



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE MEDICINA

LAUDICÉIA ALVES DE OLIVEIRA

ESTUDO DA VARIAÇÃO NA COMPOSIÇÃO DA CROTAPOTINA
NO VENENO DE *Crotalus durissus terrificus* NA REGIÃO DE
BOTUCATU – SÃO PAULO

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Mestre em Doenças Tropicais.

Orientador: Prof. Dr. Daniel Carvalho Pimenta

Co-orientador: Prof. Dr. Rui Seabra Ferreira Junior

BOTUCATU

2017

LAUDICÉIA ALVES DE OLIVEIRA

**ESTUDO DA VARIAÇÃO NA COMPOSIÇÃO DA CROTAPOTINA
NO VENENO DE *Crotalus durissus terrificus* NA REGIÃO DE
BOTUCATU – SÃO PAULO**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Mestre em Doenças Tropicais.

Orientador: Prof. Dr. Daniel Carvalho Pimenta

Co-orientador: Prof. Dr. Rui Seabra Ferreira Junior

BOTUCATU

2017

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Oliveira, Laudicéia Alves.

Estudo da variação na composição da crotapotina no veneno de *Crotalus durissus terrificus* na região de Botucatu - São Paulo / Laudicéia Alves Oliveira. - Botucatu, 2017

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu

Orientador: Daniel Carvalho Pimenta
Coorientador: Rui Seabra Ferreira Júnior
Capes: 20801009

1. Cobra venenosa - Veneno. 2. Crotoxina. 3. Análise cromatográfica. 4. Botucatu (SP).

Palavras-chave: *Crotalus durissus terrificus*; Crotapotina; Crotoxina; Isoformas; Veneno.

Estudo realizado nos laboratórios do Centro de Estudos de Venenos e Animais
Peçonhentos – CEVAP – UNESP e Laboratório de Bioquímica e Biofísica do Instituto
Butantan



Dedicatória



Àqueles que são meu
Alfa e Ômega, a
própria essência do
meu ser: Meus pais.



Agradecimentos

...

Agradeço à Deus, que me deu a capacidade de ser e de pensar, requisitos que me possibilitaram conseguir mais essa vitória.

Aos meus pais, Natalina José de Melo Oliveira e Renato Alves de Oliveira, que sempre me levantaram quando cai e nunca me deixaram desistir dos meus sonhos.

Aos meus irmãos Amélia Alves de Oliveira e Aparecido Donizete de Oliveira, por sempre me incentivarem com otimismo e carinho.

À minha sobrinha Julia Laysa de Oliveira Renóbio, por me alegrar com sua ingenuidade e amor incondicional.

Ao meu namorado, companheiro e amigo Pedro Henrique Ribeiro por sua compreensão nos meus momentos de ausência e por toda ajuda que me deu nessa caminhada.

Ao meu melhor amigo, Rafael dos Santos Mendonça, por esses quatorze anos de pura amizade e por estar sempre ao meu lado para me fazer sorrir.

À doce Francilene, companheira de todos os momentos e a todas as meninas do Cevap que sempre me ajudaram

Aos meus amores Nina e Lely. O olhar de vocês sempre me deu forças para seguir em frente.

Agradeço também ao meu orientador, Prof. Dr. Daniel Carvalho Pimenta, por todo suporte, dedicação, paciência, alegria e ensinamentos valiosos.

Ao meu co-orientador, Prof. Dr. Rui Seabra Ferreira Júnior pela confiança, ajuda e oportunidade proporcionada.

Ao Prof. Dr. Benedito Barraviera, por ter aberto as portas do CEVAP para mim.

À minha colaboradora Lucilene Delazari dos Santos, pela paciência e por ter me ensinado tanto.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Capes pela bolsa concedida durante todo o período da realização desse mestrado.

Aos meus amigos e colegas e a todos aqueles que colaboraram direta ou indiretamente para a realização desse trabalho, gratidão!





Os ideais que iluminaram o
meu caminho são a bondade,
a beleza e a verdade.

Albert Einstein

RESUMO

O veneno de *Crotalus durissus terrificus* (*Cdt*), baseado no critério do perfil da cromatografia de exclusão molecular, pode ser descrito como sendo composto de quatro principais toxinas: Giroxina, Crotamina, Crotoxina e Convulxina. A crotoxina é uma neutoroxina, é um heterodímero não covalente, composta por duas subunidades: fosfolipase A2 (PLA2) e crotapotina (Ctp). A crotapotina constitui o componente da crotoxina que apresenta atividade anti-inflamatória além de ser chaperona de PLA2. Esta molécula é constituída por três cadeias peptídicas ligadas por pontes dissulfeto. Além disso, já foram descritas isoformas para a crotapotina. O objetivo deste estudo foi desenvolver um método cromatográfico para isolar a crotapotina, separar suas cadeias e analisá-las por LC/MS e LC-MS/MS para análise proteômica e/ou sequenciamento de novo e avaliação da possível existência de um padrão de variação nas substituições de aminoácidos. O método C8-RP-HPLC foi capaz de separar os componentes do veneno de *Cdt* que puderam ser identificados por espectrometria de massas, de acordo com a sua massa molecular. A crotapotina foi isolada, reduzida e alquilada e submetida à outra separação cromatográfica RP-HPLC (C18) para isolamento das subunidades alquiladas. Conforme descrito na literatura, a cadeia α da crotapotina é composta por 40 resíduos de aminoácidos, enquanto que a cadeia β possui 35 resíduos e a cadeia γ 14, pelo que as subunidades podem ser identificadas pelas suas massas moleculares. As análises das cadeias isoladas de crotapotina mostraram a presença de mais de uma molécula por fração, indicando a presença de isoformas no veneno. Análises proteômicas e sequenciamento de novo por LC-MS/MS elucidaram a existência de variações de resíduos de aminoácidos em tais cadeias. Estudos de atividade biológica poderão elucidar as diferenças que tais isoformas apresentam em suas características intrínsecas.

Palavras-chave: *Crotalus durissus terrificus*, veneno, crotoxina, crotapotina, isoformas

ABSTRACT

The *Crotalus durissus terrificus* venom (*Cdt*), based on molecular size chromatography, can be described as being composed of four main toxins: Giroxin, Crotamine, Crotoxin and Convulxin. Crotoxin is a neurotoxin, a non-covalent heterodimer composed of two subunits: phospholipase A2 (PLA2) and crotapotin (Ctp). Crotapotin is the component of crotoxin that has anti-inflammatory activity besides being a PLA2 chaperone. This molecule consists of three peptide chains linked by disulfide bonds. In addition, isoforms for crotapotin have been described. The objective of this study was to develop a chromatographic methodology to isolate a crotapotin, separate its chains and analyze by LC/MS and LC-MS/MS for proteomic analysis and/or de novo sequencing and evaluation of the possibility of a variation pattern amino acid substitutions. The C8-RP-HPLC method was able to separate the *Cdt* venom components that could be identified by mass spectrometry, according to their molecular mass. The crotapotin was isolated, reduced and alkylated and subjected to another RP-HPLC (C18) chromatographic separation for isolation of the alkylated subunits. As described in the literature, the α chain of crotapotin is composed of 40 amino acid residues, while the β chain has 35 residues and the γ chain, 14, and thus the subunits can be identified by their molecular masses. The analyzes of isolated chains of crotapotin showed the presence of more than one molecule per fraction, indicating the presence of isoforms in the venom. Protein analyzes and de novo sequencing by LC-MS / MS elucidated a existence of variations of amino acid residues in such chains. Studies of biological activity are to elucidate how the differences that such isoforms present in their intrinsic characteristics.

Key-words: *Crotalus durissus terrificus*, venom, crotoxin, crotapotin, isoform

SUMÁRIO

CAPÍTULO I

Revisão da Literatura.....	12
Objetivos	19
Objetivo geral	19
Objetivos Específicos	19
Referências Bibliográficas.....	20

CAPÍTULO II

Resumo	26
Introdução	28
Materiais e métodos.....	28
Resultados.....	30
Discussão..	37
Conclusão..	38
Referências Bibliográficas.....	39
CONCLUSÃO.....	44
ANEXOS.....	45



Capítulo I

Revisão da literatura

Desde a antiguidade as serpentes são temidas e adoradas em diferentes culturas, sendo muitas vezes mitificadas e pouco compreendidas ^(1,2). Esses animais sempre despertaram interesse no homem por causa da sua peçonha. Desde os tempos mais antigos estudiosos como Hipócrates, Aristóteles e Plínio já buscavam usar os venenos produzidos pelas serpentes com finalidade terapêutica ⁽³⁾.

O Brasil possui rica ofídiofauna. Até Novembro de 2016 foram catalogadas 392 espécies de serpentes, divididas em 40 subespécies e 10 famílias ⁽⁴⁾. Destas, apenas duas famílias possuem serpentes peçonhentas, sendo elas as famílias *Elapidae* e *Viperidae* ⁽⁵⁾.

A família *Viperidae* possui serpentes venenosas com presas móveis (dentição solenóglifa), curvas e caniculadas, especializadas para inoculação, e glândulas altamente especializadas. Essa família é ainda dividida em 3 subfamílias sendo elas: *Azemiopinae*, *Viperinae* e *Crotalinae* ⁽⁶⁾.

A subfamília *crotalinae* compreende serpentes de grande interesse médico, por serem as responsáveis pela maior parte dos acidentes ofídicos. Essa subfamília está representada pelos gêneros *Bothrops*, *Crotalus* e *Lachesis* ⁽⁷⁾.

O gênero *Crotalus sp.* (cascavéis) se destaca entre as serpentes peçonhentas, possuindo cerca de 70 espécies e subespécies e também por sua ampla distribuição. Pode ser encontrada desde o sul do Canadá, se estendendo até a Argentina Central⁽⁸⁾. É pouco encontrada em locais úmidos como áreas litorâneas, florestas e pântanos, porém algumas espécies podem ser encontradas em tais habitats. No Brasil é possível apenas encontrar a espécie *Crotalus durissus*, dividida em 5 subespécies ^(6, 9, 10).

- *Crotalus durissus cascavella*;
- *Crotalus durissus colilineatus*;
- *Crotalus durissus marajoensis*;
- *Crotalus durissus ruruima*;
- *Crotalus durissus terrificus*;

Essa última subespécie é normalmente encontrada de Minas Gerais até o Rio Grande do Sul ⁽⁵⁾.

As serpentes do gênero *Crotalus sp.*, no geral, são animais robustos e não muito ágeis. Apresentam chocalho ou guizo na cauda e fosseta loreal ⁽⁵⁾.

O veneno das serpentes é composto por uma gama de proteínas, que compreendem cerca de 90 a 95% do seu peso seco, sendo grande parte destas, enzimas tóxicas. Os outros elementos que compõe o veneno são lipídeos, carboidratos e peptídeos, assim como

componentes inorgânicos, que auxiliam como catalizadores na atividade enzimática ou até mesmo na estrutura da das proteínas que compõem o veneno. Aminas biogênicas (histamina, 4-hidroxitriptamina) também pode fazer parte desta composição, além dos nucleosídeos. As enzimas do veneno são classificadas, normalmente, em duas categorias: oxiredutases e hidrolases. As hidrolases são as enzimas mais biologicamente ativas do veneno, e são representadas pelas peptidases, glicosidases e lípases⁽¹¹⁾.

Os venenos das serpentes apresentam alta toxicidade, tendo como principal função auxiliar na captura da presa, sendo assim um fortíssimo mecanismo de caça, além de desempenharem importante papel na digestão desta⁽¹⁾.

O veneno de *Crotalus durissus terrificus* (*C.d.t*) pode ser considerado um veneno complexo, apresentando diversas toxinas, porém é normalmente descrito contendo quatro componentes principais: Giroxina, Convulxina, Crotamina e Crotoxina^(12, 13, 14, 15, 16), de acordo com a distribuição destas moléculas em um perfil de cromatografia de exclusão molecular, porém vale destacar que

A Giroxina é uma enzima do grupo das trombina-símile, sendo uma serino protease, possuindo alta atividade coagulante. Em casos graves de envenenamento pode causar incoagulabilidade sanguínea por atuar diretamente sobre o fibrinogênio. Não causa letalidade causando além dos distúrbios coagulatórios apenas um comportamento do animal inoculado com a toxina caracterizado por movimentos de rotação sobre o eixo central do corpo, síndrome esta que originou o seu nome^(14, 17, 18).

A Convulxina é uma proteína, que causa apnéia, perda de equilíbrio e convulsões quando administrado em camundongos por via intravenosa. No envenenamento crotálico é a toxina envolvida em distúrbios respiratórios e também causadora de convulsões^(13, 19, 20).

A Crotamina é um peptídeo com alta estabilidade estrutural, que apresenta isoformas e efeito tóxico sobre células musculares esqueléticas. Tal toxina pode ou não estar presente no veneno de animais de uma mesma região. Os animais que possuem essa toxina são considerados animais com veneno crotamina positiva, enquanto que os que não a possuem são considerados animais com crotamina negativa. O envenenamento por serpentes crotamina positiva apresentam ataques espasmódicos e rigidez muscular, acompanhadas de hipotonia muscular e paralisia flácida. Em contrapartida o envenenamento por serpente crotamina-negativa apresentam apenas hipotonia muscular e paralisia flácida^(3, 22, 23).

A Crotoxina é a principal neurotoxina da peçonha crotálica. É uma β -neurotoxina, inibidora da transmissão sináptica na pré-sinapse^(24, 25) sendo responsável pelas paralisias motoras e respiratórias⁽²⁶⁾. Estruturalmente é um heterodímero formado por duas

subunidades, a fosfolipase A2 também conhecida como Crotoxina B e a Crotapotina ou Crotoxina A ^(26, 27).

Já foram isoladas e caracterizadas 15 diferentes isoformas de Crotoxina ⁽²⁸⁾. Tais isoformas são o resultado de modificações pós traducionais que podem ocorrer sobre um transcrito primário levando a formação de Crotapotina, ou também pode resultar de uma expressão de diferente RNAm, resultando na formação da Fosfolipase A2 ^(29, 30).

Os acidentes crotáticos correspondem a aproximadamente 8% dos acidentes por serpentes no Brasil, porém é o que apresenta maior coeficiente de letalidade, por Insuficiência Renal Aguda, o que torna esta uma serpente de interesse médico ^(31, 32, 33).

São três os principais efeitos por envenenamento crotático: ^(32, 34)

Neurotoxicidade - é causada principalmente pela crotoxina, toxina que possui efeito pré-sináptico, bloqueando a liberação de acetilcolina, causando bloqueio muscular e consequentemente paralisias motoras.

Miotoxicidade - a peçonha da serpente lesiona fibras musculares esquelética causando liberação de mioglobina e de algumas enzimas para o soro que são posteriormente excretadas. Essas lesões provocam problemas musculares e renais.

Coagulabilidade - o veneno age consumindo o fibrinogênio levando a incoagulabilidade sanguínea, provocando redução plaquetária e possíveis hemorragias.

Apesar do acidente crotático, o veneno de *Crotalus durissus* tem se apresentado como grande ferramenta biotecnológica, sendo usada em pesquisa e no desenvolvimento de novos fármacos e tratamentos para inúmeras patologias.

Exemplos podem ser dados pelo: Enpak® (sigla para *endogenous pain killer*), peptídeo obtido de veneno de *Crotalus durissus terrificus* que possui efeito analgésico cerca de 600 vezes mais potente que a morfina ⁽³⁵⁾, ainda podemos citar os estudos realizados com ênfase na atividade citotóxica de *C.d.t.*, devido o seu potencial antitumoral, apresentando atividade citotóxica e lítica sobre diversas linhagens de células tumorais *in-vitro* ^(36, 37).

As frações Crotoxina e Crotamina de *Crotalus durissus terrificus*, apresentaram ação antitumoral *in-vitro* sobre células de tumores, como o adenoma de pulmão ⁽³⁸⁾, adenoma de pituitária, o glioblastoma multiforme ^(39, 40).

A crotoxina de *Crotalus durissus terrificus*, também demonstrou possuir ação antiviral sobre alguns vírus da família *Flavivirus* ⁽⁴¹⁾, além de apresentar ação antibacteriana sobre colônias de bactérias gram-negativas *Xanthomonas axopodis PV passiflorae*, contribuições significativa para o desenvolvimento de novas ferramentas e tratamentos de patologias envolvendo tais agentes biológicos ⁽³⁰⁾.

Outra grande utilização biotecnológica para o veneno de *Crotalus sp.* é para a produção de cola de fibrina, uma substância com grande poder adesivo que possui em sua composição fibrinogênio e trombina símile isolada do veneno de *Crotalus sp.* e que apresenta incrível poder cicatrizante sobre úlceras venosas ⁽⁴²⁾.

Diversos outros estudos estão sendo realizados utilizando as frações do veneno de *Crotalus durissus*, inclusive para o tratamento de doenças auto-imunes utilizando crotapotina ⁽⁴³⁾.

A Crotapotina ou Crotoxina A, compreende o componente ácido da Crotoxina, possuindo um massa molecular de 9,6 KDa ⁽⁴⁴⁾. É composta por 3 cadeias polipeptídicas unidas por 7 pontes dissulfeto ⁽¹⁰⁾.

Suas cadeias peptídicas foram originadas através da clivagem de um precursor homólogo à fosfolipase A2 e foram seqüenciadas em 1985 pela primeira vez ⁽⁴⁵⁾. A primeira cadeia contém 40 resíduos de aminoácidos, a cadeia β 35 resíduos e a cadeia γ , 14 resíduos que podem ser encontrados na forma de dímeros quando em solução com baixa força iônica ⁽⁴⁶⁾. A seqüência das cadeias apresenta-se da seguinte forma:

10	20	30
CrtxA α – SSYGCYCGAGGQGWPDASDRCCFHHDCCYAKLTGYDPTT.		
10	20	30
CrtxA β – RQEDGEIVCGEDDPCGTQICECDKAAAICFRNSMDT.		
10		
CrtxA γ – QFSPENCQGESQPC.		

A organização da Crotapotina (que juntamente com seu precursor possui 138 resíduos de aminoácidos) está apresentada na figura 1 ⁽¹⁾.



Figura 1: organização da Crotapotina, sublinhando o peptídeo sinal e destacando as 3 cadeias, A, B e C em amarelo, azul e verde respectivamente identificando as ligações dissulfídicas. **Fonte:** OLIVEIRA, 2010.

Um exemplo de alinhamento de seqüências das subunidades de crotapotina está apresentado no quadro o quadro abaixo ⁽⁴⁷⁾:

Chain A	Ca ²⁺ -loop	Active Site	(b)
Cdcasca F3A	SYGCNCGAGGSGW	PKDATDRCCFVHDCCYAKVTGCDPQ	
Cdcasca F4A	***Y**H***L*	Q*****LN***T	
Cdt F5 A	***Y**H***Q**	Q*****G*****N	
Cdt F7 A	***Y**H***Q**	Q*****G*LN***T	
Chain A	***Y**H***Q**	Q*****L*****T	TDVY
Mojave A	**Y*****Q**	S*****L*****T	TDVY
BthTx-I	A*****VLR*KR*	*****Y**K**K*L**N*K	
AppK49	S*****WHR*Q*	*****K**K*L*D*NHK	
PrTx II	A*****VLR*KR*	*****Y**K**K*L**NPK	
Basp III	T***Y**W**Q*Q*	*****K**G*LSN*K*K	
VRV-PL	S***Y**W**K*T*	*****GNLPD*N*K	
Chain B	β -Wing	Helix-3	
Cdcasca F3B	QENGEIVCGEDDP	CGKEICECDKAAAICFRE	SM DTY
Cdcasca F4B	**D*****N**	**R*****N*I**	
Cdt F5 B	E***G*****E**	**R*****N*I**	
Cdt F7 B	E**RD*****TQ*	*****D*I**	
Chain B	E*D*****TQ*	*****N**	
Mojave A	E*D*****TQ*	*****D*N**	
BthTx-I	WKDKT*****NN**	L**L*****V***L**NLG**	
AppK49	WK*KAI**E*KN**	L**M*****V***L**NLL**	
PrTx II	WKDKT*****NN**	L**L*****V***L**NLG**	
Basp III	RKS*V*I**GT**E*Q*	*****V***L**NLR*N	
VRV-PL	RV**A***EKGTSE*ENR*	*****QNLR**	
Chain C	C-terminal		
Cdcasca F3C	QFKPENCKGESQPC		
Cdcasca F4C	*QS*****		
Cdt F5 C	E*S**D*Q***T**		
Cdt F7 C	**S***Q*****		
Chain C	--S*****Q*****		
Mojave C	YHLKPF**KAD**		
BthTx-I	AYFKLK**KPD-T*		
PrTx II	YHLKPF**KAD-D*		
Basp III	AYPDLL**KPAEK*		
VRV-PL	AYPDLL**KPAEK*		

Quadro 1: Alinhamento de seqüência de aminoácido das cadeias A, B e C com outras crotapotinase alguns seguimentos de PLA2. Cdcasca F3, Crotapotina de C.d. cascavella, Cdt F5 e F7, isoformas de crotapotina de Crotalus durissus terrificus. BthTx, PLA2 de Bothrops jararacussu (Bothropstoxin I), AppK49, Asp49 PLA2 do veneno de Agkistrodon piscivorus piscivorus. PrTx II, PLA2 de Bothrops pirajai (piratoxin II), Basp III, PLA2 de Bothrops asper, VRV-PL, PLA2 do veneno de Vipera russelli. **Fonte:** OLIVEIRA et.al, 2003.

Os autores mostram que há alguma variação na sequência de aminoácidos da crotapotina, mas estes trabalham com *Crotalus durissus cascavella* e, à época do trabalho, incluem apenas 2 variantes de *C.d.t.*

Na literatura a crotapotina foi inicialmente descrita como uma molécula “chaperona” da fosfolipase A2 em *Crotalus durissus terrificus*, ou seja, esta molécula apresenta a capacidade de potencializar a toxicidade desta e de protegê-la de ser inativa, por exemplo, através de ligações com sítios de baixa afinidade. Em contrapartida quando dissociada do complexo Crotoxina-fosfolipase, possui a capacidade de inibir a atividade enzimática da PLA2⁽²¹⁾.

A crotapotina já foi descrita como sendo biologicamente inativa, afirmação que podemos observar estar sendo revista atualmente, uma vez que apresenta ação antiinflamatória agindo sobre a modulação da imunidade humoral, diminuindo assim o nível de anticorpos^(10, 21).

LOURENÇO Jr. e colaboradores, 2013⁽⁴⁸⁾, demonstraram em seu trabalho através da comparação de perfis cromatográficos (figura 2) a possível presença de isoformas de Crotapotina em veneno de *Crotalus durissus terrificus*, isoformas estas que juntamente com as variações de fosfolipase A2 seriam responsáveis pelas 15 isoformas existentes de Crotoxina.

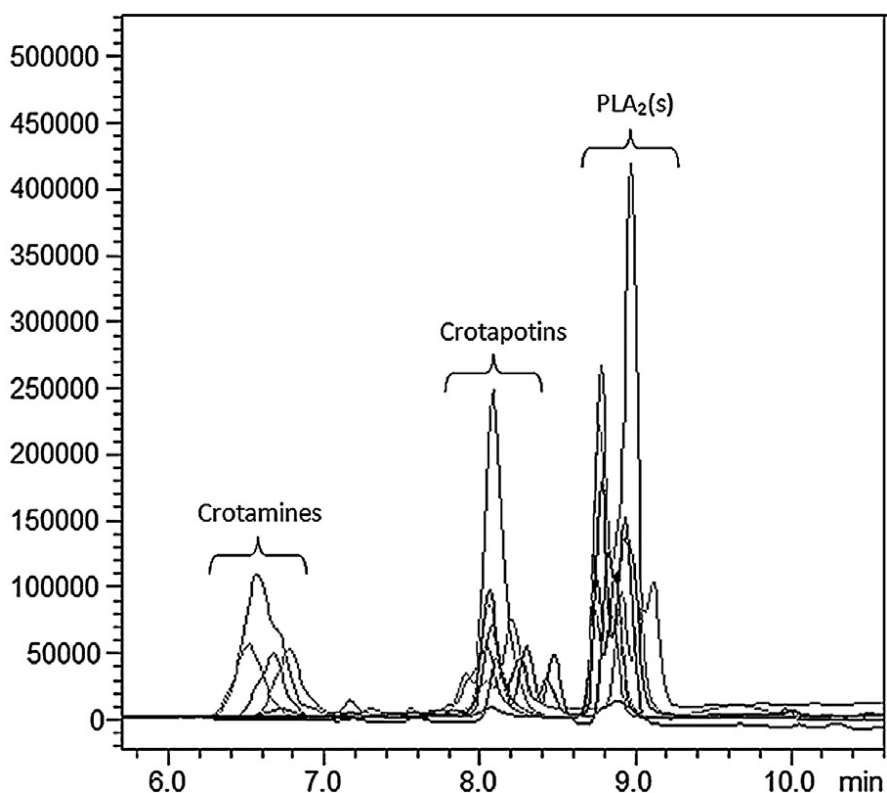


Figura 2: Perfil cromatográfico do veneno de *Crotalus durissus terrificus*. **Fonte:** LOURENÇO Jr et.al, 2013.

Isoformas de Crotapotina apresentaram propriedades semelhantes. Sabendo disto e conhecendo a sequência das três subunidades da crotapotina surge a dúvida a respeito da origem das isoformas, particularmente se há um padrão de variação nesses peptídeos ⁽¹⁰⁾.

A crotapotina possui similaridade de sequência com a fosfolipase A2, em algumas regiões da molécula. Portanto, ao estudar a crotapotina, não apenas haverá uma compreensão maior da organização desta molécula e suas subunidades, como também existe a possibilidade de que parte destes resultados possam vir a ser estendidos à unidade catalítica da crotoxina, trazendo um entendimento maior sobre a organização global da crotoxina e o papel catalítico e chaperona de cada uma das subunidades. ^(10,46,49).

Objetivos

2.1. Objetivos gerais

A presente pesquisa teve como principal objetivo verificar se ocorre um padrão de variação na sequência de aminoácidos da crotapotina do veneno de *Crotalus durissus terrificus* da região de Botucatu – São Paulo, mantidas em cativeiro no Centro de Estudo de Venenos e Animais Peçonhentos (CEVAP) - Unesp, Botucatu

2.2. Objetivos específicos

- Desenvolver um método cromatográfico para a obtenção da crotapotina isolada
- desenvolver metodologia para analisar, individualmente, as subunidades da crotapotina por HPLC, MS e MS/MS.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- Oliveira, K.C. Aspectos estruturais de proteínas do veneno crotálico modificadas por radiação ionizante. Dissertação. Instituto de pesquisa em energia nuclear- IPEN. Universidade de São Paulo – USP, 2010.
- 2- Mullin, S.J; Seigel, R.A. Opening doors for snake conservation. Snakes ecology and conservation. Nova Iorque, Comstock Publishing Associates 2009, p. 5.
- 3- Oguiura, OGUIURA, N et. al. Intraspecific variation of the crotoamine and crotoasin genes in *Crotalus durissus rattlesnakes*. Gene 2009; 446(1):35-40.
- 4 – Sociedade Brasileira de Herpetologia. Acesso: 12 jan. 2017.
- 5- Santana, PHC. Purificação e caracterização de uma fosfolipase A2 do veneno amarelo de serpentes *Crotalus durissus Collilineatus*. Dissertação - Universidade de Goiás, 2009.
- 6- Pough, FH et. al. Herpetology. Upper Saddle River: Prentice Hall, 1998.
- 7- Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde 2001.
- 8- Campbell, J.A & Lamar, W.W. The venomous reptiles of Latin America. Comstock Publishing Associates 1989.
- 9- Bastos, C.M.A. Ação da peçonha de *Crotalus durissus terrificus* (SERPENTES: *Viperidae*) sobre agregação plaquetária, parâmetros inflamatórios e proliferação celular. Dissertação - Faculdade de Biociências, 2009.
- 10- Dos-Santos, M.C. Crotoxina e Crotoxina-símile isoladas de venenos de subespécies de *Crotalus durissus* e suas múltiplas atividades biológicas. Sci. Amazon 2014; 3(1):102-105.
- 11- Ponce-soto, L.A et.al. Isolation and preliminary enzymatic characterization of a novel PLA2 from *Crotalus durissus collilineatus* venom. J. Protein Chem 2002; 21(3):131-6.

- 12- Barradin et. al. Isolation and characterization of gyroxin from *Crotalus durissus terrificus* venom, Pergamon Press 1978.
- 13- Prado-Franceschi, J; Vital Brazil, O. Convulxin, a new toxin from the venom of South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*). *Toxicon* 1981; 16(6):661-6.
- 14- Alexander, G et. al. Gyroxin, a toxin from the venom of *Crotalus durissus terrificus*, is a thrombin-like enzyme. *Toxicon* 1988; 96(10):953-60.
- 15- Francischetti, I.M.B et al. Intraspecific variation in the venoms of the South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*). *Comp Biochem Physiol, PART C* 2000.
- 16- Santos, et. al. Envenenamento crotálico em cães. *Rev. Cien Agron* 2013; 13(supl):5-6.
- 17- Barros, L.C et. al. Biochemical and biological evaluation of gyroxin isolated from *Crotalus durissus terrificus* venom. *J Venom. Anim. Toxins incl Trop Dis* 2011; 17(1):23-33.
- 18- Yonamine, C.M et.al. Kinetic characterization of gyroxin, a serine protease from *Crotalus durissus terrificus* venom. *Biochimie* 2012; 94(12):2791-93.
- 19- Murakami, M.T et. al. Crystal structure of the platelet activator convulxin, a disulfide-linked $\alpha_4\beta_4$ cyclic tetramer from the venom of *Crotalus durissus terrificus*. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 310(2):478-82.
- 20- Cunha, E.M, Martins, O. A. Principais compostos químicos presentes nos venenos de cobras dos gêneros *Bothrops* e *Crotalus* – Uma revisão. *Rev Ele Edu Cien* 2012; 2(2):21-6.
- 21- Fadel, V et. al. Automated NMR structure determination and disulfide bond identification of the myotoxin crotamine from *Crotalus durissus terrificus*. *Toxicon* 2005; 46(7):759-67.
- 22- Kerkis, I et. al. State of the Art in the Studies on Crotamine, a Cell Penetrating Peptide from South American Rattlesnake. *Biomed Res Inter* 2014; 2014.

- 23- Vieira, L.F et.al. Biochemical, functional, structural and phylogenetic studies on Intercro, a new isoform phospholipase A₂ from *Crotalus durissus terrificus* snake venom. *Biochimie* 2013; 95(12):2365-75.
- 24- Rangel-Santos, A et. al. A comparative study of biological activities of crotoxin and CB fraction of venoms from *Crotalus durissus terrificus*, *Crotalus durissus cascavella* and *Crotalus durissus collilineatus*. *Toxicon* 2004; 43(7):801-10.
- 25- Madey, J.J, et. al. Facial diplegia, pharyngeal paralysis, and ophthalmoplegia after a timber rattlesnake envenomation. *Pediatr Emerg Care* 2013; 29(11):1213-6.
- 26- Lomeo Rda, S. Crotoxin from *Crotalus durissus terrificus* snake venom induces the release of glutamate from cerebrocortical synaptosomes via N and P/Q calcium channels. *Toxicon* 2014; 85:5-16.
- 27- Faure, G et. al. Rattlesnake Phospholipase A₂ Increases CFTR-Chloride Channel Current and Corrects $\Delta F508$ CFTR Dysfunction: Impact in Cystic Fibrosis. *J Mol Biol.* 2016; 428(14):2898-915.
- 28- Faure G; Bom, C. Several isoforms of crotoxin are present in individual venoms from the South American rattlesnake *Crotalus durissus terrificus*. *Toxicon* 1987; 25(2):229-34.
- 29- Ponce-Soto, L.A. Caracterização bioquímica e biológica de uma crotoxina “like” do veneno total de *Crotalus durissus collilineatus*. Tese - Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, 2001.
- 30 – Diz-Filho, E.B. Caracterização bioquímica e farmacológica de novas isoformas de PLA₂ crotálica: *Crotalus durissus cumananensis* e *Crotalus durissus ruruima*. Dissertação - Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, 2007.
- 31- Barraviera, B. O ensino dos acidentes por animais peçonhentos nas escolas médicas brasileiras. *Rev Soc Bras Med Trop* 1992; 25(3):203-4.
- 32- Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos. Brasília 2001.

- 33- Pinho, F.M.O. Envenenamento Crotálico: epidemiologia, insuficiência renal aguda e outras manifestações clínicas. Tese - Universidade de São Paulo, 2004.
- 34- Fernandes, T.A; Aguiar, C.B; Daher, E.F. Envenenamento Crotálico: epidemiologia, insuficiência renal aguda e outras manifestações clínicas. *Ver Eletr Pesq Med* 2008; 2(2).
- 35- Martins, M; Molina, F.B. Répteis. Panorama geral dos répteis ameaçados no Brasil. Livro Vermelho da Fauna Brasileira ameaçada de Extinção, 2011, p.3.
- 36- Casais-e-Silva, L.L. Toxinas como ferramentas biotecnológicas e farmacológicas. *Gazeta Médica* 2012; 82(1):54-60.
- 37- Zhu, Q. et.al. Inhibitory effect of crotoxin on the pain-evoked discharge of neurons in thalamic parafascicular nucleus in rats. *Toxicon* 2008; 51:102-11.
- 38- Whang, J et.al. Crotoxin suppresses the tumorigenic properties and enhances the antitumor activity of Iressa® (gefitinib) in human lung adenocarcinoma SPCA-1 cells. *Mol Med Rep* 2014; 10(6):3009-14.
- 39- Chaim-Matyas, A; Ovadia, M. Cytotoxic activity of various snake venoms on melanoma, B16F10 and chondrosarcoma. *Life Science* 1987; 40(16):1601-07.
- 40- Han, R et. al. Crotoxin induces apoptosis and autophagy in human lung carcinoma cells in vitro via activation of the p38MAPK signaling pathway. *Acta Pharm Sin* 2014; 35(10):1323-32.
- 41- Muller, V.D.M et. al. Crotoxin and phospholipases A₂ from *Crotalus durissus terrificus* showed antiviral activity against dengue and yellow fever viruses. *Toxicon* 2012; 59(4).
- 42- Gatti, M.A.N. Tratamento de úlceras venosas com adesivo cirúrgico derivado do veneno da serpente. Tese - Faculdade de Medicina de Botucatu – FMB, Unesp, 2009.

- 43- Castro, F.R. Efeito da Crotapotina na evolução clínica da neurite experimental auto-imune. Dissertação - Universidade de Campinas –UNICAMP, 2006.
- 44- Lourenço Jr, A. Variação sexual, ontogenética e ambiental do veneno de *Crotalus durissus terrificus* da região de Botucatu – São Paulo: Caracterização enzimática, bioquímica e farmacológica. Dissertação - Faculdade de Medicina de Botucatu. Universidade Estadual Paulista – FMB-UNESP, 2011.
- 45- Aird, S.D et. al. A complete amino acid sequence for the basic subunit of crotoxin. Archives of Biochemistry. Biophysics, 1986.
- 46- Conrado, M.A. Estrutura e mecanismo de um peptídeo célula-penetrante extraído do veneno da serpente brasileira *Crotalus durissus terrificus*. Tese - Universidade Estadual Paulista – UNESP, 2013.
- 47- Oliveira, D.G et al. Structural and biological characterization of a crotapotin isoform isolated from *Crotalus durissus cascavella* venom. Toxicon 2003; 42(2003):53-62.
- 48- Lourenço Jr, A. et.al. Individual venom profiling of *Crotalus durissus terrificus* specimens from a geographically limited region: Crotamine assessment and captivity evaluation on the biological activities. Toxicon 2013; 69(2013):75-81.
- 49- Garcia, F et. al. Crotapotin induced modification of T lymphocyte proliferative response through interference with PGE2 synthesis. Toxicon 2003; 42(4):433-7.



Capítulo II

Artigo científico à ser submetido

Crotalus durissus terrificus crotapotin naturally displays preferred positions for amino acid substitutions

Laudicéia Alves de Oliveira^a, Rui Seabra Ferreira Júnior^a, Benedito Barraviera^a, Francilene Capel Tavares de Carvalho^a, Luciana Curtolo de Barros^b, Lucilene Delazari dos Santos^a, Daniel Carvalho Pimenta^a.

^aDepartamento de Doenças Tropicais, Faculdade de Medicina de Botucatu – FMB, UNESP.

^bDepartamento de Pesquisa Clínica, Faculdade de Medicina de Botucatu – FMB, UNESP.

Corresponding author: Instituto Butantan – Av. Vital Brazil, 1500. São Paulo – SP, Brazil. CEP: 05503-900, Phone: +55 11 2627 9746.
e-mail: dcpimenta@butantan.gov.br

Abstract

Background: Classically, the *Crotalus durissus terrificus* (Cdt) venom can be described, according to chromatographic criteria, as a simple venom, composed of four major toxins, namely: giroxin, crotamina, crotoxin and convulxin. Crotoxin is a non-covalent heterodimeric neurotoxin constituted of two subunits: an active phospholipase A₂ and a chaperone protein, termed crotapotin. This molecule is composed of three peptide chains, connected by seven disulfide bridges. Naturally occurring variants/isoforms of either crotoxin or crotapotin itself have already been reported.

Methods: The crude Cdt venom was separated by using RP-HPLC and the toxins were identified by mass spectrometry (MS). Crotapotin was purified, reduced and alkylated in order to separate the peptide chains, which were analyzed by mass spectrometry and de novo peptide sequencing.

Results: The RP-HPLC profile of the isolated crotopotina chains already indicated that the α chain would present more isoforms, which was corroborated by the MS and MS/MS analyses.

Conclusion: It was possible to observe that the Cdt crotopotin displays a preferred amino acid substitution pattern present in the α chain, at positions 31 and 40. Moreover, substitutions could also be observed in β and γ chains (one for each). The combinations of these four different peptides, with the already described chains, would produce 10 different crotopotins, which is compatible to our previous observations for the Cdt venom.

Background

Snake venoms are protein and peptide rich and complex mixtures, in which such molecules can comprise up to 95% of the venom dry weight [1,2]. Such molecules do aid the animal survival, once they may be used either as a hunting tool as well as a defense mechanism. [3]. Moreover, these toxins are also involved in the ophidic accident [4]. Crotoxin, the major *Crotalus durissus terrificus* (Cdt) venom toxin, is also the most toxic toxin. It is an heterodimeric neurotoxin comprised of a basic phospholipase A₂ (PLA₂) and an acid protein, also known as crotapotin [7,8].

Crotapotin is a 9,6 kDa peptide, presenting a pI of 3,4 [9,10] that was initially characterized as a chaperone for the PLA₂ which would increase the toxin toxicity as well as inhibit the PLA₂ activity [11,12]. However, such peptide has also been described as presenting an anti-inflammatory activity [13,14,15], being able to modulate the humoral immunity [16], including for some neurodegenerative autoimmune disorders [17].

Structurally, crotapotin is composed of three peptide chains, connected by seven disulfide bonds [16,18]. These chains, termed α , β and γ , were first sequenced in 1985 [19] and the 40 amino acids was the length of the α chain, 35 for the β chain and 14 for the γ chain [20, 21]. On the other hand, other authors have observed the presence of natural variations of crotapotin [17, 22].

In the present study, we have developed a methodology for the isolation of crotapotin from the crude Cdt venom, followed by the separation of the peptide chains, after reduction and alkylation, and de novo mass spectrometry peptide sequencing.

Methods

Venoms and animals

The pooled Cdt venom was obtained from snakes kept in the Centro de Estudos de Venenos e Animais Peçonhentos – CEVAP (UNESP), in Botucatu (SP, Brazil). The present study was approved by the Ethics Committee (protocol 1145/2015).

RP-HPLC

A centrifuged (3800 g) 10 mg.mL⁻¹ crude Cdt venom solution (in 0,1% trifluoroacetic acid) was separated by RP-HPLC using a Luna C8 column (100A, 250 x 10 mm, Phenomenex) coupled to a Shimadzu Proeminence binary HPLC system, using a 20-40% linear gradient of B (90% Acetonitrile, containing 0,1% TFA) over A (0,1% TFA), over 40 min after initial isocratic elution for 5 min, under a constant flow of 5 mL.min⁻¹. UV monitoring was at 214 nm. Fractions were manually collected. The reduced and alkylated crotopotin chains were separated by a Shimpack C18 column (100A, 10 x 4,6 mm, Shimadzu), using a 0-50% linear gradient of B, for 20 min, under constant flow of 1 mL.min⁻¹. UV monitoring was performed at 225 nm.

Chemical processing

Isolated crotopotin was reduced with 500 mM DTT in 50 mM NH₄HCOOH for 25 min at 56 °C and alkylated with 500 mM IAA for 30 min, at 25 °C, protected from light. The isolated α and β chains were chemically hydrolyzed with 70% formic acid for 48 h, at 37 °C. Reaction was stopped by water addition followed by lyophilization. The γ was not chemically hydrolyzed, as it contained only 14 amino acids residues, compatible to CID.

Mass spectrometry and de novo peptide sequencing

A Bruker ESI-Q-TOF instrument, coupled to a Proeminence Shimadzu binary HPLC, was employed for MS and MS/MS experiments. Samples was place in the autosampler holder, and submitted to a 10-80% linear gradient of B for 15 min, under constant flow of 0,2 mL.min⁻¹, using a Shimpack C18 column (100A, 10 x 2 mm). CID fragmentation for MS/MS experiments was performed with N₂. Data were acquired under a 50-2000 m/z window and processed by the Peaks Suite.

Results

Crotapotin isolation

Figure 1 presents the C8-RP-HPLC profile of the crude Cdt venom separated according to the Methods section. Six fractions (F1-F6) were manually collected and submitted to MS analyses in order to identify the known toxins. F1 and F2 are crotoxins, F3 corresponds to crotapotin and F4/5/6 are PLA₂'s. The minor peaks were not collected or analyzed by MS. F3 was then submitted to another chromatographic step (Figure 1, insert) in order to assess its homogeneity and the molecular mass was determined (Figure 2). Figure 2 already points out to the presence of more than one molecule; however, the charge states are only indicated for the major ions.

Crotapotin chains isolation

Following reduction and alkylation, as described in Methods, the processed crotapotin was subjected to RP-HPLC chromatographic separation in order to obtain the α , β and γ chains isolated. Figures 3A and 3B (zoomed chromatogram) present the chains separation. The major peaks in the chromatogram correspond to the reagents (data not shown). The chains were identified based on their molecular masses, as presented in figures 4A, B and C.

De novo peptide sequencing

The isolated formic acid hydrolyzed crotapotin chains were analyzed by LC-MS/MS (ESI-Q-TOF) and the fragmentation spectra are presented in figures 5A, 5B and 5C. Only the spectra of the isoforms are presented. Several spectra, corresponding to the known/deposited sequences were obtained but are not presented.

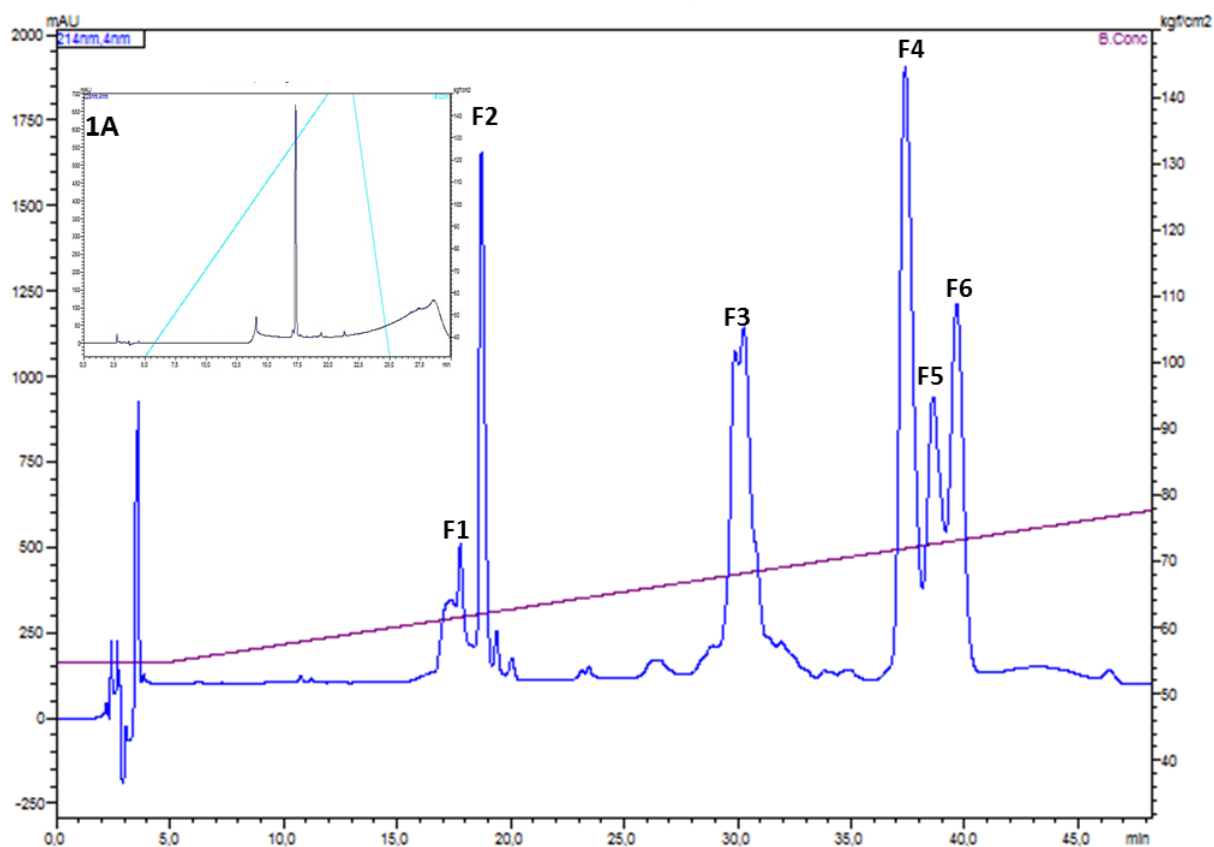


Figure 1: RP-HPLC profile of the crude Cdt venom. F1-F6 correspond to the manually collected fractions. F1/2: crotamin; F3: crotapotin; F4/5/6: PLA₂. UV monitoring 214 nm. Insert: F3 analytical RP-HPLC demonstrating the proper molecule isolation.

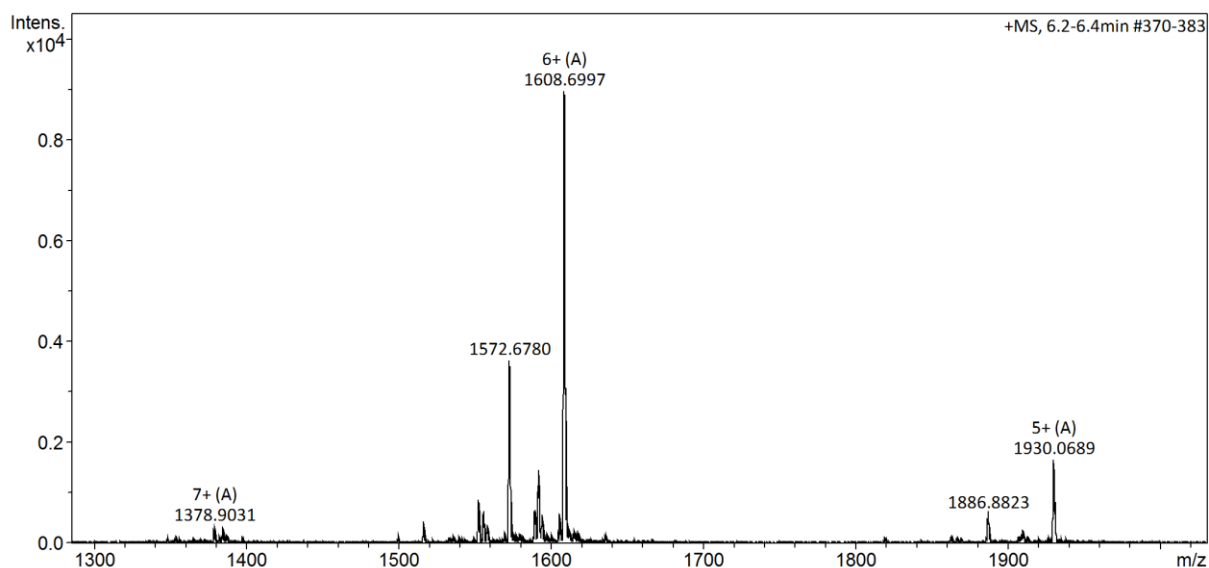


Figure 2: F3 MS spectrum. The charge state of the major ions are typed over the m/z value.

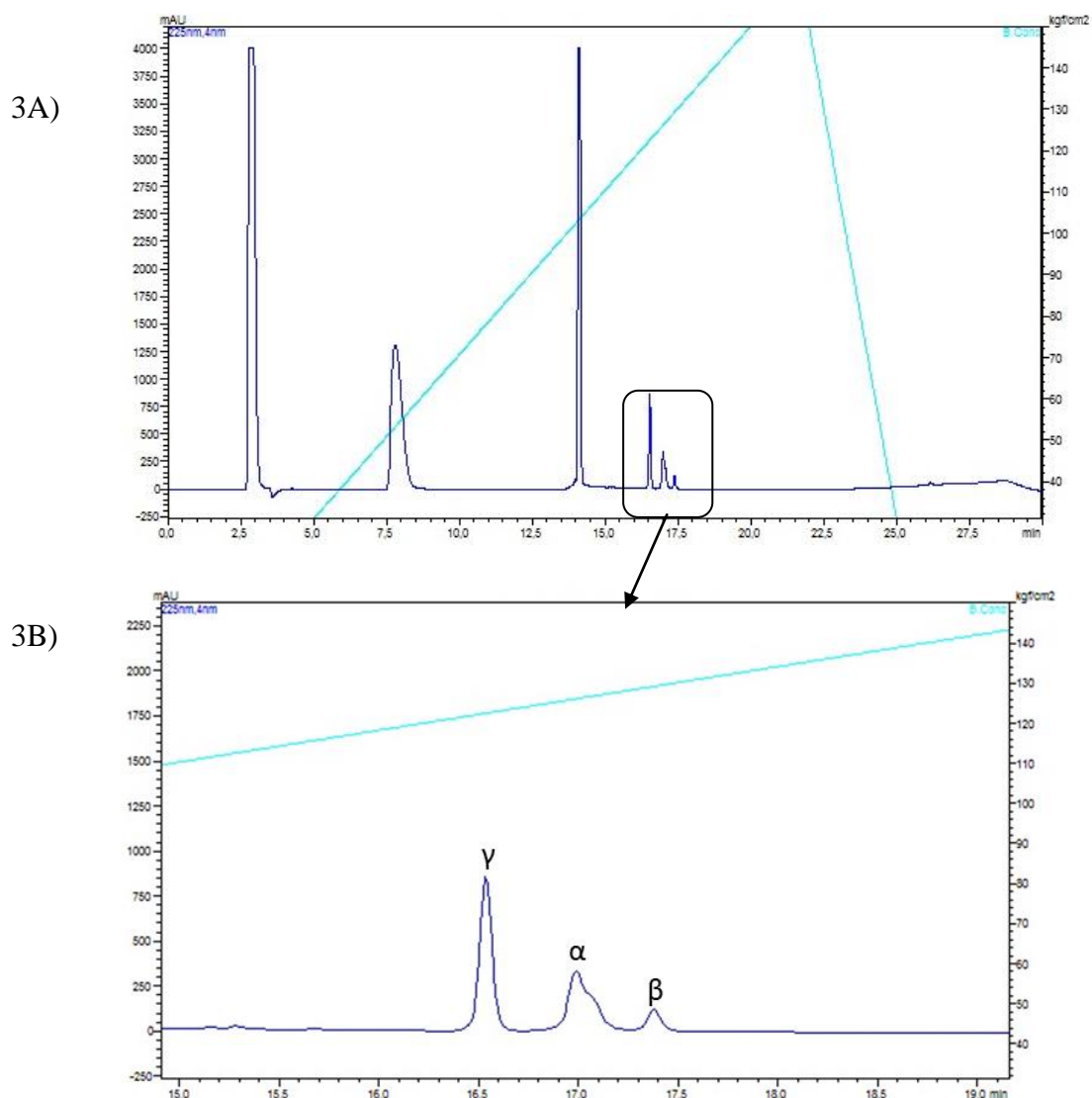
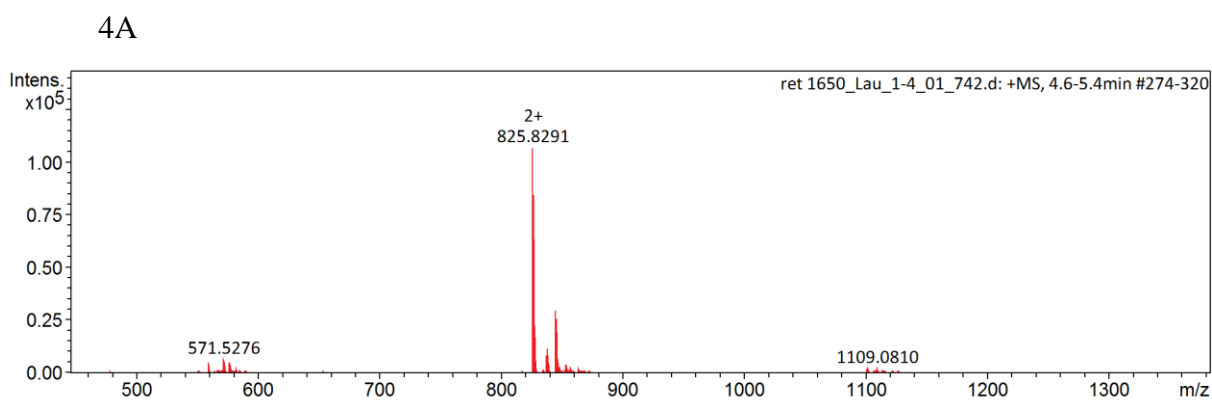
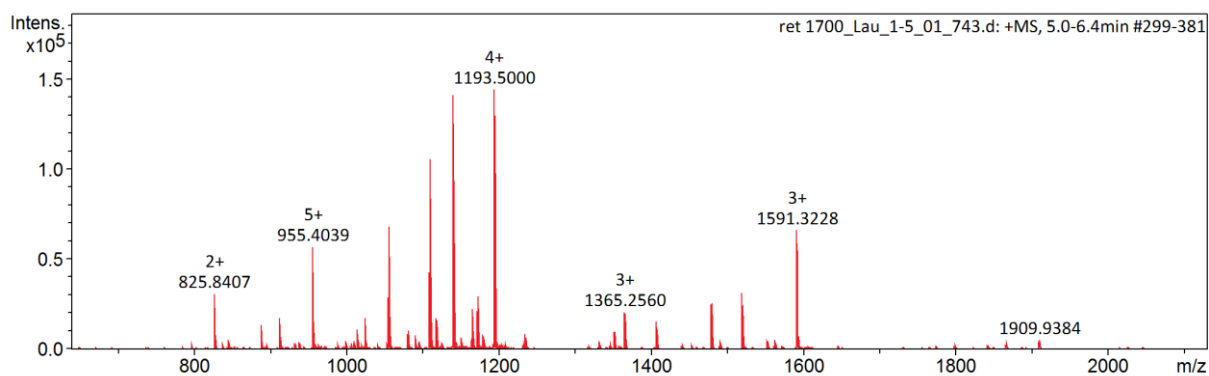


Figure 3: A) Reduced and alkylated crotopotin RP-HPLC separation chromatogram. B) Zoomed region with the identification of the individual chains. UV monitoring 225 nm.



4B



4C

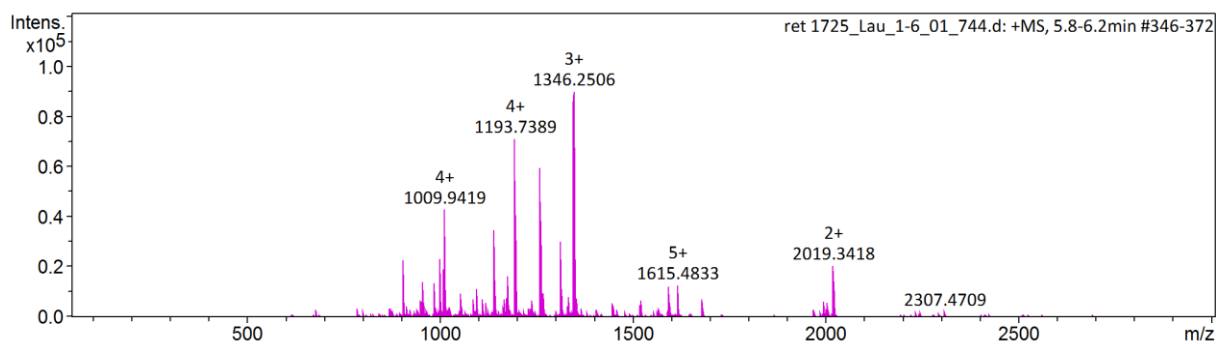
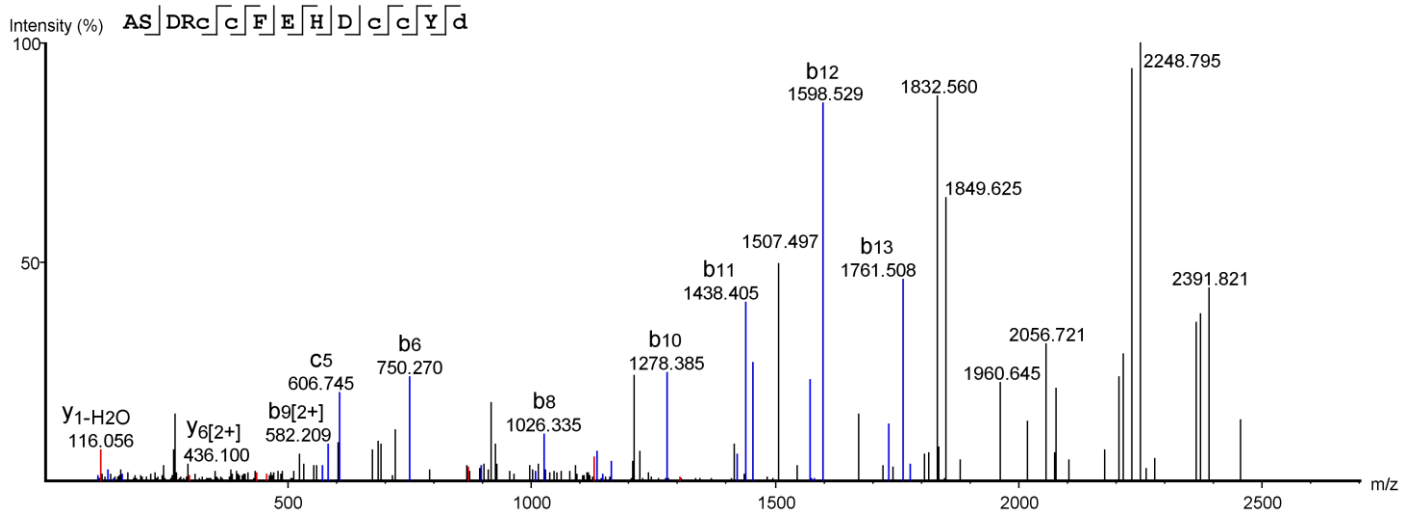
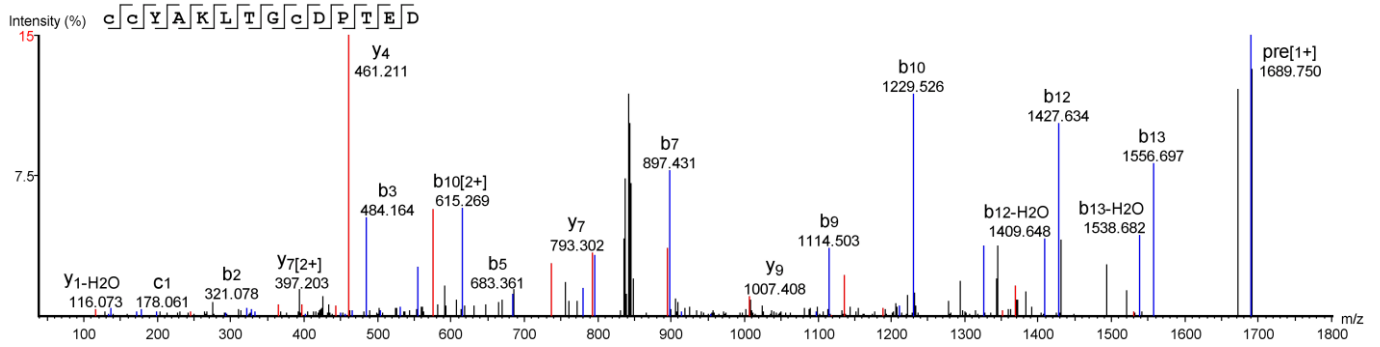
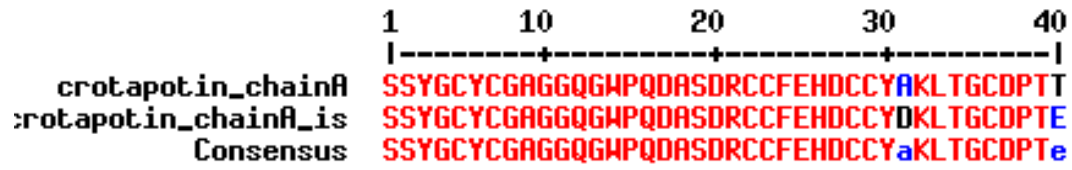


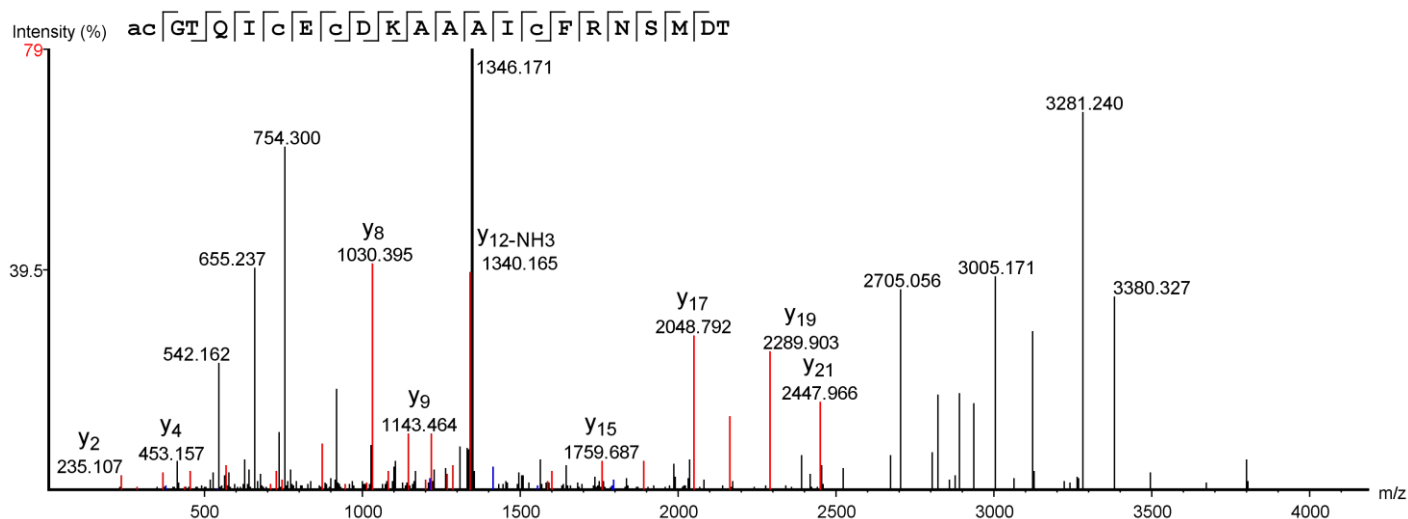
Figure 4: MS spectrum of the γ (A), β (B) and α (C) chains. The charge state of the major ions are typed over the m/z value.

5A



5B

1 **10** **20** **30** **36**
 |-----+-----+-----+-----+-----|
 crotapotin_chainB **RQEDGEIYCGEDDPCGTQICECDKAAAI**CFRNSMDT
 crotapotin_chainB_is **RQEDGEIYCGEDD**ACGTQICECDKAAAI**CFRNSMDT**
 Consensus **RQEDGEIYCGEDD**aCGTQICECDKAAAI**CFRNSMDT**



5C

1 **10** **14**
 |-----+-----+-----|
 crotapotin_chainC **QFSPENCQGESQPC**
 crotapotin_chainC_is **QFSPENCQGESR**PC
 Consensus **QFSPENCQGES**rPC

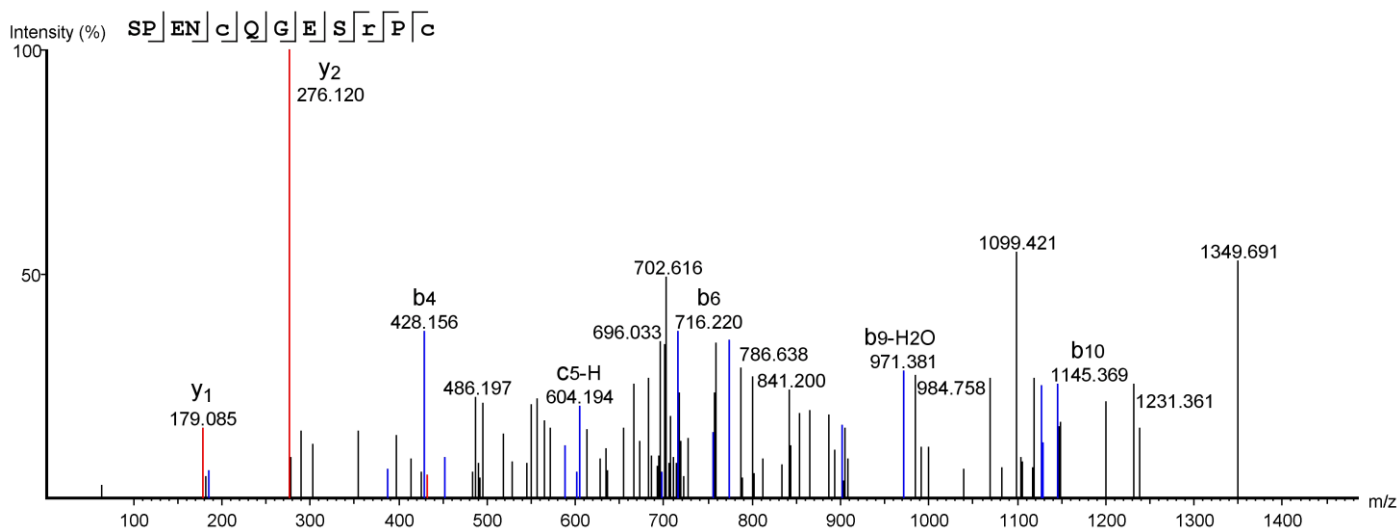


Figure 5: Annotated interpreted CID fragmentation spectra of the de novo sequenced isoforms of crotapotin α (A), β (B) and γ (C) chains. Above each chain, the aligned sequences presenting the amino acid substitution

Discussion

Crotoxin is a β neurotoxin, composed of two subunits: an active PLA₂ and the catalytic inactive crotopotina [23, 24]. Since most venoms and toxins present isoforms, a consequence of an evolutionary strategy, we have chosen to evaluate whether there would be a preferred substitution site in a given crotopotin subunit that would give rise to the previously observed isoforms [22].

In order to achieve this, we have developed a chromatographic method for the separation of crotopotin from the crude Cdt venom, and another method for the obtainment of the reduced and alkylated subunits. Moreover, due to the subunits particular amino acid composition, classical proteomics approaches (based on trypsin hydrolysis) could not be performed. Conversely, we have opted for the formic acid hydrolysis to adjust the peptide size to the CID fragmentation requirements. Interestingly, such strategy helped in the identification of a particular α chain isoform, in which the deposited Ala³¹ was replaced by an Asp, yielding a new formic acid cleavage site, that was successfully used in the de novo sequencing process. According to our analyses, what happens in the venom gland is merely amino acid substitutions and not alternate processing, i.e., we were not able to detect longer or shorter chains, only isoforms regarding residues changes [9]. Most of the isoforms did present molecular masses close to the already known molecule [16].

During the course of the work, we have successfully covered 97% of crotopotin using the proteomics/de novo sequencing (data not shown). However, few spectra didn't match the deposited sequence and, by using a combination of the Spider algorithm of Peaks and manually checking the spectra for correction, we were able to identify four amino acid substitutions. Interestingly, the α chain bears more substitutions, as the HPLC irregular peak shape already indicated (Figure 3B). Since the α and β chains are homologous the PLA₂, such preference for mutation in these chains may have a counter part in the isoforms also observed for the Cdt PLA₂ itself [22, 25].

Our de novo data specifically indicates the Thr->Glu⁷⁷, Ala->Asp⁶⁸ substitutions in the α chain. In spite the Thr->Glu⁷⁷ substitution would retain the hydrogen bond capabilities (but with the addition of a true charge), the Ala->Asp⁶⁸ substitution seems more disturbing. Such mutation is located in an α -helix and the introduction of a charged residue may alter such structure. Moreover, this particular region is mostly involved in the PLA₂ interaction [26].

In the β chain, the Pro->Ala⁹⁸ substitution would evoke the same kind of alteration. Proline is a rigid, structural relevant amino acid, typically present in protein ‘turn’ regions. On the other hand, Alanine is a much more flexible amino acid. Such substitution would relax this molecule region, allowing for more flexibility and, therefore, different kinds of intermolecular interactions.

The γ chain (also known as crotalfine [27]) presents a Gln->Arg¹³⁶ substitution. This modification has already been reported by Konno et al. [27] and is described as not capable of altering the analgesic properties of this peptide. This is in agreement with our proposal based on the conservation of the electrostatic characteristics of the residue that would retain the hydrogen bond-forming capabilities, in spite of the addition of a charge.

Unfortunately, the absence of genomic (or transcriptomic) data makes it more difficult to characterize other amino acid substitutions that are certainly occurring but, due to the lower relative concentration levels, have not yielded high quality spectra, suitable for the de novo sequencing (data not shown). Few studies report other amino acid substitutions, such as residue 84 of the β chain [28].

Evolution has long been ‘experimenting’ with amino acids substitutions in proteins and peptides in order to increase venom efficiency and efficacy as well as avoid the prey evasive strategies [29, 30]. Not only that, but also synergism aroused by the presence of several isoforms of a given molecule also increases toxicity [31]. If one takes into account the biotechnological appeal of the clinical use of toxins, such isoforms may hint to specific targets when given residues in the toxins are substituted; the Conus toxins are a good example of this concept [32].

Conclusion

The mere existence of venoms and toxic animal secretions is itself a demonstration of an unbalanced (or biased) evolutionary strategy happening in a given organism. Toxins are molecules that must act in the **other** organism, and not in itself. Therefore, regulation mechanisms must exist to prevent local damage. They may include, but are not limited to, the presence of concentrated low affinity inhibitors; the absence of ionic co-factors; the lack of catalytic activity due to conformation restrains; the pH of the media; the timing of the activation of the precursor, among others. Certainly, one of those strategies targeted to

increase the efficiency and efficacy of the venom is the presence of isoforms of a given toxin, as reported here.

REFERENCIAS

- [1] de la Rosa, G et. al. Synthetic peptide antigens derived from long-chain alpha-neurotoxins: Immunogenicity effect against elapid venoms. *Peptides* 2017; 88 (2017): 80–86.
- [2] Kerkis, I et. al. State of the Art in the Studies on Crotoamine, a Cell Penetrating Peptide from South American Rattlesnake. *Biomed Res Inter* 2014; 2014.
- [3] Warrell, D.A. Snake bite. *Lancet* 2010; 375 (2010): 77–88.
- [4] Oliveira, L.M.F. Rapid purification of serine proteinases from *Bothrops alternatus* and *Bothrops moojeni* venoms. *Toxicon*, 2013; 76 (2013): 282-90.
- [5] Rangel-Santos, A et. al. A comparative study of biological activities of crotoxin and CB fraction of venoms from *Crotalus durissus terrificus*, *Crotalus durissus cascavella* and *Crotalus durissus collilineatus*. *Toxicon* 2004; 43 (7): 801-10.
- [6] Madey, J.J, et. al. Facial diplegia, pharyngeal paralysis, and ophthalmoplegia after a timber rattlesnake envenomation. *Pediatr Emerg Care* 2013; 29 (11): 1213-6.
- [7] Vieira, L.F et.al. Biochemical, functional, structural and phylogenetic studies on Intercro, a new isoform phospholipase A₂ from *Crotalus durissus terrificus* snake venom. *Biochimie* 2013; 95 (12): 2365-75.
- [8] Lomeo Rda, S. Crotoxin from *Crotalus durissus terrificus* snake venom induces the release of glutamate from cerebrocortical synaptosomes via N and P/Q calcium channels. *Toxicon* 2014; 85: 5-16.
- [9] Bouchier, C., et. al. Analysis of cDNAs encoding the two subunits of crotoxin, a phospholipase A₂ neurotoxin from rattlesnake venom: the acidic non enzymatic subunit derives from a phospholipase A₂-like precursor. *Biochim. Biophys. Acta*, 1991; 1088: 401- 408.
- [10] Ponce-soto, L.A et.al. Isolation and preliminary enzymatic characterization of a novel PLA₂ from *Crotalus durissus collilineatus* venom. *J. Protein Chem* 2002; 21 (3): 131-6.
- [11] Bon, C, et al. Postsynaptic effects of crotoxin and of its isolated subunits. *Eur. J. Biochem* 1979; 99: 471-81.
- [12] Soares, A.M., et al.. Effects of chemical modifications of crotoxin B, the phospholipase A₂ subunit of crotoxin from *Crotalus durissus terrificus* snake venom,

- on its enzymatic and pharmacological activities. *Int. J. Biochem. Cell* 2001; 33: 877–88.
- [13] Landucci, E.C.T et. al. Effect of crotopotin and heparin on the rat paw edema induced by different secretory phospholipase A2. *Toxicon* 2000; 38, 199–208.
- [14] Yonamine, C.M et.al. Kinetic characterization of gyroxin, a serine protease from *Crotalus durissus terrificus* venom. *Biochimie* 2012; 94(12):2791-93.
- [15] Nunes, F.P.B. Crotoxin is responsible for the long-lasting anti-inflammatory effect of *Crotalus durissus terrificus* snake venom: involvement of formyl peptide receptors. *Toxicon* 2010; 55: (2010) 1100–1106.
- [16] Dos-Santos, M.C. Crotoxina e Crotoxina-símile isoladas de venenos de subespécies de *Crotalus durissus* e suas múltiplas atividades biológicas. *Sci. Amazon* 2014; 3 (1): 102-105.
- [17] Castro, F.R.C. The effect of treatment with crotopotin on the evolution of experimental autoimmune neuritis induced in Lewis rats. *Toxicon* 2007; 49 (2007): 299–305.
- [18] Bon, C., 1982. Synergism of the two subunits of crotoxin. *Toxicon* 1984; 2, 105-109.
- [19] Aird, S.D; Kaiser; I.I; Bieber, A.L. Nomenclature of biological toxins. *Toxicon* 1985; 23 (2):179-87.
- [20] Aird, S.D et. al. A complete amino acid sequence for the basic subunit of crotoxin. *Archs of Biochem. Biophys.* 1986; 249: 296-300.
- [21] Bouchier, C., Boulain, J-C., Bon, C., Ménez, A. Analysis of cDNAs encoding the two subunits of crotoxin, a phospholipase A2 neurotoxin from rattlesnake venom: the acidic non enzymatic subunit derives from a phospholipase A2-like precursor. *Biochim. Biophys. Acta*, 1088: 401- 408, 1991.
- [22] Lourenço Jr, A. et.al. Individual venom profiling of *Crotalus durissus terrificus* specimens from a geographically limited region: Crotoamine assessment and captivity evaluation on the biological activities. *Toxicon* 2013; 69(2013):75-81.
- [23] Fusco, L.S. P9a(Cdt-PLA2) from *Crotalus durissus terrificus* as good immunogen to be employed in the production of crotalic anti-PLA2 IgG. *Toxicology Letters*, 2015: 238 (2015) 7–16.
- [24] Fernandes, C.A.H. Biophysical studies suggest a new structural arrangement of crotoxin and provide insights into its toxic mechanism. *Scientific Reports*, 2017; 7:43885.

- [25] Oliveira, D.G et al. Structural and biological charact characterization of a crotapotin isoform isolated from *Crotalus durissus cascavella* venom. *Toxicon* 2003; 42(2003):53-62.
- [26] Fernandes, C.A.H. Biophysical studies suggest a new structural arrangement of crotoxin and provide insights into its toxic mechanism. *Sci Rep* 2017; 7:43885.
- [27] Konno, k. Crotalphine, a novel potent analgesic peptide from the venom of the South American rattlesnake *Crotalus durissus terrificus*, *Peptides*, 2008; 29 (2008) 1293–1304.
- [28] Faure, G et. al. Multiplicity of Acidic Subunit Isoforms of Crotoxin, the Phospholipase A2 Neurotoxin From *Crotalus Durissus Terrificus* Venom, Results From Posttranslational Modifications. *Biochemistry*, 1991; 30 (32), 8074-83.
- [29] Blanchet, G et. al. Ancentral protein ressurection and engineering opportunities of mamba aminergic toxics. *Sci Rep*. 2017; 7(1):2701.
- [30] Yang, ZMI et.al. Serine protease isoforms in *Gloydius intermedius* venom: Full sequences, molecular phylogeny and evolutionary implications. *J Proteomics*. 2017;164:19-32.
- [31] Dos Santos, LDI et. al. Proteomic characterization of the multiple forms of the PLAs from the venom of the social wasp *Polybia paulista*. *Proteomics*. 2011;11(8):1403-12.
- [32] Lebbe, EKM et.al. Ala-7, His-10 and Arg-12 are crucial amino acids for activity of a synthetically engineered μ -conotoxin. *Peptides*. 2014;53:300-6.

Conclusão

A crotapotina foi isolada com sucesso a partir do veneno bruto de *Cdt*. EM uma etapa seguinte, já contando com desenvolvimento de método, foi possível obter as três cadeias da crotapotina isoladamente, depois da etapa de redução e alquilação. Uma vez que análise da sequência de aminoácidos das subunidades (de acordo com o UniProt) revelou que nem tripsina e nem quimotripsina seriam boas escolhas para proceder com a digestão enzimáticas das cadeias A e B, a fim de compatibiliza-las com o tamanho médio recomendado dos peptídeos a serem submetidos a fragmentação por CID (<15 aa), foi adotada a estratégia de digestão química com ácido fórmico, que cliva após os resíduos ácidos (Asp/Glu) e que seria capaz de gerar peptídeos com tamanho apropriado para CID.

Com a confirmação deste fato, procedeu-se com a fragmentação, em modo positivo. Finalmente, a análise dos dados obtidos até o momento, indicam que a cadeia A é a maior responsável pela presença das isoformas da crotapotina.

ANEXO

Carta de aceite do comitê de ética em pesquisa animal



UNESP



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CAMPUS DE BOTUCATU
FACULDADE DE MEDICINA



CEUA

Comissão de Ética no Uso de Animais
Criada através da Portaria DFM nº 611 de 13/12/2012

CERTIFICADO Nº 1145/2015-CEUA

Projeto de Pesquisa (Protocolo CEUA 1145-2015) Estudo da variação na composição da crotapotina no veneno de *Crotalus durissus terrificus* na região de Botucatu – São Paulo, a ser conduzido por Laudicéia Alves de Oliveira, orientada pelo Prof. Dr. Daniel Carvalho Pimenta, coorientado pelo Prof. Dr. Rui Seabra Ferreira Júnior, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – CONCEA.

Vigência do projeto	31/07/2017
Espécie/Linhagem	Cascavel – <i>Crotalus durissus</i>
Nº de animais	10
Peso/Idade	Não informado
Sexo	Macho/Fêmea
Origem	CEVAP



Prof. Dr. Guilherme A. M. Barros
Presidente da CEUA

Kleber Messias de Gamaral
Kleber Messias de Camargo
Secretário da CEUA

Projeto de Pesquisa aprovado em reunião da CEUA em 30/07/2015

Distrito Rubião Junior, s/nº - Botucatu – S.P. CEP: 18.618-970 Fone: (14) 3880-1608/3880-1609 e-mail secretaria: kleber@fmb.unesp.br