Crotalus durissus terrificus* and *Crotalus durissus collilineatus*. *Acta Biochim Biophys Sin*. 2009;41(1):21-9.
90. Bortoleto RK, Murakami MT, Watanabe L, Soares AM, Arni RK. Purification, characterization and crystallization of Jararacussin-I, a fibrinogen-clotting enzyme isolated from the venom of *Bothrops jararacussu*. *Toxicon*. 2002;40(9):1307-12.
91. Sant'Ana CD, Ticli FK, Oliveira LL, Giglio JR, Rechia CG, Fuly AL, et al. BjuusuSP-I: a new thrombin-like enzyme isolated from *Bothrops jararacussu* snake venom. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*. 2008;151(3):443-54.
92. Pirkle H, Theodor I, Miyada D, Simmons G. Thrombin-like enzyme from the venom of *Bitis gabonica*. Purification, properties and coagulant actions. *J Biol Chem*. 1986;261(19):8830-5.
93. Hahn BS, Yang KY, Park EM, Chang IM, Kim YS. Purification and molecular cloning of calobin, a thrombin-like enzyme from *Agkistrodon caliginosus* (Korean viper). *J Biochem*. 1996;119(5):835-43.
94. Cho SY, Hahn BS, Yang KY, Kim YS. Purification and characterization of calobin II, a second type of thrombin-like enzyme from *Agkistrodon caliginosus* (Korean viper). *Toxicon*. 2001;39(4):499-506.
95. Costa FL, Rodrigues RS, Izidoro LF, Menaldo DL, Hamaguchi A, Homs-Brandeburgo MI, et al. Biochemical and functional properties of a thrombin-like enzyme isolated from *Bothrops pauloensis* snake venom. *Toxicon*. 2009;54(6):725-35.
96. Vilca-Quispe A, Ponce-Soto LA, Winck FV, Marangoni S. Isolation and characterization of a new serine protease with thrombin-like activity (TLBm) from the venom of the snake *Bothrops marajoensis*. *Toxicon*. 2010;55(4):745-53.

97. Andrião-Escarso SH, Sampaio SV, Cunha OAB, Marangoni S, Oliveira B, Giglio JR. Isolation and characterization of a new clotting factor from *Bothrops jararacussu* venom. *Toxicon*. 1997;35(7):1043-52.
98. Lee JW, Kim JH, Yook HS, Kang KO, Lee SY, Hwang HJ, et al. Effects of gamma radiation on the allergenic and antigenic properties of milk proteins. *J Food Prot*. 2001;64(2):272-6.
99. Guarnieri MC, Cruz Y, Murata JM, Filho S, Nascimento N, Rogero JR. Attenuation of *Bothrops jararaca* venom by ionizing radiation. *Toxicon*. 1990;28(6):611.
100. Bennacef-Heffar N, Laraba-Djebbari F. Evaluation of the effect of gamma rays on the venom of *Vipera lebetina* by biochemical study. *Can J Physiol Pharmacol*. 2003;81(12):1110-7.
101. Magalhães HPB, Magalhães A, Juliano L, Nelson DL, Rogana E. Mechanism of action and determination of the Best substrate for a thrombin-like enzyme from *Lachesis muta muta* venom by regression analysis of the kinetic parameters determined with peptidyl p-nitroanilide substrates. *Toxicon*. 2006;47(4):453-8.
102. Zhang Y, Gão R, Lee WH, Zhu SW, Xiong YL, Wang WY. Characterization of a fibrinogen-clotting enzyme from *Trimeresurus stejnegeri* venom, and comparative study with other venom proteases. *Toxicon*. 1998;36(1):131-42.
103. Liu S, Sun MZ, Sun C, Zhao B, Greenaway FT, Zheng Q. A novel serine protease from the venom of *Agkistrodon blomhoffi ussurensis*. *Toxicon*. 2008;52(7):760-8.
104. Hatton MWC. Studies on the coagulant enzyme from *Agkistrodon rhodostoma* venom. Isolation and some properties of the enzyme. *Biochem J*. 1973;131(4):799-807.
105. Stocker K, Barlow GH. The coagulant enzyme from *Bothrops atrox* venom (batroxobin). *Methods Enzymol*. 1976;45:214-23.
106. Markland FS, Kettner C, Schiffman S, Shaw e, Bajwa SS, Reddy KN, et al. Kallikrein-like activity of crotalase, a snake venom enzyme that clots fibrinogen. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1982;79(6):1688-92.
107. Souza-Filho JN, Guarnieri-Cruz MC, Murata Y, Rogero JR. Detoxification of crotoxin complex by gamma radiation. *Braz J Med Biol Res*. 1992;25(2):103-13.
108. Herrera Y, Yarleque A, Campos SY, Zavaleta A. Efecto de la radiacion gamma sobre la actividad biológica y propiedades enzimáticas de los venenos de las serpientes *Lachesis muta* y *Bothrops atrox*. *Inf Nuclear*. 1986;3(1):1-14.
109. Wurple JN, Dundore RL, Barbella YR, Balaban CD, Keil LC, Severs WB. Barrel rotation evoked by intracerebroventricular vasopressin injections in conscious rats. II. Visual/vestibular interactions and efficacy of antiseizure drugs. *Brain Res*. 1986;365(1):30-41.

110. Willcox BJ, Poulin P, Veale WL, Pittmanm QJ. Vasopressin-induced motor effects: localization of a sensitive site in the amygdale. *Brain Res.* 1992;596(1-2):58-64.
111. Moreira EG, Nascimento N, Rosa GJM, Rogero JR, Vassilieff VS. Effect of gamma radiation on the behavioral properties of crotoxin. *Braz J Med Biol Res.* 1997;30(2):245-9.
112. Baride RM, Jain SD, Gaitonde BB. Biochemical studies on the toxoids of venoms of poisonous Indian snakes. *Indian J Med Res.* 1980;72:571-6.
113. Hodgson WC, Wickramaratna JC. In vitro neuromuscular activity of snake venoms. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2002;29(9):807-14.
114. Habermann E, Breithaupt H. Mini-review. The crotoxin complex-an example of biochemical and pharmacological protein complementation. *Toxicon.* 1978;16(1):19-30.
115. Gallacci M, Oliveira M, Dal Pai-Silva M, Cavalcante WL, Spencer PJ. Paralyzing and myotoxic effects of a recombinant bothropstoxin-I (BthTX-I) on the mouse neuromuscular preparation. *Exp Toxicol Pathol.* 2006;57(3):239-45.
116. Ponce-Soto LA, Barros JC, Marangoni S, Hernandez S, Dal Belo CA, Corrado AP, et al. Neuromuscular activity of BaTX, a presynaptic basic PLA₂ isolated from *Bothrops alternatus* snake venom. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.* 2009;150(2):291-7.
117. Da Silva NJ, Aird SD, Seebart C, Kaiser II. A gyroxin analog from the venom of the bushmaster (*Lachesis muta muta*). *Toxicon.* 1989;27(7):763-71.
118. Turgeon VL, Houenou LJ. The role of thrombin-like (serine) protease in the development, plasticity and pathology of the nervous system. *Brain Res Rev.* 1997;25(1):85-95.
119. Alves da Silva JA, Muramoto E, Ribela MTCP, Rogero JR, Camillo MAP. Biodistribution of gyroxin using ¹²⁵I as radiotracer. *J Radioanalytical and Nuclear Chemistry.* 2006;269(3):579-83.

10.ANEXO



Universidade Estadual Paulista
Faculdade de Medicina de Botucatu

Distrito Rubião Junior, s/nº - Botucatu - S.P.
CEP: 18.618-970
Fone/Fax: (0xx14) 3811-6143
e-mail secretaria: capellup@fmb.unesp.br

Instituída na Faculdade de Medicina através da Portaria do Diretor nº 30 de 26/04/99



Comissão de Ética em Experimentação Animal

CERTIFICADO

CERTIFICAMOS que o Protocolo n.º **657** sobre o projeto de pesquisa “**Comparação das atividades enzimáticas, bioquímicas e tóxicas do complexo Giroxina nativo e irradiado com Cobalto 60 do veneno de Crotalus dirissus terrificus**”, a ser conduzido por Luciana Curtalo de Barros, orientada pelo Prof. Dr. Rui Seabra Ferreira Júnior, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) com a ressalva que os “**camundongos**” são provenientes de Biotério convencional, sem condições de certificar a sanidade dos mesmos.

Projeto de Pesquisa Aprovado em 27 de março de 2008

Prof. Drª Regina Helena G. Martins
Presidente da CEEA

Alberto Santos Capelluppi
Secretário da CEEA

