



AUTARQUIA ASSOCIADA À UNIVERSIDADE
DE SÃO PAULO

**CONTRIBUIÇÃO AO ESTUDO DAS GIROXINAS (ENZIMAS
SEMELHANTES À TROMBINA) DOS VENENOS DAS
SERPENTES BRASILEIRAS *LACHESIS MUTA MUTA* E
*CROTALUS DURISSUS TERRIFICUS***

MARIA APARECIDA P. CAMILLO

**Tese apresentada como parte dos requisitos
para obtenção do Grau de Doutor em Ciências
na Área de Tecnologia Nuclear - Aplicações**

**Orientador:
Dr. José Roberto Rogero**

**São Paulo
1998**

INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
AUTARQUIA ASSOCIADA À UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

**CONTRIBUIÇÃO AO ESTUDO DAS GIROXINAS (ENZIMAS
SEMELHANTES À TROMBINA) DOS VENENOS DAS
SERPENTES BRASILEIRAS *LACHESIS MUTA MUTA* E
CROTALUS DURISSUS TERRIFICUS.**



MARIA APARECIDA P. CAMILLO

**TESE APRESENTADA COMO PARTE DOS
REQUISITOS PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE
DOUTOR EM CIÊNCIAS NA ÁREA DE
TECNOLOGIA NUCLEAR.**

ORIENTADOR: DR. JOSÉ ROBERTO ROGERO
COORIENTADOR: DR. LANFRANCO RANIERI
PAOLO TRONCONE

SÃO PAULO
1998

AGRADECIMENTOS

À Direção do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares - CNEN/SP , pela oportunidade e condições fornecidas para a realização deste trabalho;

À Chefia do Laboratório de Farmacologia do Instituto Butantan, Dra Zuleika Picarelli Ribeiro do Vale e Dra Eurídice Carmona, pela oportunidade de utilização dos laboratórios para realização de parte dos experimentos;

Ao Dr. José Roberto Rogero, orientador, pelo apoio e confiança durante a realização deste trabalho,

Ao Dr. Lanfranco Ranieri Paolo Troncone, coorientador, pelos ensinamentos e constantes incentivos,

Ao Paulo Cesar Arruda Paes, estagiário, pela dedicação e inestimável colaboração.

Durante os anos de sua realização tantas foram as pessoas que colaboraram na execução, que seria impossível citá-las nominalmente sem que alguém fosse esquecido. Desta forma, agradeço e dedico a todos que direta ou indiretamente contribuíram na execução do mesmo.

CONTRIBUIÇÃO AO ESTUDO DAS GIROXINAS (ENZIMAS SEMELHANTES À TROMBINA) DOS VENENOS DAS SERPENTES BRASILEIRAS *LACHESIS MUTA MUTA* E *CROTALUS DURISSUS TERRIFICUS*.

Maria Aparecida P. Camillo

RESUMO

Os estudos das toxinas animais têm trazido contribuições importantes para as Biociências pois o uso de diferentes e seletivas toxinas em sistemas biológicos têm gerado grandes progressos no conhecimento dos processos fisiológicos e mantido a motivação para novas pesquisas.

A giroxina, ou enzima semelhante à trombina, é uma das toxinas mais importantes do veneno de *Lachesis muta muta* sendo também encontrada no veneno de *Crotalus durissus terrificus*. Possui atividades enzimáticas (amidásica, esterásica e fibrinogenolítica) e a capacidade de induzir, em animais de experimentação, o "rolamento em barril" (caracterizada por hipoatividade progressiva, perda de equilíbrio e movimentos rotatórios ao longo do eixo longitudinal do corpo). Com o intuito de conhecer melhor esta toxina, quanto a uma possível ação neurotóxica, toxicocinética e via de eliminação, foi efetuado o presente trabalho. As giroxinas foram obtidas pelos fracionamentos dos venenos em cromatografias de gel filtração e afinidade. Se mostraram ativas nos ensaios enzimáticos e no teste *in vivo* de indução do "rolamento em barril". No teste de neurotoxicidade (método de liberação de neurotransmissores tritados *in vitro*) não houve alteração do perfil de liberação controle tanto de [³H]dopamina como de [³H]acetilcolina e não forneceu evidências de atravessar a barreira hematoencefálica, corroborando a hipótese de uma ação indireta sobre o sistema nervoso central. Para a análise toxicocinética foi utilizado as toxinas radioiodadas (com Na¹²⁵I) e estas apresentaram distribuição rápida, ajustada pelo modelo bicompartimental e eliminação pela via urinária.

**CONTRIBUTION TO THE STUDY OF GYROXINS (THROMBIN-LIKE ENZYMES)
FROM BRAZILIAN SNAKES VENOMS OF *LACHESIS MUTA MUTA* AND
CROTALUS DURISSUS TERRIFICUS VENOMS**

Maria Aparecida P. Camillo

ABSTRACT

The study of animal toxins has brought important contribution to the Biosciences. The use of different and selective toxins in biological systems has increased the knowledge on physiological processes, keeping the interest in those researches.

The gyroxin, a thrombin-like enzyme, is one of the most important toxin from *Lachesis muta muta* venom, which is also found in *Crotalus durissus terrificus* venom. The gyroxin has enzymatic activities (amidase, steric and fibronogenolytic) and the capability of inducing, in animals for experimentation, the "barrel rotation syndrome" (characterized by the progressive hypoactivity, followed by a loss of the righting reflex and rotation around the long axis of the body). This study has been carried out with the purpose of better understanding of gyroxin, including the possible neurotoxic action, the toxicokinetics and the elimination pathways. Both gyroxins, of *Lachesis* and *Crotalus* were obtained through the venoms fractionation using gel filtration and affinity chromatographies. During the enzymatic and *in vivo* assays, the gyroxins resulted active. In the neurotoxicity test (method of release tritiated neurotransmitter *in vitro*) there was no change in the control release profile for [³H]dopamine and [³H]acetylcholine and no evidence was shown for crossing the blood-brain barrier, strengthening the hypothesis of an indirect action on the central nervous system. In order to obtain the toxicokinetics analysis, ¹²⁵I radioiodinated toxins were used. The toxins presented fast distribution adjusted by the two-compartmental model and elimination through urine.

LISTA DE ABREVIATURAS UTILIZADAS NO TEXTO

ACH	Acetilcolina
ACPD	Ácido trans-1-amino ciclopentano 1-3-dicarboxílico
AMPA	Ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil ioxizol-4-propiónico
AP4	1-2-amino-4-fosfonobutirato
DA	Dopamina
DFP	Fluorofosfato diisopropila
DL-BAPNA	Benzil-DL-arginina p-nitroanilida
EGPA-SDS	Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio
EGTA	Ácido etilenoglicol-bis (β -aminoetil eter) N,N,N',N' tetracético
GLU	Glutamato
HPLC	Cromatografia líquida de alta resolução
KRB	Tampão bicarbonato-Krebs-ringer
NMDA	N-metil-D-aspartato
PMSF	Fluoreto de p-toluenosulfonila
TACK	Tosil-arginima-clorometil-cetona
TAME	Tosil-arginima metil ester
TTX	Tetrodotoxina

1. INTRODUÇÃO

. As serpentes -----1

. A giroxina e sua atividade semelhante à trombina ----- 3

. A giroxina e sua atividade neurotóxica ----- 6

2. OBJETIVOS ----- 8

3. MATERIAL E MÉTODOS

MATERIAIS ----- 9

MÉTODOS

3.1. Obtenção das toxinas ----- 10

 3.1.1. Cromatografia em gel filtração----- 10

 . Veneno de *Lachesis muta muta* ----- 10

 . Veneno de *Crotalus durissus terrificus* ----- 10

 3.1.2. Cromatografias em colunas de afinidade -----11

 . Veneno de *Lachesis muta muta* -----11

 . Veneno de *Crotalus durissus terrificus* -----11

3.2. Localização das frações ativas -----11

 3.2.1. Atividade amidásica ----- 12

 3.2.2. Atividade *in vivo* ----- 12

3.3. Concentração protéica ----- 13

3.4. Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)----- 13

3.5. Cromatografias em HPLC ----- 15

3.6. Método <i>in vitro</i> de liberação de [³ H]neurotransmissores -----	15
. Preparação do tecido -----	15
. Ensaio de liberação -----	16
. Ação de fármacos na liberação -----	18
. Ação de neurotoxinas na liberação -----	18
. Teste das gioxinas laquéica e crotálica na liberação ---	18
3.7. Radioiodação das gioxinas -----	18
3.8. Estudo cinético da [¹²⁵ I]gioxina -----	21
3.8.1. Medidas no sangue -----	21
3.8.2. Medidas nas fezes e urinas -----	22
3.9. Teste de passagem pela barreira hematoencefálica -----	22

4. RESULTADOS

4.1. Obtenção das toxinas

4.1.1. Cromatografia em gel filtração

. Veneno de *Lachesis muta muta* -----24

. Veneno de *Crotalus durissus terrificus* -----25

4.1.2. Cromatografias em colunas de afinidade

. Veneno de *Lachesis muta muta* -----26

. Veneno de *Crotalus durissus terrificus* -----27

4.2. Localização das frações ativas ----- 27

4.3. Concentração protéica ----- 28

4.4. Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)----- 28

4.5. Cromatografias em HPLC----- 33

4.6. Método *in vitro* de liberação de [³H]neurotransmissores ----- 34

. Ação de fármacos na liberação -----	35
. Ação de neurotoxinas na liberação -----	37
. Ação das giroxinas na liberação -----	42
4.7. Radioiodação das giroxinas -----	45
4.8. Estudo cinético da [¹²⁵ I]giroxina	
4.8.1. Medidas no sangue -----	47
4.8.2. Medidas nas fezes e urinas -----	49
4.9. Teste de passagem da barreira hematoencefálica -----	51
5. DISCUSSÃO -----	52
. Considerações finais -----	63
6. CONCLUSÕES -----	65
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS -----	66

O estudo das gironinas de *Lachesis muta muta* Linnaeus, 1766 e de *Crotalus durissus terrificus* Laurent, 1768 foi motivado por diversos aspectos: a complexidade e o limitado conhecimento que se tem sobre os venenos de *Lachesis*, a relação filogenética entre os dois gêneros, a aplicação clínica das enzimas semelhantes à trombina e, em especial, a característica desta toxina induzir o giro ou "rolamento em barril", possivelmente uma ação neurotóxica.

. As serpentes

O gênero *Lachesis* contém uma única espécie, *Lachesis muta* que se distribui da parte sul da América Central ao centro da América do Sul. Esta serpente gigante é frequentemente maior que 2000 mm no comprimento total e com descrições de mais de 3600 mm. O gênero se caracteriza por, além de apresentar fosseta loreal e denticção solenóglifa, ter a porção final da cauda com escamas eriçadas. No Brasil, são popularmente conhecidas como surucucu na bacia amazônica, surucucu-de-fogo no nordeste e surucucu pico-de-jaca no Pará e Bahia, surucucutinga e surucutinga na região centro-oeste (CAMPBELL & LAMAR, 1989; JORGE & RIBEIRO, 1990).

O habitat desta serpente são as florestas tropicais e áreas de montanhas baixas com alto índice de pluviosidade acima de 2000 mm e usualmente maior que 4000 mm de chuva anuais). Geralmente, habita florestas primárias e, ocasionalmente, situações de florestas secundárias mas próximas a primárias. É a única serpente peçonhenta ovípara e uma das poucas serpentes que permanecem chocando e protegendo os ovos até o nascimento dos filhotes. Quatro subespécies foram descritas: *Lachesis muta stenophrys* encontrada na costa atlântica da Costa Rica e Panamá, se estendendo para a região central do Panamá; *Lachesis muta melanocephala*, na costa oeste da Costa Rica; *Lachesis muta muta* na floresta equatorial da Colômbia, Venezuela, Trinidad e Tobago, Guiana, Suriname, Guiana Francesa, Brasil, Equador, Peru e Bolívia e, finalmente, *Lachesis muta rhombeata* na mata atlântica do Brasil, região costeira que se estende do sudeste ao nordeste brasileiro (CAMPBELL & LAMAR, 1989).

São serpentes ativas no crepúsculo e durante a noite. Popularmente são conhecidas como serpentes agressivas, mas há autores que questionam esta

agressividade, principalmente, por observações de seu comportamento em cativeiro. No entanto, é consenso que após o anoitecer são mais ágeis e que as *Lachesis da Costa Rica* são atipicamente agressivas quando importunadas, adquirindo uma postura de defesa, inflando o pescoço e vibrando a cauda de forma audível (CAMPBELL & LAMAR, 1989).

As *Lachesis* são serpentes difíceis de serem capturadas e mantidas em cativeiro, o que torna a disponibilidade de veneno limitada, tanto para a pesquisa quanto para a produção de anti-soro específico destinado à clínica. Assim, estes são venenos pouco estudados, não tendo suas características bioquímicas e patofisiológicas bem definidas, principalmente para as subespécies da América do Sul (*Lachesis muta muta* e *Lachesis muta rhombeata*).

A *Crotalus durissus* é uma espécie com distribuição ampla, sendo encontrada desde o México até a Argentina e com 6 subespécies que habitam o território brasileiro: *Crotalus durissus terrificus*, *Crotalus durissus collilineatus*, *Crotalus durissus cascavela*, *Crotalus durissus marajoensis*, *Crotalus durissus ruruima* e *Crotalus durissus trigonicus*. Seu habitat são regiões semi áridas incluindo florestas tropicais secas ou muito secas e matas de espinhos; mas também áreas abertas relativamente secas. São serpentes terrestres, corpulentas e medindo 1000 mm de comprimento. Machos grandes em algumas populações chegam a medir 1400-1600 mm, no máximo 1800 mm. O gênero se caracteriza pela presença de fosseta loreal, denticção solenóglifa e o guizo na porção final da cauda. São popularmente conhecidas como boicininga (Amazonas), boicinunga, boiquira, cascavel, cascavel de quatro ventas (nordeste e sudeste), cobra de guizo (Rio Grande do Sul), maracá e maraca-bóia (Amazonas e centro-oeste) (CAMPBELL & LAMAR, 1989).

As cascavéis são serpentes pouco agressivas e geralmente agitam o guizo para alertar da sua presença, no entanto, sua posição de defesa é muito interessante: enfrentam seus inimigos com a cabeça e porção anterior do corpo levantadas do chão e o pescoço dobrado como um cajado (CAMPBELL & LAMAR, 1989).

A *Crotalus durissus terrificus* pode ser encontrada desde a Bolívia, Paraguai, Uruguai, Argentina até nas regiões sul e sudeste do Brasil (do Rio Grande do Sul ao norte de Mato Grosso e Minas Gerais, passando por Santa Catarina, Paraná e São Paulo). Populações isoladas podem ser encontradas na Amazônia e Pará (Campos de Humaitá, Serra do Cachimbo e Santarém) (ROMANO-HOGE, 1990). São muito

temidas pois seu veneno é altamente tóxico, provocando quadros clínicos graves com discreta reação local e intensa ação neurotóxica, coagulante e principalmente miotóxica que pode levar ao óbito por insuficiência renal aguda e mais raramente por insuficiência respiratória (AZEVEDO-MARQUES et al., 1992).

A relação filogenética entre estes gêneros foi proposto por BRATTSTROM (1964) quando estudava os esqueletos de serpentes da família Crotalidae; sugerindo que os gêneros *Agkistrodon*, *Lachesis*, *Crotalus* e *Sistrurus* pertenceriam a um mesmo ramo evolutivo, nesta seqüência e com um ancestral comum. As observações de VITAL BRASIL (1909) corroboram esta hipótese ao notar que o veneno laquétrico quase não apresentava diferença quanto à toxicidade ao ser administrado por via endovenosa ou intramuscular; não apresentava congestão de órgãos internos e era pouco hemorrágico. Sugeriu então, que este era um dos venenos que mais se afastava do tipo botrópico e que se aproximava do tipo crotálico.

As relações evolutivas também podem ser detectadas pelas características bioquímicas dos venenos (TU et al., 1965; TAN & PONNUDURAI, 1992). Esta possibilidade foi o que motivou DA SILVA et al., 1989 a pesquisarem traços de crotoxina no veneno de *Lachesis muta muta* e embora o objetivo inicial não tenha sido alcançado os autores detectaram a presença de uma outra toxina análoga àquela descrita no veneno de *Crotalus durissus terrificus*, a giroxina.

. A giroxina e sua atividade semelhante à trombina

O primeiro registro experimental de alteração da coagulação induzida por veneno de serpente é de 1781, no entanto, sem dúvida este efeito já era conhecido clinicamente pelos sintomas apresentados pelas vítimas de picadas (MARSH, 1994).

Inúmeros estudos foram feitos visando entender como os diferentes venenos agem na coagulação, qual a sua importância no quadro clínico dos envenenamentos e como os anti-soros neutralizam esta atividade (ROSENFELD & KELEN, 1966; BOLANOS et al., 1982; GENÉ et al., 1989; OUYANG et al., 1992; SANCHEZ et al., 1992; BARD et al., 1994; KAMIGUTI & SANO-MARTINS, 1995; JORGE et al., 1997).

O interesse pelas enzimas semelhantes à trombina ganhou nova importância com a possibilidade de utilização no tratamento de doenças trombóticas e como anticoagulante (REID & CHAN, 1968); assim a partir da década de 70 os fatores responsáveis por estes efeitos começaram a ser isoladas e caracterizadas

(STOCKER,1990). Estas enzimas foram isoladas de venenos de serpentes da subfamília Crotalidae e Viperidae; possuem algumas propriedades físico-químicas em comum; são ativas em substratos sintéticos; porém apresentam diferenças na clivagem das ligações peptídicas e nas atividades sobre os fatores de coagulação e plaquetas (KORNALIK, 1990; OUYANG et al., 1992).

Dentre as várias enzimas semelhantes à trombina descritas, somente a Batroxobin^R e Reptilase^R obtidas do veneno de *Bothrops atrox*, Defibrase^R do *Bothrops moojeni* e Arvin^R Ancrod^R do veneno de *Calloselasma rhodostoma* são comercialmente produzidas para o tratamento de tromboembolias e como reagentes para diagnósticos de distúrbios da coagulação (LATALLO,1983; KORNALICK,1990; PIRKLE & THEODOR,1990).

A maioria das enzimas semelhantes à trombina clivam apenas a cadeia A α do fibrinogênio próximo ao N-terminal (Arg¹⁶-Gly¹⁷) formando o fibrinopeptídeo A, enquanto a trombina produz os fibrinopeptídeos A e B pois também cliva a cadeia B β em Arg¹⁴-Gly¹⁵ (figura 1). Os produtos gerados pela trombina expõem dois sítios de polimerização no N-terminal das cadeias α e β do monômero de fibrina, tendo sítios complementares localizados no C-terminal das cadeias γ e α deste mesmo monômero, respectivamente. Isto permite uma associação lateral dos monômeros, o que não ocorre com os produtos gerados pelas enzimas semelhantes à trombina formando uma forma solúvel (ou "frouxa") de fibrina que é removida pelo sistema fibrinolítico (KAMIGUTE & SANO-MARTINS,1995). Estas observações permitem entender o paradoxo da "defibrinação terapêutica" utilizando estas enzimas purificadas e sua ação coagulante (MARSH,1994).



Figura 1. Representação da estrutura molecular do fibrinogênio, com identificação das cadeias A α , B β e γ . As linhas pontilhadas indicam as pontes S-S (KORNALICK, 1990).

As enzimas semelhantes à trombina dos venenos de *Lachesis muta* já foram purificadas e parcialmente caracterizadas para todas as subespécies: são serino proteases, não ativam o fator XIII da cascata de coagulação, não são inibidas por heparina, não ativam as plaquetas, algumas agem exclusivamente na cadeia A α do fibrinogênio e outras também clivam a cadeia B β , mas com velocidade de reação muito menor (MAGALHÃES et al., 1981; ARAGON-ORTIZ, 1986; 1988; 1993; CAMPOS et al., 1988; SILVEIRA et al., 1989; YARLEQUÉ et al., 1989; OREJUELA et al., 1991; ESCOBAR et al., 1992; AGUIAR et al., 1996). As principais características estão resumidas na Tabela 1.

Tabela 1. Principais características das enzimas semelhantes à trombina isoladas das subespécies de *Lachesis muta*.

VENENO	REF.	PESO MOLECULAR	FIBRINOGENIO.	ATIVIDADE ESTERÁSICA (TAME)	ATIVIDADE AMIDÁSICA (BAPNA)
<i>L.m.melanocephala</i>	(1)	35 kD		+	+
<i>L.m.stenophrys</i>	(2)	49 kD		+	
<i>L.m.stenophrys</i>	(3)	37 kD	A,B	+	
<i>L.m.muta</i>	(4)	41-47 kD	A		+
<i>L.muta</i> (Amazonas, Peru)	(5)	46 kD	A,B	-	-
<i>L.m.muta</i>	(6)		A,B	+	+
<i>L.m.muta</i>	(7)	40 kD	A,B	+	+
<i>L.m.noctivaga</i> *	(8)	36,3 kD		-	+
<i>L.m.rhombeata</i>	(9)	45 kD	A	+	-

* A subespécie *Lachesis muta noctivaga* passou a ser denominada *Lachesis muta rhombeata*.

As referências (REF.) citadas são: (1) ARAGON-ORTIZ, 1988; (2) ARAGON-ORTIZ, 1986; (3) ARAGON-ORTIZ, 1993; (4) SILVEIRA et al., 1989; (5) ESCOBAR et al., 1992; (6) CAMPOS et al., 1988; (7) YARLEQUE et al., 1989; (8) MAGALHÃES et al., 1981; (9) AGUIAR et al., 1996.

A enzima semelhante à trombina do veneno de *Crotalus durissus terrificus* foi isolada e parcialmente caracterizada somente em 1986, embora os sinais e sintomas dos pacientes picados por esta serpente e os estudos *in vitro* do veneno já houvessem identificado a presença desta enzima (RAW et al., 1986). Por análise em eletroforese os autores determinaram que é uma proteína de cadeia única, com peso molecular de 34 kD; com atividades enzimáticas amidásica, esterásica e sobre a cadeia A α do fibrinogênio humano.

. A giroxina e sua atividade neurotóxica

A giroxina do veneno crotálico foi descrita por BARRIO (1961) e mais tarde isolada por BARRABIN et al. (1978). Esta toxina se caracteriza por induzir alterações de equilíbrio típicas de fenômenos motores. Após uma breve fase tônica, o animal apresenta diversos sintomas e, finalmente, um giro ao longo do eixo longitudinal do corpo lembrando o rolar de um barril (daí o nome "rolamento em barril"). Esta síndrome desaparece progressivamente (em aproximadamente 1 hora) restando em raros casos sintomas crônicos. Algumas vezes, é precedida por breves períodos de hiperexcitabilidade com corridas abruptas, outras por palidez e taquipnéia (BARRABIN et al., 1978). A síndrome não é induzida por uma nova injeção logo após a recuperação (ALEXANDER et al., 1988).

Entre as muitas atividades enzimáticas presentes no veneno crotálico foi associado à giroxina a atividade esterásica (BARRABIN et al., 1978) e posteriormente, as atividades amidásica e trombina símile (ALEXANDER et al., 1988).

Estas atividades também foram obtidas com a toxina de *Lachesis muta muta* e ficou comprovado definitivamente que se tratava da mesma toxina com o seqüenciamento de aminoácidos (MAGALHÃES et al., 1993).

Estudos recentes (MOREIRA, 1993) não descartam uma possível ação direta sobre o tecido neural, mostrando que a injeção hipocampal de giroxina isolada do veneno de *Crotalus durissus terrificus*, induz alterações comportamentais, eletrográficas e neuropatológicas de natureza epileptiforme dose dependente. As primeiras alterações comportamentais observadas foram sacudidelas corporais que surgiram 30 a 60 minutos após as injeções e permaneceram por 5 ou 6 horas. Em seguida, a maioria dos animais apresentavam clonias isoladas de membros, mesclados a saltos e seguidos de episódios de corridas abruptas. Associado a estas alterações comportamentais, os animais desenvolveram uma movimentação de andar em círculos tanto no sentido ipsi como contralateral ao sítio de injeção. As crises eletrográficas epilépticas registradas para a giroxina apareciam simultaneamente nos traçados de hipocampo e no registro cortical. Essas crises tinham início, em geral, 2 horas após a injeção de 40 µg e 90 minutos após a injeção de 70 µg. As com maior dose foram mais prolongadas e ao final destas, o traçado podia ser substituído por

uma atividade de espículas isoladas ou grupos de poli espículas ou, ainda, por crises eletrográficas de curta duração (6-11 segundos). As alterações neuropatológicas ocorreram no sítio da injeção, bem como em lesões à distância. Os padrões destas lesões no local da injeção foram de natureza inflamatória enquanto que aquelas à distância, se assemelhavam às causadas por intensa atividade epiléptica (estado do mal epiléptico) após isquemia ou hipoglicemia.

O mecanismo pelo qual estas enzimas induzem o rolamento em barril ainda é desconhecido. Alguns autores sugeriram que a síndrome induzida pela giroxina seria semelhante à lesão labiríntica (BARRIO, 1961; SEKI et al., 1980); enquanto que outros acreditam que teria um efeito indireto sobre o sistema nervoso central decorrente de sua atividade enzimática (ALEXANDER et al., 1988; DA SILVA et al., 1989).

Assim, com o desenvolvimento deste trabalho esperamos contribuir para um melhor entendimento de sua ação neurotóxica.

2. OBJETIVOS

1. Obter a gioxina dos venenos de *Lachesis muta muta* e *Crotalus durissus terrificus* em pureza adequada para os ensaios propostos,

2. Padronizar o método de liberação de [³H]acetilcolina estimulada por K⁺ (potássio) ou Glu (glutamato), *in vitro*, e verificar a resposta do método frente a algumas toxinas já estudadas,

3. Verificar se as gioxinas laquéica e crotálica possuem atividade neurotóxica interferindo com o perfil de liberação de [³H]dopamina e/ou [³H]acetilcolina, no método *in vitro*,

4. Obter as gioxinas radioiodadas

5. Estudar aspectos da cinética das [¹²⁵I]gioxinas, determinar a via de eliminação e verificar se as gioxinas atravessam a barreira hematoencefálica.

MATERIAIS

Todos os reagentes utilizados nos experimentos foram de qualidade para análise.

O veneno de *Lachesis muta muta*, seco e na forma cristalizada, foi cedido pelo Instituto de Medicina Tropical da Amazônia (IMPA) e mantido a -20°C . O veneno de *Crotalus durissus terrificus*, seco e na forma liofilizada, foi obtido do Instituto Butantan e também mantido a -20°C .

Os animais de experimentação, procedentes do biotério do Departamento de Aplicações Biológicas do IPEN, foram mantidos em gaiolas com maravalhas de pinho, recebendo ração comercial e água "ad libitum".

Todos os géis e colunas cromatográficas utilizados nos fracionamentos dos venenos foram da marca Pharmacia (Upsalla, Suécia), assim como o coletor de frações (modelo Frac 200).

A água utilizada no preparo das soluções foi destilada e purificada em um aparelho Milli Q plus-Millipore.

Todas as medidas de absorvância (ou densidade óptica) foram feitas em Espectrofotômetro Ultrospec III da marca Pharmacia.

MÉTODOS

3.1. Obtenção das toxinas

As gioxinas foram obtidas pelo fracionamento dos respectivos venenos utilizando gel filtração e coluna de afinidade.

Todas as cromatografias foram feitas em temperaturas entre 2 e 4°C.

3.1.1. Cromatografias em gel filtração

. Veneno de *Lachesis muta muta*

O gel Sephacryl^R S.200HR, cujo intervalo de fracionamento é de 5 a 250 kD, equilibrado com tampão bicarbonato de sódio 0,1 M, pH 7,2, foi empacotado em coluna XK 26x100, até a altura de 90 cm, seguindo as especificações do fabricante.

Dois padrões de peso molecular (PM) foram utilizados para determinação dos volumes de exclusão (V_0) e volume total (V_t): ferritina (Pharmacia) com PM 440.000 Daltons e triptofano (Sigma) PM 204,2 Daltons.

Amostras de 100 mg de veneno foram dissolvidas em 1 mL de tampão de corrida e centrifugadas a 10.000 g durante 1 minuto. Os sobrenadantes foram aplicados na coluna, coletados em frações de 2,1 mL/tubo, em fluxo constante de 15 mL/h. A densidade óptica das frações foi determinada em 280 nm, com cubetas de 1 cm de percurso, em espectrofotômetro Pharmacia, Ultrospec III.

. Veneno de *Crotalus durissus terrificus*

O gel Sephadex G.100, cujo intervalo de fracionamento é de 4 a 150 kD, inchado em água, foi empacotado em coluna XK 26x100, até a altura de 90 cm, seguindo as recomendações do fabricante, tendo sido em seguida, equilibrado em tampão formiato de amônio 0,1 M, pH 3,0.

Azul de dextrana (Pharmacia) com PM 2.000 kD e triptofano (Sigma) com PM 204,2 Daltons, foram os padrões de pesos moleculares utilizados para determinação do volume de exclusão (V_0) e total (V_t).

As mesmas condições de preparo do veneno a ser aplicado na coluna, assim como o fluxo, volume de frações e leitura em 280 nm utilizadas para o veneno laquétrico, foram adotadas para o crotálico.

3.1.2. Cromatografias em colunas de afinidade

A resina Benzamidina Sepharose 6B foi ativada com lavagens alternadas de tampão Tris HCl 0,1M e NaCl 0,5M, pH 8,5 e tampão acetato de sódio 0,1M e NaCl 0,5M, pH 4,5 (segundo orientações do fabricante) e, em seguida, empacotada em mini colunas (1,2x5 cm) com aproximadamente 2 mL de gel cada.

. Veneno de *Lachesis muta muta*.

As frações ativas eluídas da coluna de Sephacryl S.200 foram misturadas e dializadas contra tampão Tris HCl 0,05 M e NaCl 0,4 M, pH 9,0 durante 18 horas, com 2 trocas e aplicadas na coluna de afinidade com fluxo de 12 mL/h. Nesta etapa foram coletadas frações de 3 mL. A coluna foi lavada com 30 mL de tampão sendo, em seguida, trocado para acetato de sódio 0,1 M, pH 5,0 e frações de 1 mL passaram a ser coletadas. A eluição foi acompanhada pela absorvância em 280 nm, mudança do pH (testado com papel indicador) e ensaios de atividades.

. Veneno de *Crotalus durissus terrificus*

As frações ativas eluídas da coluna de Sephadex G.100 foram misturadas e tratadas com o mesmo procedimento adotado para o veneno laquétrico.

3.2. Localização das frações ativas

As frações ativas foram identificadas pelos ensaios de atividade amidásica com DL-BAPNA e teste *in vivo*.

3.2.1. Atividade amidásica

A localização das frações ativas foi feita segundo o método de MAGALHÃES (1992) baseado em ERLANGER et al. (1961). As frações foram incubadas com o substrato sintético DL-BAPNA (Benzil -DL- arginina p-nitroanilida; SIGMA).

A solução estoque do substrato ($9,0 \times 10^{-2}$ M) foi preparada pela dissolução de 196 mg do composto em 5 mL de dimetilsulfóxido e armazenado a -20°C . A solução de uso foi preparada pela diluição 1:100 da solução estoque em tampão Tris HCl 0,1M, pH 8,0.

A mistura de reação foi composta por

⇒ 3 μg das frações eluídas das colunas cromatográficas (dosadas conforme descrito em 3.3) em até 0,1 mL (os volumes menores foram completados com tampão Tris HCl 0,1M, pH 8,0)

⇒ 0,9 mL da solução de substrato já diluída 1:100 (concentração $8,1 \times 10^{-4}$ M).

A mistura foi incubada à temperatura ambiente (23°C) por 15 minutos e interrompida pela adição de 0,1 mL de ácido acético 60% (v/v). Em seguida, foi feita a leitura das absorvâncias em 410 nm.

3.2.2. Atividade *in vivo*

Os testes em camundongos permitiram acompanhar a manutenção da atividade da gioxina induzir o "rolamento em barril", conforme descrito por BARRABIN et al. (1978), em diferentes etapas de purificação.

Camundongos, Swiss, machos pesando entre 25-30 g, foram injetados via intravenosa, na cauda, com a toxina na concentração de 0,25 $\mu\text{g/g}$ de peso corpóreo do animal e observados durante 30 minutos. Neste intervalo de tempo deveria ocorrer o "rolamento em barril", caso contrário a amostra era considerada inativa.

3.3. Concentração protéica

O conteúdo protéico das amostras foi determinado pelo método de LOWRY modificado por MILLER (1959) e permitiu estimar os rendimentos nos métodos de obtenção das giroxinas e padronizar as concentrações protéicas em todos os ensaios e testes *in vivo*.

A curva padrão foi construída com soro albumina bovina (SAB; Sigma), em diluições seriadas com fator 1:2, no intervalo de dose de 3 a 200 µg. Todas as amostras e cada ponto da curva padrão foram analisadas em duplicata.

A 0,2 mL de amostra foi adicionado 1 mL do reagente de tartarato de cobre (Na_2CO_3 10% em NaOH 0,5N; CuSO_4 5%; tartarato de sódio e potássio 1%; na proporção 1:9:100, respectivamente); mantendo-se à temperatura ambiente por 10 minutos. Em seguida, 3 mL de reagente de Folin Ciocalteou 0,2N foram adicionados, incubando-se à 50°C por 10 minutos. Após resfriamento foram medidas as absorvâncias em 650nm.

Tratamento dos dados

Os dados da curva padrão foram ajustados por regressão linear e a equação $Y = aX + b$, utilizada para calcular a concentração protéica das amostras, sendo (Y) a densidade óptica, (X) a concentração protéica, (a) o coeficiente angular da reta e (b) o coeficiente linear da reta.

3.4. Eletroforese em gel de poliacrilamida

As eletroforeses em sistema descontínuo e desnaturante (método de LAEMMLI (1970) modificado) foram utilizadas para avaliar a composição protéica dos picos obtidos nos fracionamentos e estimar o peso molecular das giroxinas.

Para realizar as eletroforeses em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (EGPA-SDS) foram utilizados gel de empilhamento a 3% em tampão Tris-HCl 1M, pH 6,8 e gel de resolução 12,5 % para o veneno de surucucu e 15% para o veneno de cascavel, em tampão Tris-HCl 1,5 M, pH 8,8.

As amostras e padrões de peso molecular (Tabela 2) foram desnaturados em tampão de amostra (Tris-HCl 0,08 M, SDS 2%, glicerol 10%, azul de bromofenol 0,001%, 50% v/v) à 100°C por 3-5 minutos. O azul de bromofenol foi o traçador que permitiu acompanhar a evolução da eletroforese.

Algumas amostras de giroxina crotálica também foram reduzidas pela adição ao tampão de amostra β -mercaptoetanol 10 % e uréia 8 M

Tabela 2. Padrões protéicos utilizados para a curva de calibração de peso molecular em EGPA-SDS.

PROTEÍNAS	PESO MOLECULAR (Daltons)
Soro albumina bovina	66.000
Ovoalbumina	45.000
Anidrase carbônica	29.000
Tripsinogênio	24.000
Lisozima	14.300

Foram aplicados 10 a 40 μ g de proteína em cada poço. Como tampão de corrida foi utilizado Tris 0,025 M, glicina 0,192 M, pH 8,3 e SDS 1%.

A eletroforese processou-se à 15 mA nos primeiros 30 minutos e 20 mA até o final, com voltagem variando de 65 a 220 V. A temperatura durante a corrida foi mantida constante em 10°C.

Coloração

Os géis foram fixados em ácido tricloroacético 12,5% durante 30 minutos e corados "overnight" com Coomassie Brilliant Blue R-250 (CBB R-250) 0,4% em metanol 50% e ácido acético 7 %. Foram descorados com uma solução de ácido acético 10% e etanol 30%, à temperatura ambiente.

3.5. Cromatografias em HPLC

Este método foi utilizado para estimar a pureza e a integridade das amostras de giroxina laquética e crotálica.

As análises cromatográficas foram realizadas utilizando pré-coluna Guardcolumn SW 7,5 mm ID x 7,5 cm TSK-gel (Toso Haas). e coluna de 7,5 mmID x 60 cm, TSK G2000SW, com partículas de 10 µm (do mesmo fabricante); acopladas à um sistema cromatográfico composto de bomba peristáltica e processador marca WATERS e detector ultravioleta marca ISCO.

Todas as soluções utilizadas nas cromatografias foram filtradas em membranas tipo GV (Millipore), poro 0,22 µm e deaeradas com ultra-som em vácuo. O eluente utilizado foi o tampão bicarbonato de amônio 0,025 M, pH 7,2.

As amostras dissolvidas em água ou no próprio eluente foram aplicadas em um volume de 20 µL, na quantia de 6,5 a 65 µg e as cromatografias processaram-se em fluxo de 1 mL/minuto, à temperatura ambiente.

A absorvância das frações em 280 nm e o registro do perfil cromatográfico foram feitos automaticamente pelo detector e registrador acoplados na saída da coluna.

3.6. Método *in vitro* de liberação de [³H]neurotransmissores

A ação de substâncias sobre o sistema nervoso central pode ser avaliada pela interferência no padrão normal de liberação dos neurotransmissores. Para esta medida foi utilizado o método *in vitro* de liberação de neurotransmissores tritiados (TRONCONE, comunicação pessoal; baseado em MARIEN et al., 1983).

Preparação do tecido

Ratos Wistar, adultos, machos pesando entre 200-250 gramas foram sacrificados por decapitação. O estriato foi dissecado e colocado em tampão bicarbonato-Krebs-Ringer (KRB) com a seguinte composição, em mM: NaCl 118, NaHCO₃ 25, KCl 4,8, CaCl₂ 1,2 e Glicose 10; pH 7,3. Como tem sido verificado que a glicina interfere com a eficácia da resposta do receptor de glutamato, 10 mM deste

aminoácido foi adicionado ao tampão. Da mesma forma, quando altas concentrações de potássio (K^+) foram utilizadas como estímulo, adicionou-se 1,2 mM de $MgSO_4$ ao tampão. Durante o experimento foi mantido gaseamento constante com carbogênio (5% CO_2 /95% O_2).

O estriato passou duas vezes pelo cortador de tecidos marca McIlwain; calibrado para cortes na espessura de 250 μm , em sentido transversal formando prismas. O tecido foi disperso com uma pipeta Pasteur e lavado duas vezes em 20 mL de KRB gelado; sendo finalmente transferido para um béquer contendo 3 mL de KRB e o neurotransmissor a ser ensaiado:

a) 15 μL de [3H]dopamina (New England Nuclear / atividade específica 136,5 Bq/mMol) incubada na presença de 10 μM de pargilina para prevenir a sua degradação, ou

b) 15 μL de [3H]colina (New England Nuclear / atividade específica 322,7 Bq/mMol) a partir da qual o tecido sintetizará o neurotransmissor [3H]acetilcolina.

A incubação foi feita por 20 minutos a 37°C para que ocorresse a incorporação do [3H]neurotransmissor. O tecido foi, então, filtrado e lavado duas vezes com KRB gelado e distribuído em 10 câmaras de perfusão com volume interno de 0,25 mL. A perfusão se processou com um fluxo de 0,35 mL/min, controlado por uma bomba peristáltica de vários canais.

. Ensaio de liberação

Os 60 minutos iniciais de perfusão foram necessários para atingir uma linha basal de liberação, estável. Decorrido este tempo, foram coletadas três amostras sucessivas para quantificação deste basal, com 3 minutos de coleta para cada amostra. A perfusão com agentes de estímulo ocorreu a partir de 10 minutos (4ª coleta) e durou 2 minutos; tendo sido avaliadas as liberações induzidas por dois processos:

a) com 20 mM de K^+ em KRB para induzir despolarização das células nervosas (isomolaridade acertada com a redução de NaCl), ou

b) com 100 μM de glutamato monossódico ativando os receptores de aminoácidos excitatórios.

Um segundo estímulo idêntico foi induzido na 11ª coleta e mais seis amostras foram coletadas após esta liberação. No 19º intervalo, o tecido foi perfundido com uma

solução de ácido clorídrico 0,1 N por dois períodos de 3 minutos para induzir a liberação total dos neurotransmissores ainda presentes no tecido.

A reprodutibilidade dos ensaios foi acompanhada pelo branco controle, ou seja, dois canais perfundidos apenas com tampão.

Todas as amostras foram ensaiadas, no mínimo, em duplicata.

Tratamento dos dados

Os resultados são expressos como liberação fracional, isto é, a porcentagem de [³H]neurotransmissores liberados em cada intervalo sobre o total contido no tecido no momento da coleta.

O efeito de fármacos e de toxinas foram avaliados pela razão S_2/S_1 ; sendo S_2 a liberação estimulada na presença do fármaco ou da toxina e S_1 a liberação estimulada controle. A liberação basal na presença do fármaco ou toxina (B_2) e a liberação basal controle (B_1) foram utilizadas para a avaliação dos efeitos na liberação basal usando a razão B_2/B_1 .

S_n é calculado subtraindo B_n da liberação total obtida sob estímulo. B_1 corresponde a média de três amostras que precedem o estímulo S_1 e B_2 a última liberação fracional antes de S_2 . A figura 2 apresenta um perfil de liberação típico neste sistema e nela foram esquematizados os parâmetros de cálculos.

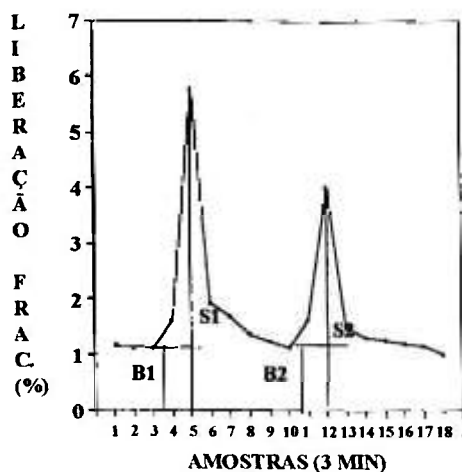


Figura 2. Perfil típico da perfusão de [³H]neurotransmissores com indicação dos parâmetros de cálculo B_1 , B_2 , S_1 e S_2

. Ação de fármacos na liberação

Algumas substâncias úteis na padronização (drogas bem caracterizadas quimicamente, com atividade farmacológica e mecanismo de ação conhecidos e disponíveis comercialmente) foram introduzidas no meio de perfusão: hemicolinium-3 (100 μM); bupropiona (10 μM) e fisostigmina (20 μM) foram adicionados no 8º intervalo e seguiram o protocolo padrão de estímulo; kainato, quisqualato e N-metil-D-Aspartato (NMDA) (200 μM) foram utilizados como estímulo de liberação e adicionados ao meio de perfusão na 5ª coleta.

A dependência de cálcio para a liberação estimulada por potássio foi verificada omitindo-se este íon no tampão KRB e adicionando 10 μM de EGTA ao líquido de perfusão.

. Ação de neurotoxinas na liberação

Algumas neurotoxinas com diferentes pesos moleculares e mecanismos de ação já descritos, foram adicionadas ao meio de perfusão a partir da 8ª coleta: tetrodotoxina (0,5 μM), ácido kaínico (200 μM), crotoxina (1,3 μM) e crotamina (5 μM).

. Teste das giroxinas laquética e crotálica na liberação

A giroxina de *Lachesis muta muta* foi ensaiada para [^3H]acetilcolina e [^3H]dopamina com K^+ 20 mM como estímulo. Como os fármacos e demais neurotoxinas, foi adicionada ao meio de perfusão na 8ª coleta, em concentrações entre 0,02 e 5 μM .

A giroxina do veneno de *Crotalus durissus terrificus* foi ensaiada nas mesmas condições descritas para a laquética, em concentrações entre 0,02 e 1 μM .

3.7. Radioiodação das giroxinas

As toxinas radioiodadas foram utilizadas para os ensaios cinéticos (aspectos da distribuição, decaimento sangüíneo e eliminação no transcorrer do tempo), via de eliminação e teste de passagem da barreira hematoencefálica.

As marcações com Na^{125}I (New England Nuclear, Boston) foram realizadas pelo método clássico da cloramina T modificado por RIBELA et al. (1993). O esquema da reação de marcação é mostrado na figura 3 na qual estão indicados os reagentes e os tampões usados. Foram feitas agitações após a adição de cada reagente e aos 2,5 minutos após a adição da cloramina T.

Todas as soluções usadas foram preparadas imediatamente antes do uso.

A mistura de reação foi fracionada em coluna de Sephadex G.100, medindo 2,3x50 cm de gel, cujo intervalo de fracionamento é 4 a 150 kD. O tampão fosfato de sódio 0,05 M, pH 7,4 contendo SAB 0,1 % foi utilizado como eluente, com fluxo de 12 mL/h e foram coletadas frações de 2 mL. Amostras de 10 μL de cada tubo foram contadas em contador gama de poço (marca OAKFIELD Instruments, United Kingdom) para obtenção do perfil cromatográfico.

Controle da marcação.

Para cálculo da recuperação, rendimento e atividade específica foram retiradas 3 alíquotas de 3 μL da mistura de marcação e diluídos em 1 mL de tampão fosfato de sódio 0,05 M, pH 7,4 e SAB 0,1 %. Foram contados 10 μL em duplicata destas diluições assim como as ponteiros das pipetagens e o próprio tubo de reação.

Os picos obtidos no fracionamento da mistura de marcação foram analisados em eletroforese (método descrito em 3.4). Terminada a corrida, o gel foi cortado em tiras verticais correspondente à cada amostra e, em seguida, em segmentos horizontais de 5 mm.

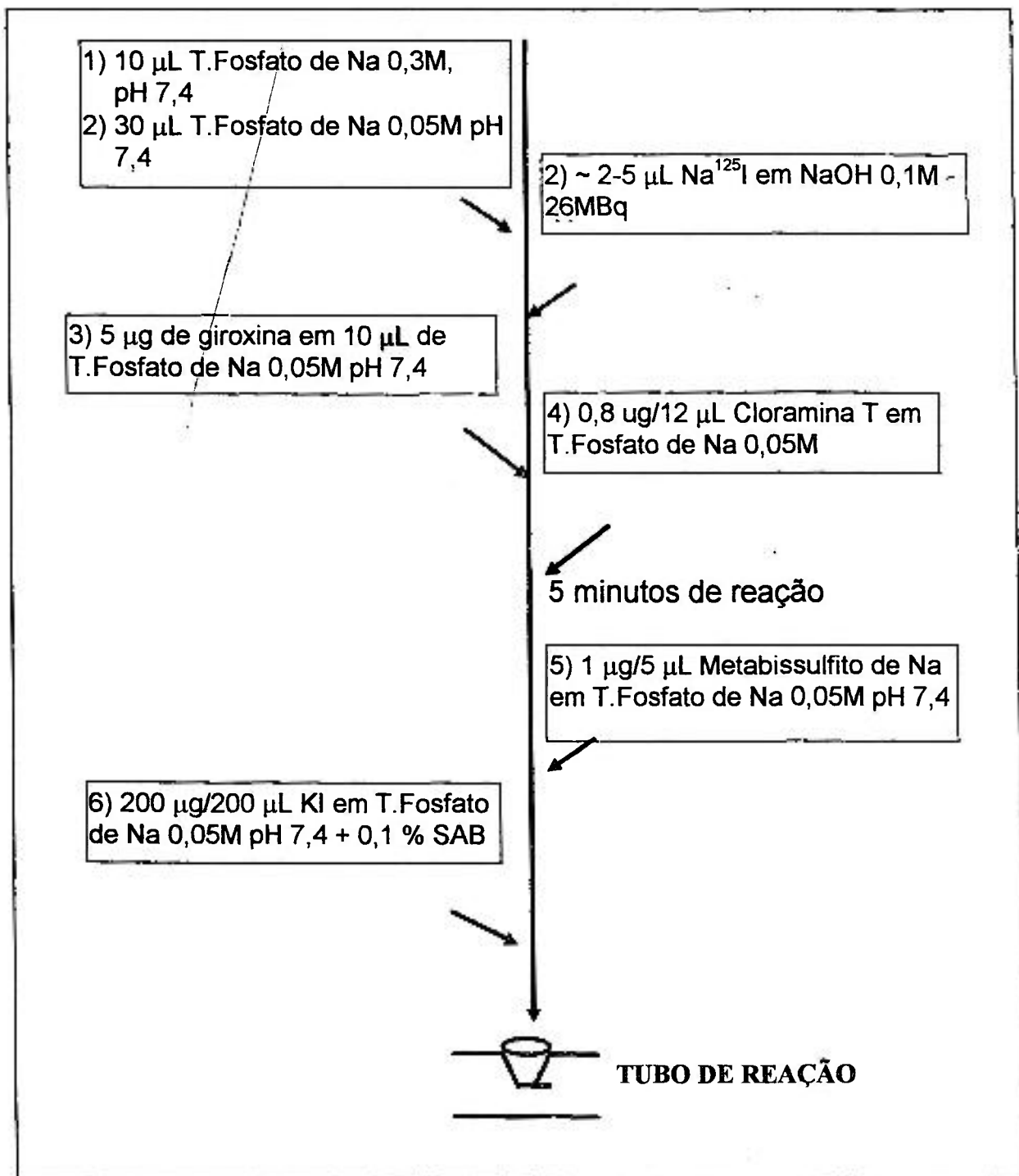


Figura 3 - Esquema da radioiodação das giroxinas com Na¹²⁵I utilizando o método de Cloramina T modificado.

3.8. Estudo cinético da [¹²⁵I]giroxina

O ensaio cinético da toxina radioiodada foi realizado para determinar a velocidade das alterações da concentração sangüínea da toxina no organismo. Os dados obtidos foram analisados segundo o modelo compartimental aberto. Este considera o organismo como uma entidade homogênea onde a concentração da toxina está em equilíbrio com o sangue e com todos os tecidos, o que significa que as variações na corrente sangüínea refletem as alterações na distribuição total.

O conhecimento da principal via de eliminação da toxina complementam este estudo.

3.8.1. Medidas no sangue

Grupos de 5 camundongos, albinos, machos, pesando entre 28-32 gramas, receberam pelos bebedouros durante as 24 horas que precederam o ensaio, água filtrada contendo iodeto de potássio 0,004% (~ 0,002 mg/g de peso corpóreo). Os animais receberam pela via intravenosa, na cauda, um volume de 0,25 mL contendo $3,2 \times 10^6$ cpm da toxina marcada.

Amostras de sangue foram coletadas pela veia retro-orbital, em diferentes intervalos de tempo (0,02; 0,05; 0,12; 0,25; 0,50; 1; 3; 5 e 18,5 horas) utilizando capilares de 50 µL heparinizados (3 coletas de sangue por animal).

Após 19 horas todos os grupos foram sacrificados com éter e somente as caudas foram isoladas para contagem.

Tratamento dos dados.

Das contagens das amostras de sangue e caudas foi subtraído o valor da radiação de fundo (BG).

As contagens das amostras de sangue foram expressas como cpm/mL e analisadas segundo MURPHY,1992 para se determinar o melhor ajuste matemático para os dados.

3.8.2. Medidas nas fezes e urina

Camundongos albinos, machos, pesando entre 28-32 g receberam água filtrada contendo iodeto de potássio 0,004% durante as 24 horas anteriores ao ensaio. Em seguida, foram injetadas as doses de $2,5 \times 10^5$ cpm em 250 μ L de [125 I]giroxina, via intraperitoneal e colocados em gaiolas metabólicas individuais.

As fezes e urinas foram coletadas durante 7 horas.

Tratamento dos dados.

As amostras de urina coletadas, neste período, para cada camundongo foram reunidas e contadas. Idem para fezes. Em seguida, a radiação de fundo (ou BG) foi subtraída em cada medida. A soma de urinas e fezes compôs o total sendo, em seguida, calculado a porcentagem de cada uma delas, ou seja, a porcentagem das contagens presentes nas urinas e nas fezes, para cada animal. Os resultados foram expressos como a média de cada grupo com os respectivos desvios padrões.

3.9. Teste de passagem da barreira hematoencefálica

Este teste foi realizado para verificar se a giroxina atravessa a barreira hematoencefálica induzindo o rolamento em barril por ação direta no sistema nervoso central.

Grupos de 5 camundongos albinos, machos, pesando entre 23-26 gramas foram injetados via endovenosa, na cauda, com $3,9 \times 10^6$ cpm de [125 I]giroxina, em um volume de 0,1 mL.

Os grupos foram sacrificados após 1, 3 ou 10 minutos e retirados a cauda, a tireóide e o cérebro para determinação da radioatividade incorporada.

Tratamento dos dados.

Para cada amostra foi subtraída a radiação de fundo (BG). Das contagens totais injetadas foram subtraídas as que ficaram retidas na cauda sendo, em seguida, calculada a porcentagem que foi incorporada pelos cérebros e tireóides de cada

animal. Os resultados foram expressos para as tireóides como a média (e desvio padrão) das porcentagens em relação ao total injetado, e para os cérebros, porcentagens por gramas de tecido.

4.1. Obtenção das toxinas

4.1.1. Cromatografias em gel filtração

. Veneno de *Lachesis muta muta*

O perfil cromatográfico do veneno de *Lachesis muta muta* (figura 4) foi semelhante aos obtidos por outros autores (SANCHEZ et al.,1991; DINIZ & OLIVEIRA,1992 e FULY et al.,1993) evidenciando a presença de picos numerados de 1 a 7.

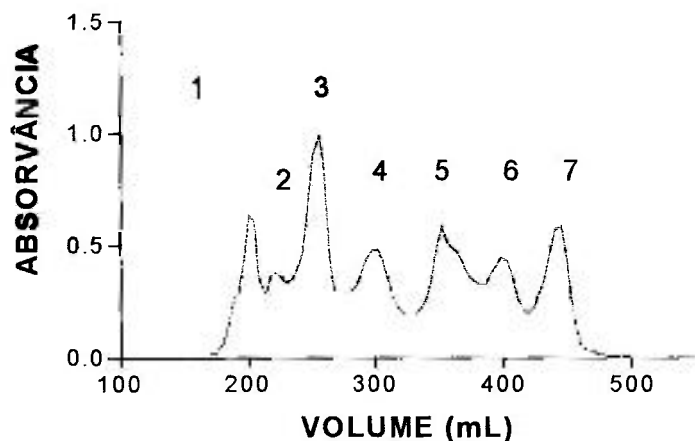


Figura 4. Cromatograma do veneno de *Lachesis muta muta* em Sephacryl S.200, coluna 2,6 x 90 cm. Eluente, tampão bicarbonato de amônio 0,1 M pH 7,2. Fluxo 15 mL/h. Frações 2,1 mL. A detecção foi feita em 280 nm e pelo ensaio de atividade amidásica com DL-BAPNA (a barra horizontal indica as frações ativas).

Este é um veneno complexo e apenas alguns de seus constituintes foram identificados. No pico 1 foi descrito L-aminoácido oxidase, PM 138 kD (SANCHEZ & MAGALHÃES, 1991) e fator hemorrágico I, PM 100 kD (SANCHEZ et al.,1986), no pico 3, uma enzima ácida liberadora de cininas, PM 27,9 kD (DINIZ & OLIVEIRA, 1992), no pico 4, o fator hemorrágico II, PM 22,3 kD (SANCHEZ et al.,1991a; 1991b) e a enzima fosfolipase A2, PM 15 kD (FULY et al.,1993). A fração contendo gioxina foi

identificada, no pico 2 pela atividade enzimática (amidásica em DL-BAPNA) e pela capacidade de induzir o rolamento em barril confirmada por teste *in vivo*.

. Veneno de *Crotalus durissus terrificus*

O perfil cromatográfico do veneno de *Crotalus durissus terrificus* (figura 5) evidencia a separação de suas principais toxinas sendo C₁ correspondente à convulxina; C₂ à giroxina; C₃ à crotoxina e C₄ à crotamina e C₅ peptídeos. A confirmação destas atividades foram feitas por teste de agregação plaquetária para convulxina, baseado em BORN (1962); atividade fosfolipásica para crotoxina com o método de ARAÚJO & RADVANYL (1987) e teste *in vivo* de extensão das patas traseiras para crotamina (MOURA GONÇALVES & VIEIRA, 1950). A fração giroxina foi confirmada pelos mesmos ensaios feitos para o veneno laquétrico, ou seja, atividade amidásica e teste *in vivo*.

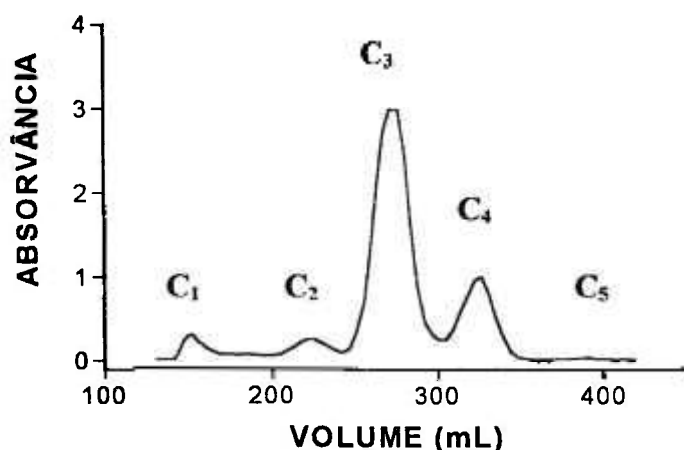


Figura 5. Cromatograma do veneno de *Crotalus durissus terrificus* em Sephadex G.100, coluna 2,6 x 90 cm, aonde foram identificadas convulxina (C₁); giroxina (C₂); crotoxina (C₃); crotamina (C₄) e peptídeos (C₅). Eluente tampão formiato de amônio 0,1 M pH 3,0. Fluxo 15 mL/h. Frações 2,1 mL. A detecção foi feita em 280nm e pelo ensaio de atividade amidásica com DL-BAPNA (a barra horizontal indica as frações ativas).

Os coeficientes de partição (K_{av}) foram calculados segundo a equação:

$$K_{av} = (V_e - V_0) / (V_t - V_0)$$

aonde V_e é o volume efluente da proteína; V_0 o volume de exclusão e V_t o volume total da coluna. O K_{av} obtido para a giroxina laquétrica foi 0,300 sendo V_0 125 mL, V_t 447 mL

e V_0 221,6 mL. O K_{av} obtido para a crotálica foi 0,304 sendo V_0 130 mL, V_t 433 mL e V_e 222,4 mL.

Utilizando estes valores e a relação linear entre os pesos moleculares (em log) e os valores de K_{av} descrito por BARTOLINI & RIBELA (1986) para algumas proteínas padrões, foram calculados, para a gioxina de surucucu 48 kD e para a de cascavel 47 kD. Estes valores são compatíveis com os descritos por outros autores (SEKI et al., 1980; SILVEIRA et al., 1989).

4.1.2. Cromatografias em colunas de afinidade

. Veneno de *Lachesis muta muta*

O perfil cromatográfico, do veneno de *Lachesis muta muta* obtido em Benzamidina Sepharose 6B, evidencia a eluição de duas regiões de interesse, identificadas por atividade amidásica em DL-BAPNA, após a mudança de pH do eluente de 9,0 (até o tubo 25) para pH 5,0 (a partir do tubo 27) (figura 6).

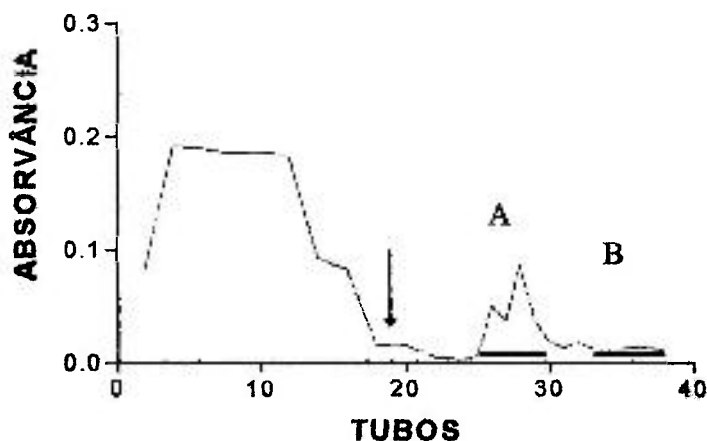


Figura 6. Cromatograma de afinidade em Benzamidina-Sepharose 6B para o veneno de *Lachesis muta muta*. A aplicação da amostra na coluna foi em tampão Tris-HCl 0,05 M e NaCl 0,4M, pH 9,0 e a eluição em tampão acetato de sódio 0,1 M, pH 5,0 (a seta indica a troca de tampão). Fluxo 12 mL/h. Frações 1 mL. A detecção foi feita em 280 nm e pelo ensaio de atividade enzimática com DL-BAPNA (a barra horizontal indica as frações ativas). Os tubos de 0 a 20 correspondem ao não retido (NR).

. Veneno de *Crotalus durissus terrificus*

No perfil cromatográfico em coluna de afinidade para o veneno de cascavel houve a eluição de apenas uma região com atividade amidásica após a acidificação do pH, a partir do tubo 47 (figura 7).

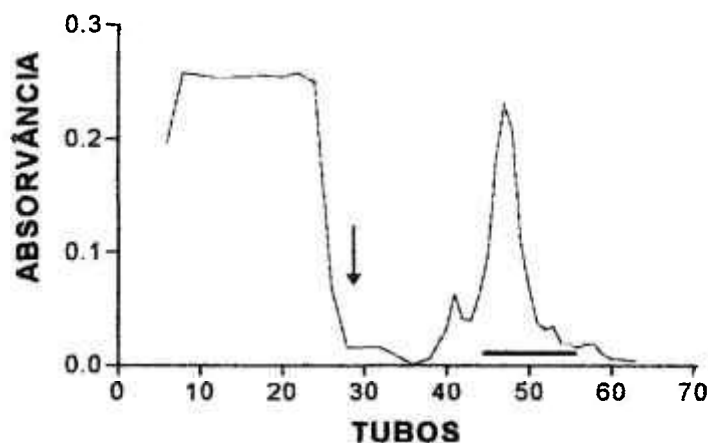


Figura 7. Cromatograma de afinidade em Benzamidina-Sepharose 6B para o veneno de *Crotalus durissus terrificus*. A aplicação da amostra na coluna foi em tampão Tris-HCl 0,05M e NaCl 0,4M, pH 9,0 e a eluição em tampão acetato de sódio 0,1M, pH 5,0 (a seta indica a troca de tampão). Fluxo 12 mL/h. Frações 1 mL. A detecção foi feita em 280 nm e pelo ensaio de atividade enzimática com DL-BAPNA (a barra horizontal indica as frações ativas, ou seja a posição de eluição da giroxina). Os tubos de 0 a 30 corresponde ao não retido (NR).

4.2. Localização das frações ativas

As frações com atividade amidásica foram identificadas em cada etapa de purificação e marcadas nos cromatogramas com um traço horizontal.

Concluídas as purificações, as frações ativas de cada veneno, foram misturadas, dialisadas contra água e secas em "speed vac" para serem estocadas a 4°C até o momento do uso.

A atividade de induzir o giro foi confirmada para ambas as toxinas (laquéica e crotálica) pelo teste *in vivo*.

4.3. Concentração protéica.

Após a dissolução dos venenos nos respectivos tampões e centrifugação, foi dosado um conteúdo protéico de 85 a 87 % do peso inicial nos sobrenadantes que foram aplicados nas colunas. A soma total dos picos após a passagem pelas colunas forneceu a recuperação de 96% do total de proteínas aplicado para a gel filtração e 89% para a afinidade. As frações contendo atividade de gioxina representaram 9 a 10% do total aplicado em gel filtração (semelhante para os dois venenos) e 15% para *Lachesis* e 22% para *Crotalus* nas separações por afinidade.

Considerando a atividade enzimática, a perda na fração não retida pela coluna de afinidade foi de aproximadamente 10% para cada veneno. O rendimento final obtido ficou entre 3 e 4%.

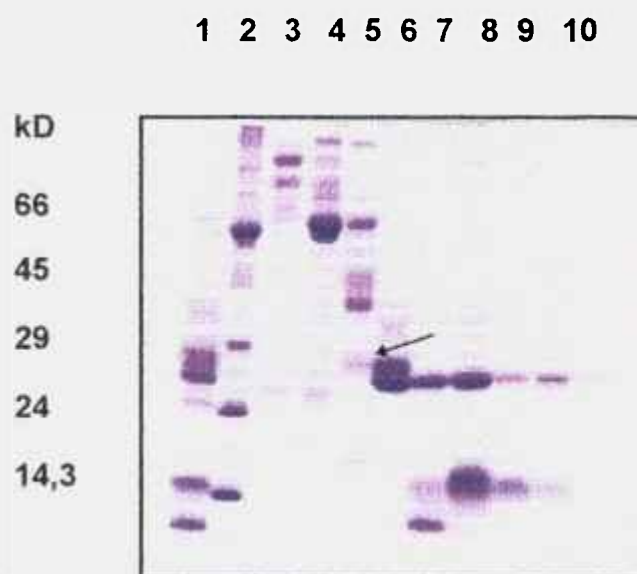
4.4. Eletroforese em gel de poliacrilamida

Os perfis eletroforéticos das amostras confirmaram o range de peso molecular (PM) descrito para as gioxinas. Utilizando a regressão linear entre o \log_{10} dos pesos moleculares e a migração relativa (R_m) das proteínas padrões foram obtidos os PM de 41-47 kD (figura 8), 28 kD (figura 9); 30-33 kD (figura 10) e 36 kD (figura 11), respectivamente, para as gioxinas laquéica e crotálica após cada fracionamento; sendo

$$R_m = \frac{\text{migração de cada banda protéica (em cm)}}{\text{migração do traçador (em cm)}}$$

$$\log_{10} PM = A + B.R_m, \text{ onde}$$

⇒ - B representa a inclinação da reta. É um parâmetro em função diretamente proporcional ao tamanho molecular da proteína (ou peso molecular).



1. Veneno total

2. Marcadores de peso molecular

3 - pico 1 (inicio)

4 - pico 1 (final)

5 - pico 2

6 - pico 3

7 - pico 4

8 - pico 5

9 - pico 6

10 - pico 7

Figura 8. Eletroforese em gel de poliacrilamida 12,5 %, em sistema descontínuo de tampões, com SDS do veneno de *Lachesis muta muta*. Análise dos principais picos numerados no fracionamento em gel filtração (figura 4). A giroxina está na amostra 5 (a posição provável esta indicada pela seta) e o peso molecular calculado foi 41-47 kD. Corado com Coomassie Brilliant Blue R.250.



1 e 8. Marcadores de peso molecular

3. N.R. (fração não retida)

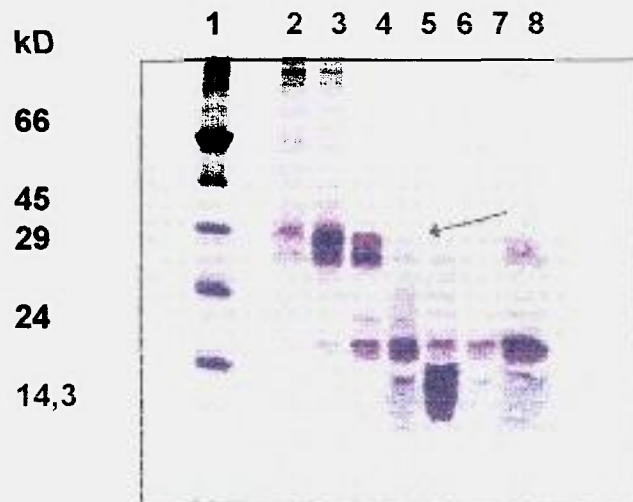
5. Pico B (10 μ g)

2 e 7. Veneno total

4. Pico A

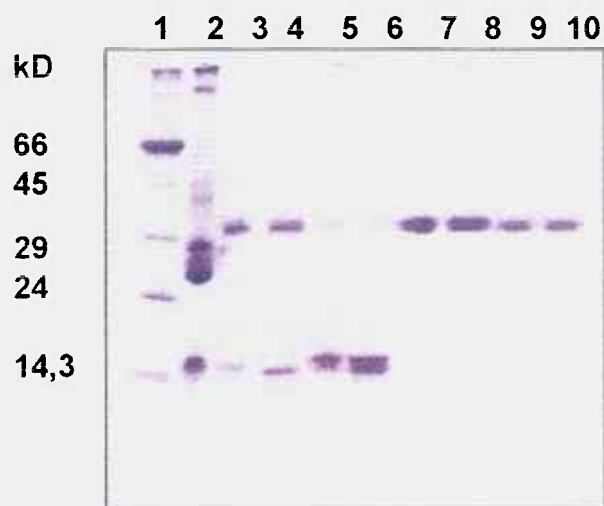
6. Pico B (5 μ g)

Figura 9. Eletroforese em gel de poliacrilamida 12,5 %, em sistema descontínuo de tampões, com SDS do veneno de *Lachesis muta muta*. Análise dos picos numerados na coluna de afinidade (figura 6). A giroxina está nas amostras 4 a 6. O peso molecular calculado foi 28 kD. Corado com Coomassie Brilliant Blue R.250.



- 1. Marcadores de Peso molecular
- 2. C₁ 3 - C₂ (inicio) 4 - C₂ (final)
- 5 - C₃ 6 - C₄ 7 - C₅
- 8 - Veneno total

Figura 10. Eletroforese em gel de poliacrilamida 15 %, sistema descontínuo de tampões, com SDS do veneno de *Crotalus durissus terrificus*. Análise dos principais picos enumerados no fracionamento em gel filtração (figura 5). A giroxina está nas amostras 3 e 4 (a posição provável está indicada pela seta). Peso molecular calculado foi 30-33 kD. Corado com Coomassie Brilliant Blue R-250.



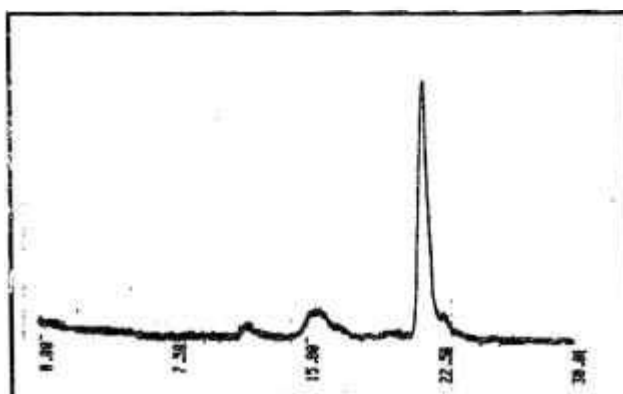
- 1.- Marcadores de peso molecular
- 2.- Veneno total de *Lachesis*
- 3 e 4 - C2 (gel filtração, figura 5)
- 5 e 6 - NR (coluna de afinidade, figura 7)
- 7 a 10. girosina (figura 7)

As amostras 4, 6, 8 e 10 foram pré-tratadas com uréia 8 M e β -mercaptoetanol 10%.

Figura 11. Eletroforese em gel de poliacrilamida 15 %, em sistema descontínuo de tampões, com SDS. Análise dos picos obtidos no fracionamento em gel filtração (figura 5) e em coluna de afinidade (figura 7). O peso molecular calculado foi 36 kD. Corados com Coomassie Brilliant Blue R.250.

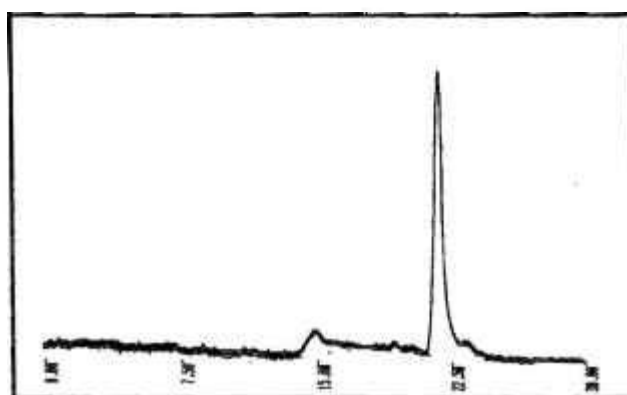
4.5. Cromatografias em HPLC

As figuras 12 e 13 apresentam as análises das gioxinas laquética e crotálica em HPLC, apresentando praticamente os mesmos tempos de retenção (TR) 21,7 e 21,8 minutos.



TR 21,7
Área 70 %

Figura 12. Cromatograma da gioxina de *Lachesis muta muta* em HPLC. Coluna TSK G2000SW; eluente Tampão bicarbonato de amônio 0,025 M, pH 7,2, fluxo 1 mL/min, detecção em 280 nm.



TR 21,8
Área 80 %

Figura 13. Cromatograma da gioxina de *Crotalus durissus terrificus* em HPLC. Coluna TSK G2000SW; eluente Tampão bicarbonato de amônio 0,025 M, pH 7,2, fluxo 1 mL/min, detecção em 280 nm.

4.6. Método de liberação de [³H]neurotransmissores

Os ensaios de liberação revelaram que dopamina e acetilcolina tritiadas são captadas ativamente pelas células neurais do tecido estriatal picotado, sendo incorporadas ao “pool” normal de neurotransmissores.

Os picos de liberações foram obtidos com glutamato 100 μ M e por despolarização com 20 mM de K⁺. Neste caso houve uma liberação maior de [³H]acetilcolina do que de [³H]dopamina, no entanto, o mesmo efeito não ocorreu na liberação por glutamato, sendo semelhantes para ambas (figura 14).

A adição de K⁺ 20 mM ao meio de perfusão atuou nas células neurais abrindo os canais de cálcio voltagem-dependente, já o glutamato agiu ativando os receptores de aminoácidos excitatórios.

A ausência de cálcio extracelular bloqueou as liberações estimuladas de dopamina e de acetilcolina, e diminuiu a liberação basal de dopamina, conforme pode ser observado na figura 15 e tabela 3.

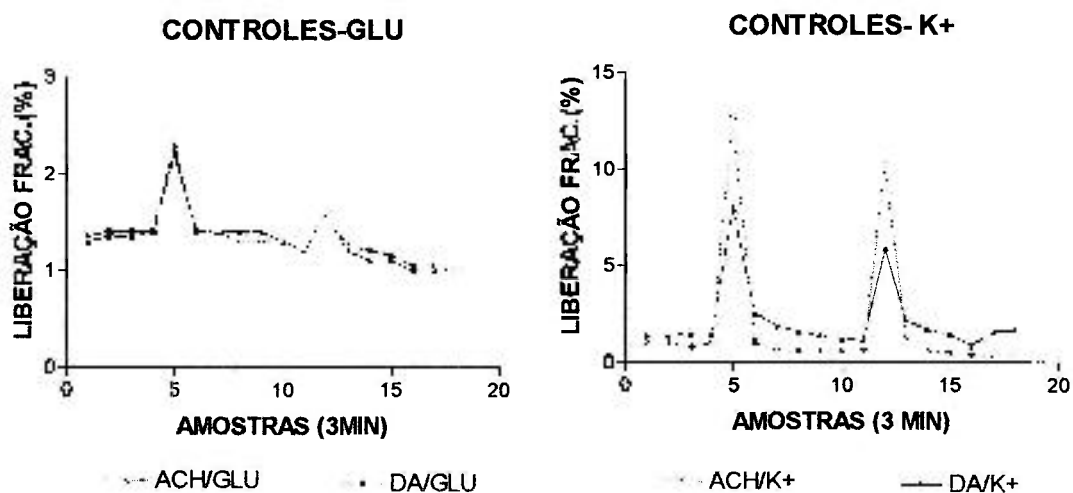


Figura 14. Perfis típicos de liberação para [³H]dopamina (DA) e [³H]acetilcolina (ACH) induzidos por K⁺ 20 mM e glutamato (GLU) 100 μ M em meio livre de magnésio.

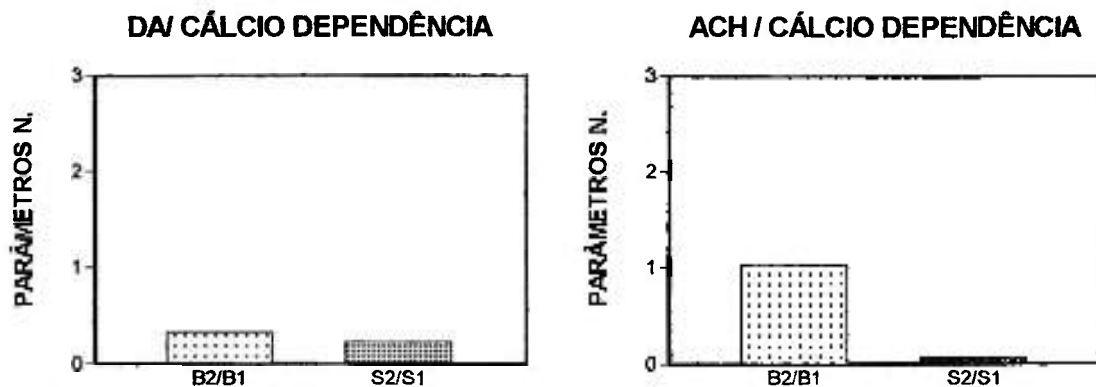


Figura 15. Dependência de cálcio para a liberação de [³H]neurotransmissores. O efeito da ausência de cálcio para as liberações, basais (B₂/B₁) e estimuladas (S₂/S₁) por K⁺ 20 mM, de [³H]dopamina (DA) e [³H]acetilcolina (ACH).

Ação de fármacos na liberação

A ativação do mecanismo de liberação para [³H]dopamina ou [³H]acetilcolina também foi obtida com 200 μM de N-metil-D-aspartato (NMDA), ácido kaínico e quisquálico (figura 16 e tabela 3).

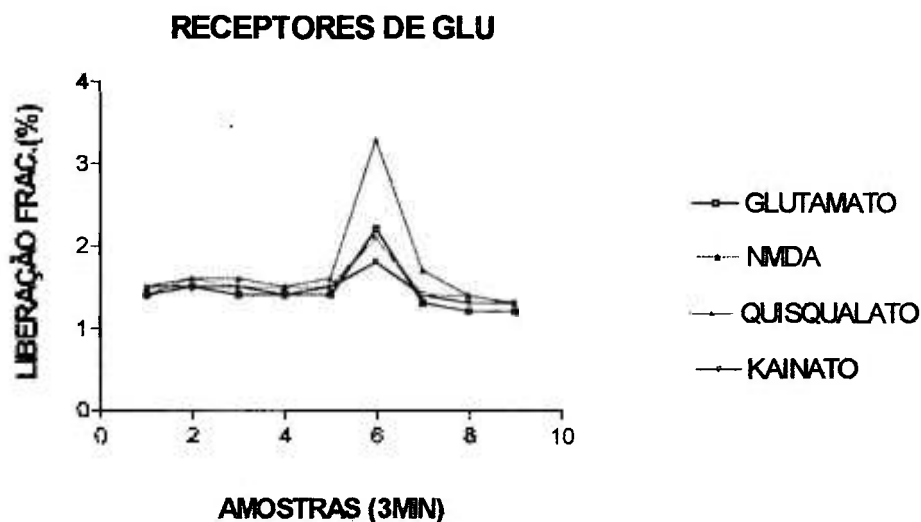


Figura 16. Liberação de [³H]acetilcolina induzida por 200 μM de glutamato (GLU), NMDA, ácido kaínico e quisquálico.

A presença de bloqueadores da recaptura dos [³H]neurotransmissores no líquido de perfusão, promoveram aumento dos basais.

A adição de bupropiona (bloqueador da recaptura de dopamina) induziu um aumento do basal sem alteração importante da liberação estimulada por glutamato 100 μ M e, a de hemicolinium-3, que é um bloqueador da recaptura de colina; também induziu um forte aumento na liberação basal sem alterar a resposta para a liberação estimulada por K⁺ 20 mM (figura 17 e tabela 3).

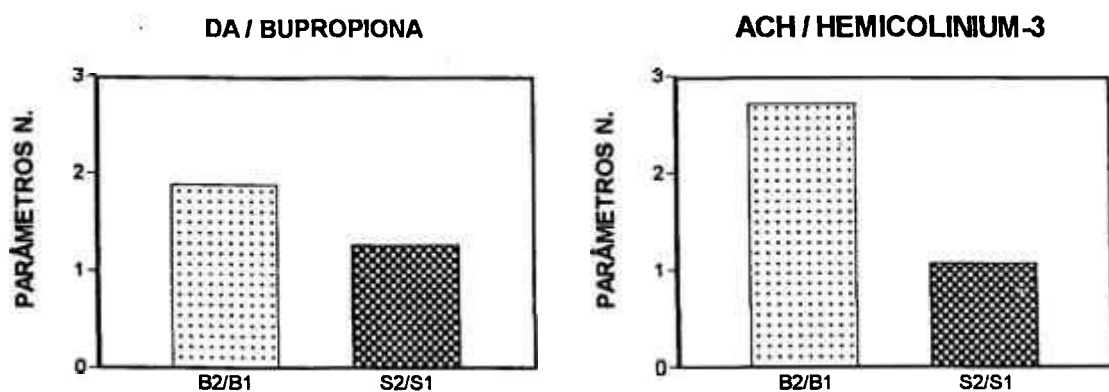


Figura 17. Inibição da recaptura de [³H]neurotransmissores. À esquerda, o efeito da adição de bupropiona 10 μ M na liberação de [³H]dopamina induzida por glutamato 100 μ M. À direita, do Hemicolinium-3 (100 μ M) na liberação de [³H]acetilcolina induzida por K⁺ 20 mM.

O bloqueio da degradação da [³H]acetilcolina pela acetilcolinesterase, impedindo a formação de [³H]colina para a recaptura, promovido pela fisostigmina, causou um aumento do basal gerado pela presença de [³H]acetilcolina e uma menor liberação frente ao estímulo (figura 18 e tabela 3).

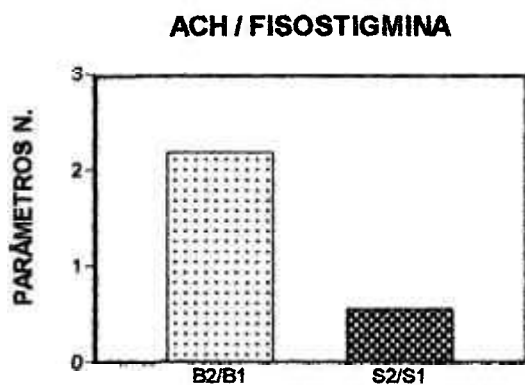


Figura 18. Efeito da inibição da acetilcolinesterase por fisostigmina 20 μ M na liberação de [3 H]acetilcolina induzida por K^+ 20 mM.

. Ação de neurotoxinas na liberação

As alterações dos perfis de liberação e dos parâmetros B_2/B_1 e S_2/S_1 permitiram verificar a sensibilidade do método à ação de neurotoxinas conhecidas.

A atividade da tetrodotoxina (TTX), bloqueando os canais de sódio voltagem dependente, impedindo o influxo de sódio e, conseqüentemente, a transmissão da excitabilidade da membrana (MEBS & HUCHO, 1990), foi evidenciada no método de liberação pelos bloqueios das liberações basal e estimulada (figura 19).

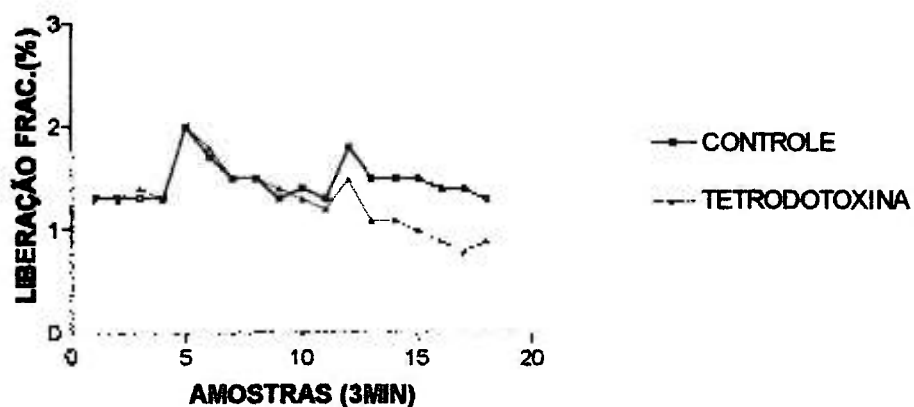


Figura 19. Ação da tetrodotoxina (TTX) 0,5 μ M na liberação de [3 H]dopamina. Estímulo com glutamato 100 μ M.

O ácido kaínico potencializa a ação excitatória do glutamato em neurônios centrais (OLNEY et al.,1974). No método de liberação seu mecanismo de ação foi evidenciado por apresentar perfil semelhante ao obtido com glutamato (figura 20 e tabela 3).

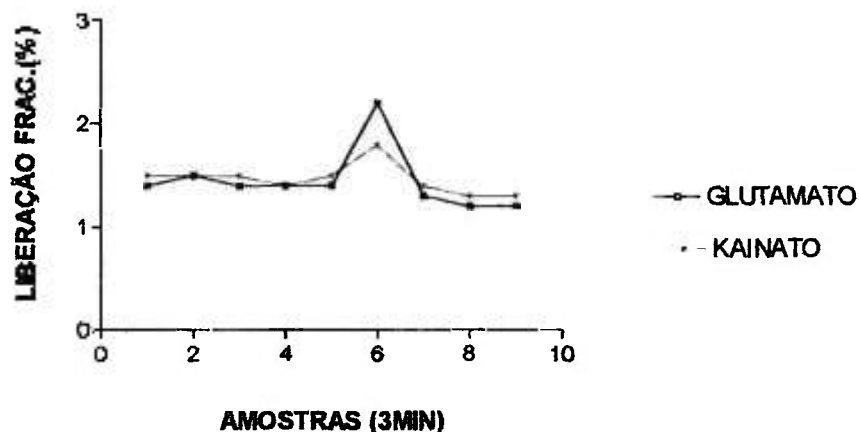


Figura 20. Ação do ácido kaínico 200 μM na liberação de $[^3\text{H}]$ acetilcolina. Controle com estímulo por glutamato 200 μM .

A crotoxina induziu no ensaio de liberação um aumento no valor do basal e o bloqueio da resposta ao estímulo (figura 21).

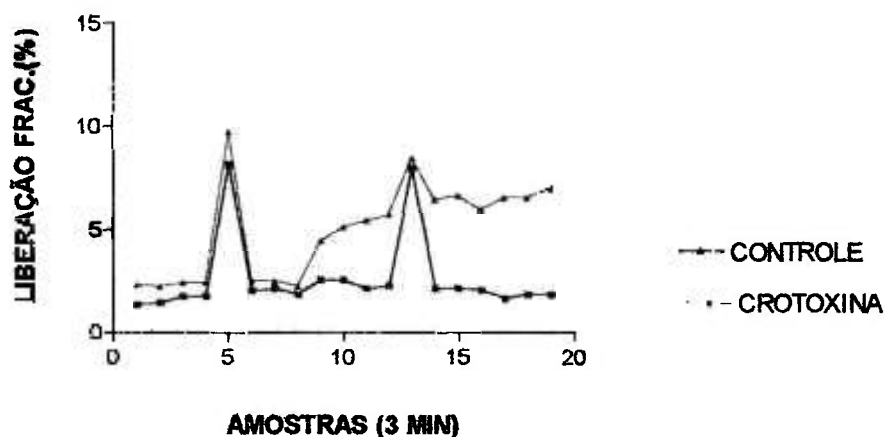


Figura 21. Ação da crotoxina 1,3 μM na liberação de $[^3\text{H}]$ acetilcolina. Estímulo com K^+ 20 mM.

A crotamina age em canais de sódio ou em sua modulação, aumentando a permeabilidade da membrana a este íon. No ensaio de liberação induziu aumento do valor do basal e da resposta ao estímulo. O seu mecanismo é dependente de cálcio mostrando-se inativa em sua ausência (figura 22).

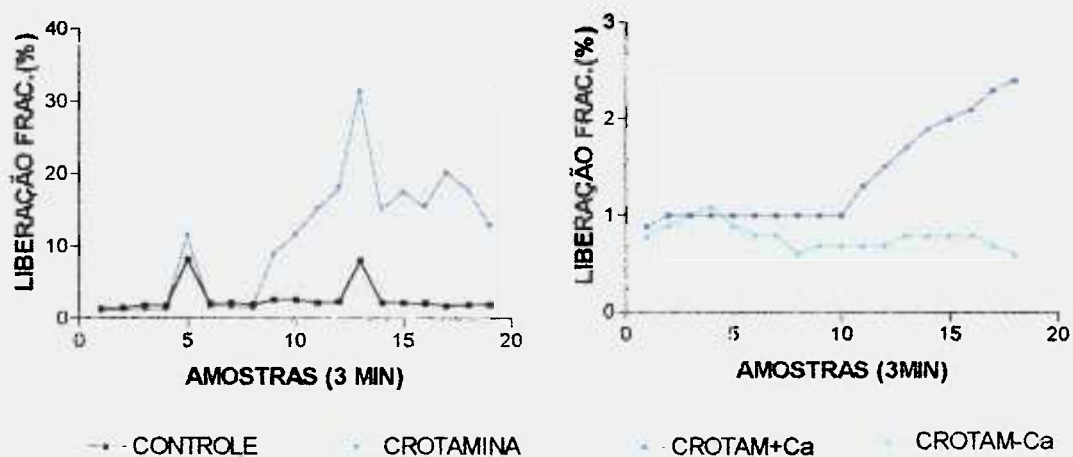


Figura 22. À esquerda, ação da crotamina ($5\mu\text{M}$) na liberação de $[^3\text{H}]$ acetilcolina. Estímulo com K^+ 20 mM. À direita, ação de crotamina ($5\mu\text{M}$) na liberação basal de $[^3\text{H}]$ acetilcolina na presença (CROTAM+Ca) e na ausência (CROTAM-Ca) de cálcio. Neste teste a crotamina foi adicionada ao líquido de perfusão a partir da 5ª amostra e não foram feitos os estímulos com K^+ .

Os parâmetros B_2/B_1 e S_2/S_1 , também podem ser expressos como parâmetros normalizados em relação aos controles; permitindo as comparações interensaios tais como as que foram feitas com as neurotoxinas padrões nas liberações de $[^3\text{H}]$ acetilcolina e $[^3\text{H}]$ dopamina (figura 23 e tabela 3).

Tabela 3. Resultados obtidos com o ensaio de liberação de neurotransmissores.

NEUROTRANS - MISSOR	AGENTE	BASAL* (B ₂ /B ₁)	ESTÍMULO* S ₂ /S ₁	BASAL** (B ₁)	ESTÍMULO** (S ₁)
Dopamina	sem cálcio	0,33	0,23		
Acetilcolina	sem cálcio	1,02	0,07		
Acetilcolina	glutamato			1,43	2,2
	NMDA			1,55	3,3
	quisqualato			1,55	2,1
	kainato			1,42	1,8
Dopamina	bupropiona	1,88	1,26		
Acetilcolina	hemicolinium	2,71	1,07		
Acetilcolina	fisostigmina	2,18	0,55		
Acetilcolina	tetrodotoxina	0,92	0,75		
	crotoxina	1,76	0,87		
	crotamina	9,37	1,96		
	ác.kaínico			1,42	1,8

* Valores das relações dos basais (B₂/B₁) e dos estímulos (S₂/S₁) com K⁺ 20 mM na ausência de cálcio e na presença de alguns fármacos e neurotoxinas (Valores normalizados tomando os controles como 1).

** Valores das liberação basal e estimulada de acetilcolina induzida pela ativação de receptores de glutamato.

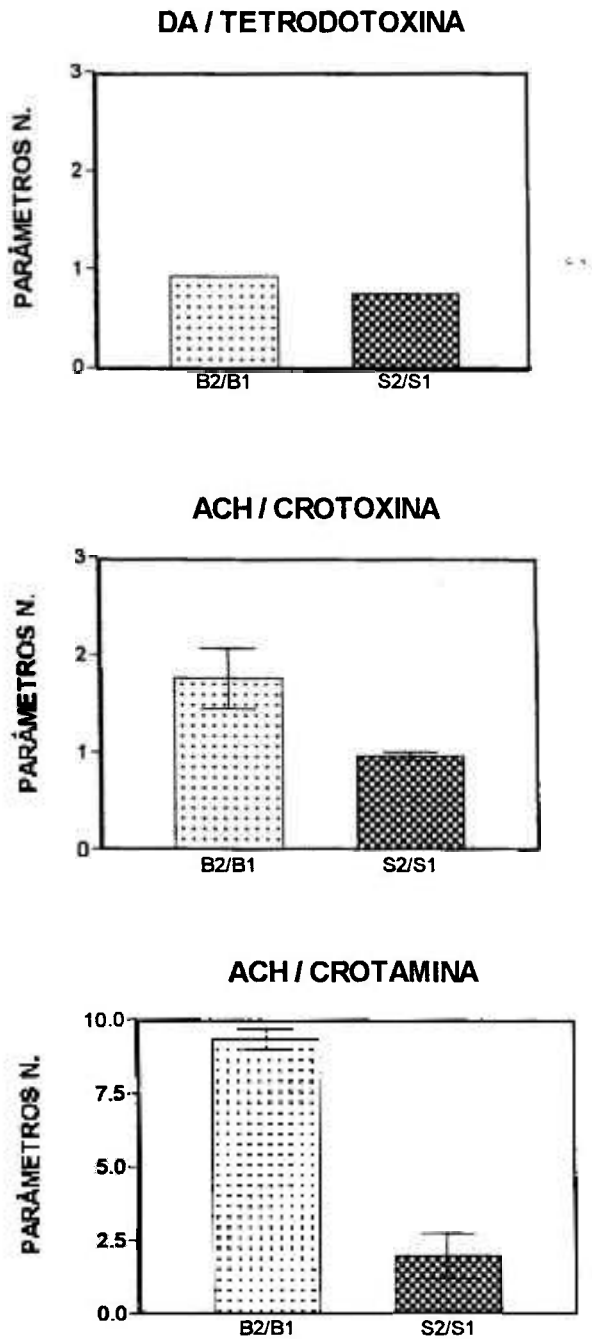


Figura 23. Comparação dos valores de B₂/B₁ e S₂/S₁, normalizados com os controles, nas liberações de [³H]dopamina (DA) ou [³H]acetilcolina (ACH) tendo presente as neurotoxinas tetrodotoxina (TTX) 0,5µM, crotoxina (CX) 1,3 µM e crotamina (CM) 5µM.

Ação das giroxinas na liberação

A adição da giroxina laquética no meio de perfusão não apresentou o perfil de liberação ou os valores de B_2/B_1 ou S_2/S_1 , diferentes dos obtidos para os controles, tanto no ensaio com [3 H]acetilcolina como com [3 H]dopamina (figura 24).

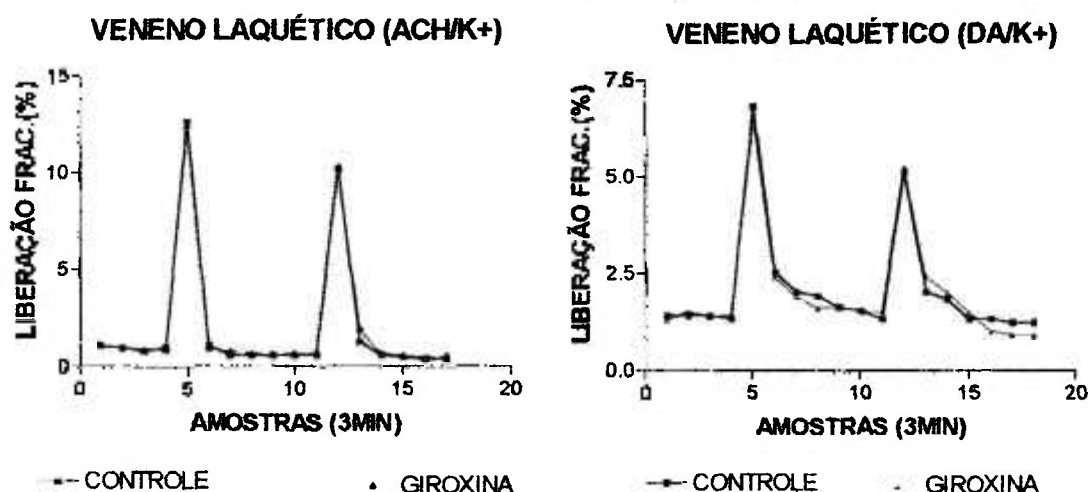


Figura 24. Ação da giroxina de *Lachesis muta muta* 5 μ M na liberação de [3 H]acetilcolina e [3 H]dopamina. Estímulo com K^+ 20 mM.

Observação semelhante foi feita para a toxina crotálica (figura 25).

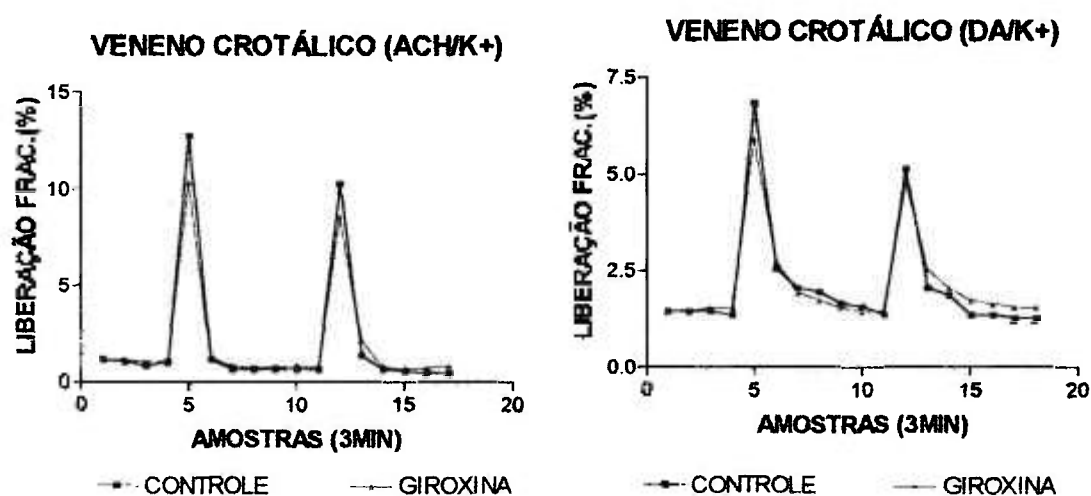


Figura 25. Ação da giroxina de *Crotalus durissus terrificus* 1 μ M na liberação de [3 H]acetilcolina e [3 H]dopamina. Estímulo com K^+ 20 mM.

As duas toxinas foram ensaiadas em diferentes doses. A figura 26 e tabela 4 apresentam as médias e respectivos erros padrões dos valores obtidos para B_2/B_1 e S_2/S_1 , expressos como parâmetros normalizados com relação aos controles, nas liberações de [3 H]acetilcolina ou [3 H]dopamina.

Tabela 4. Valores das relações dos basais (B_2/B_1) e dos estímulos (S_2/S_1) na presença das giroxinas crotálica (crot.) e laquélica (laq.) em diferentes concentrações.

NEUROTRANS- MISSOR	TOXINA	BASAL (MÉDIA DE B_2/B_1)	ERRO PADRÃO	ESTÍMULO* (MÉDIA DE S_2/S_1)	ERRO PADRÃO
Dopamina	giroxina crot. 0,02 μ M	1,03	0,01	0,62	0,18
	giroxina crot. 0,20 μ M	0,92	0,15	0,77	0,52
	giroxina crot. 1,00 μ M	1,09	0,05	1,16	0,06
Acetilcolina	giroxina crot. 0,02 μ M	1,35	0,17	1,21	0,03
	giroxina crot. 0,20 μ M	1,34	0,07	1,16	0,09
	giroxina crot. 1,00 μ M	1,09	0	1,30	0,24
Dopamina	giroxina laq. 0,02 μ M	1,0,	0,02	1,10	0,24
	giroxina laq. 0,13 μ M	0,97	0,06	1,13	0,08
	giroxina laq. 0,26 μ M	1,05	0,02	1,18	0,17
	giroxina laq. 1,00 μ M	1,01	0,04	1,09	0,08
	giroxina laq. 5,00 μ M	1,00	0,02	1,22	0,08
Acetilcolina	giroxina laq. 0,02 μ M	1,21	0,01	1,18	0,15
	giroxina laq. 0,20 μ M	0,96	0,02	1,01	0,01
	giroxina laq. 0,62 μ M	0,96	0,10	0,97	0,11
	giroxina laq. 1,00 μ M	1,00	0,04	1,02	0,03
	giroxina laq. 5,00 μ M	0,99	0,01	1,05	0,05

*Valores normalizados tomando os controles como 1.

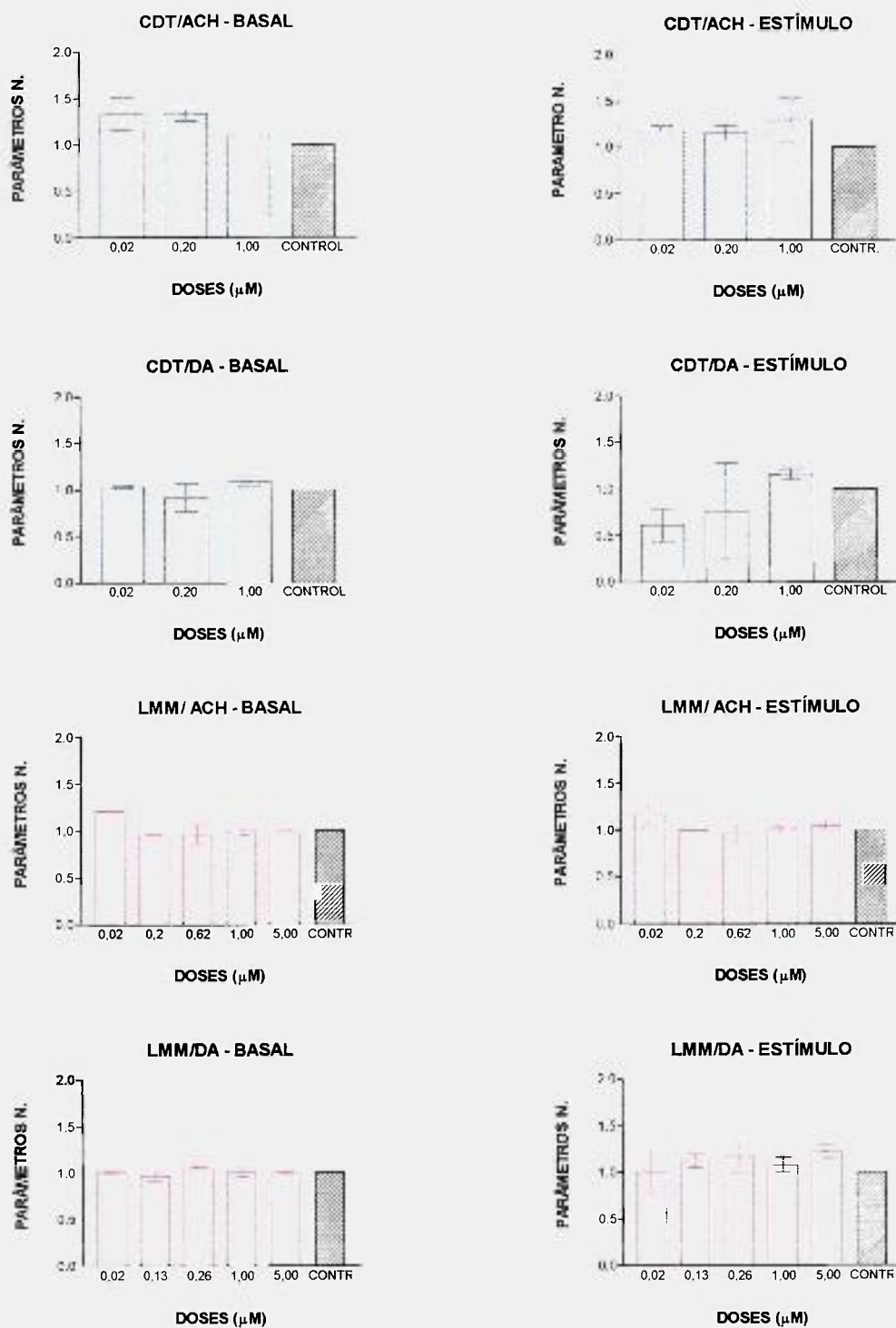


Figura 26. Comparação dos valores de B_2/B_1 (à esquerda) e S_2/S_1 (à direita), obtidos nos ensaios de liberação de $[^3\text{H}]$ acetilcolina ou $[^3\text{H}]$ dopamina, expressos como parâmetros normalizados com os controles e respectivas médias e erros padrões. A giroxina laquetica foi ensaiada nas doses 0,02, 0,20, 0,62, 1,00 e 5,00 μM e a crotática, 0,02, 0,20 e 1 μM . Estímulo com K^+ 20 mM.

Os parâmetros de avaliação da marcação (tabela 5) indicam que o método utilizado foi adequado para fornecer um traçador com bom rendimento, e com atividade específica e pureza compatíveis com as necessárias para os ensaio cinéticos, via de eliminação e teste de passagem pela barreira hematoencefálica.

Tabela 5. Parâmetros de avaliação da marcação com Na¹²⁵I da giroxina crotálica.

PARÂMETROS	VALORES
Radioatividade usada na marcação	27 MBq (740 µCi)
Radioatividade aplicada na coluna	1,067x10 ⁷ cpm
Radioatividade recuperada após a coluna	0,852x10 ⁷ cpm (ou 80%)
Rendimento da marcação (relativa ao pico da toxina marcada)	46%
Atividade específica da toxina marcada	2,5 MBq/µg (68 µCi/µg)

Na cromatografia em Sephadex G.100, houve boa separação da toxina radioiodada dos demais componentes como agregados, [¹²⁵I]albumina bovina (SAB) e Iodo-125 livre (figura 27).

4.7. Radioiodação das giroxinas

Os parâmetros de avaliação da marcação (tabela 5) indicam que o método utilizado foi adequado para fornecer um traçador com bom rendimento, e com atividade específica e pureza compatíveis com as necessárias para os ensaio de toxicocinética, via de eliminação e teste de passagem pela barreira hematoencefálica.

Tabela 5. Parâmetros de avaliação da marcação com Na¹²⁵I da giroxina crotálica.

PARÂMETROS	VALORES
Radioatividade usada na marcação	27 MBq (740 µCi)
Radioatividade aplicada na coluna	1,067x10 ⁷ cpm
Radioatividade recuperada após a coluna	0,852x10 ⁷ cpm (ou 80%)
Rendimento da marcação (relativa ao pico da toxina marcada)	46%
Atividade específica da toxina marcada	2,5 MBq/µg (68 µCi/µg)

Na cromatografia em Sephadex G.100, houve boa separação da toxina radioiodada dos demais componentes como agregados, [¹²⁵I]albumina bovina (SAB) e Iodo-125 livre (figura 27).

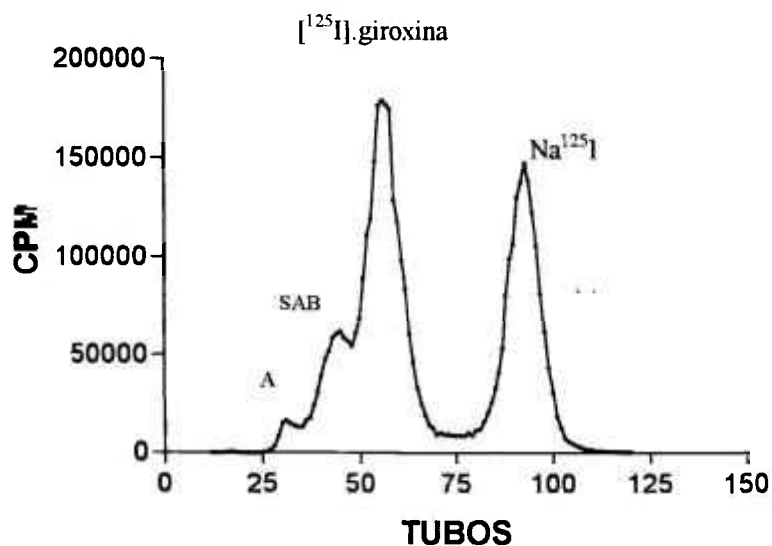


Figura 27. Cromatograma em gel Sephadex G.100 da mistura de marcação da giroxina crotálica com Na¹²⁵I. Eluição com tampão fosfato de sódio 0,05M, pH 7,4 e SAB 0,1 %; volume de cada tubo 2,0 mL e fluxo 12 mL/h. Os picos obtidos no cromatograma correspondem aos agregados protéicos marcados (A ou V₀); ao pico de soro albumina bovina (SAB); à toxina marcada ([¹²⁵I]giroxina) e ao iodo livre (Na¹²⁵I).

A análise eletroforética permitiu comprovar a composição de cada pico do cromatograma obtido na mistura de marcação e estimar a pureza da [¹²⁵I]giroxina em 95% utilizando a proporção das áreas dos picos (figura 28).

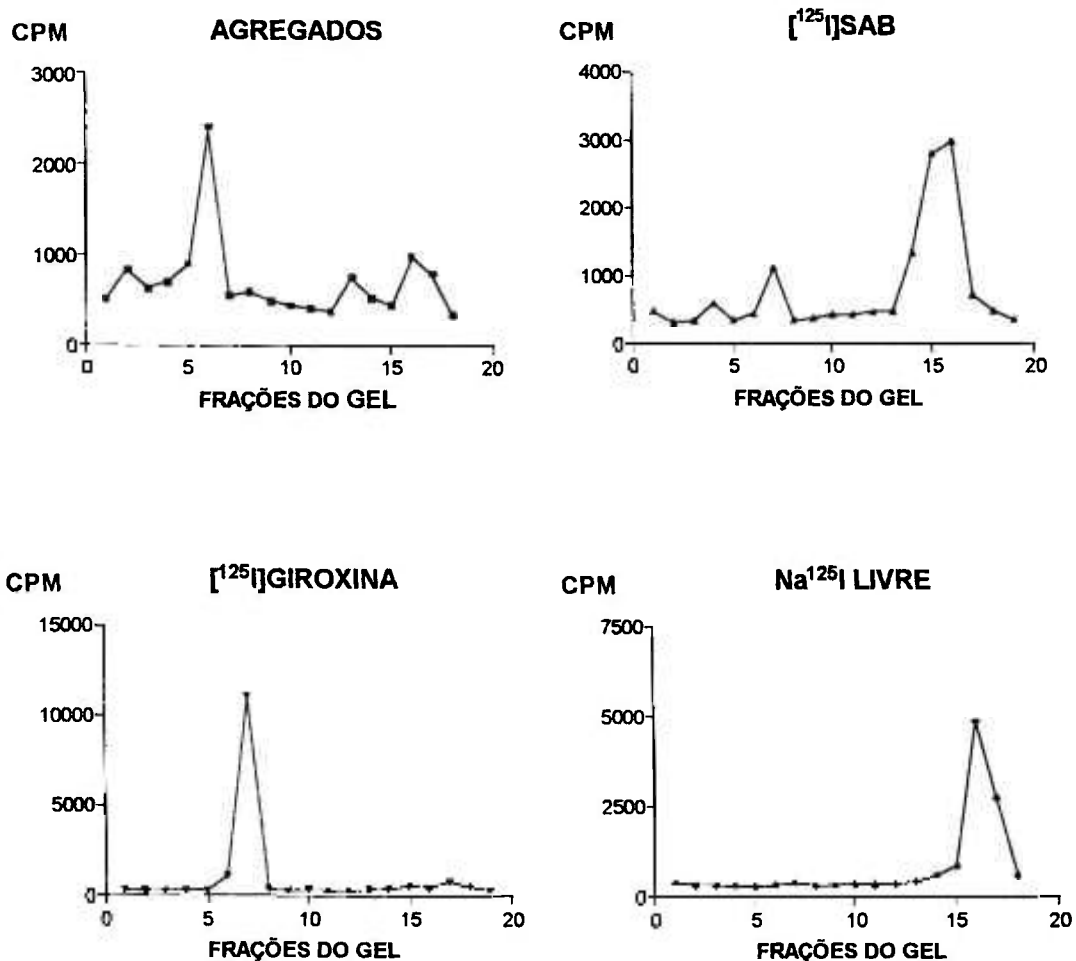


Figura 28. Perfil eletroforético em gel de poliacrilamida 15%, sistema descontínuo de tampões, com SDS. Análise dos picos identificados no fracionamento da mistura de radioiodação da [¹²⁵I]giroxina crotálica (figura 27). Cada fração do gel (eixo x) corresponde a 5 mm.

4.8. Estudo cinético da [¹²⁵I]giroxina

4.8.1. Medidas no sangue

O melhor ajuste matemático obtido para os dados foi pelo modelo bicompartimental. Este modelo, com dose única e intravascular, propõe a distribuição da toxina em um compartimento central [1] e um periférico [2] interligados segundo as constantes de equilíbrio ($K_{1,2}$ e $K_{2,1}$) e a eliminação, por excreção ou metabolismo, segundo a constante $K_{1,0}$ (figura 29). O mesmo pode ser representado pela equação:

$$C(t) = Ae^{-\alpha t} + Be^{-\beta t}$$

onde:

- C(t) concentração plasmática em um dado intervalo de tempo (cpm/mL)
- A intercepto da reta de eliminação rápida
- α constante de eliminação rápida
- B intercepto da reta de eliminação lenta
- β constante de eliminação lenta

α e β são constantes de velocidade híbridas porque representam uma mistura dos processos de distribuição, difusão e eliminação do compartimento central determinados pelas constantes $K_{1,2}$; $K_{2,1}$ e $K_{1,0}$. Estas podem ser calculadas por:

$$K_{1,2} = [AB (\beta - \alpha)^2] / [C_0 (A\beta + B\alpha)] \quad (h^{-1})$$

$$K_{2,1} = (A\beta + B\alpha) / C_0 \quad (h^{-1})$$

$$K_{1,0} = C_0 / [(A/\alpha) + (B/\beta)] \quad (h^{-1})$$

Outros parâmetros podem ser obtidos a partir destes resultados:

- C_0 a soma de A + B fornece a concentração no tempo zero.
- V_c o compartimento central é formado por todos os fluidos, órgãos e tecidos que estão em equilíbrio com o sistema circulatório: $V_c = Dose / C_0$ (em mL)
- $T_{1/2}$ representa a meia-vida biológica ou meia vida plasmática ou meia vida de eliminação da toxina, ou seja, o tempo necessário para que a concentração (ou atividade) diminua à metade. Pode ser calculado por: $T_{1/2} = 0,693/\alpha$ e $T_{1/2} = 0,693/\beta$

Os resultados da análise dos dados estão na tabela 6 e a curva de concentração por tempo obtida com os valores para o sangue, na figura 30. Para

verificar o ajuste dos dados ao modelo (ou equação) adotado foi utilizado o programa GraphPad Prism (versão 3.0) e calculada a análise de regressão não linear/ exponencial de duas fases. O coeficiente de correlação (r^2) calculado foi 0,9021, o que indica que o modelo escolhido foi adequado, ou seja, os dados experimentais se ajustaram ao tratamento matemático utilizado.

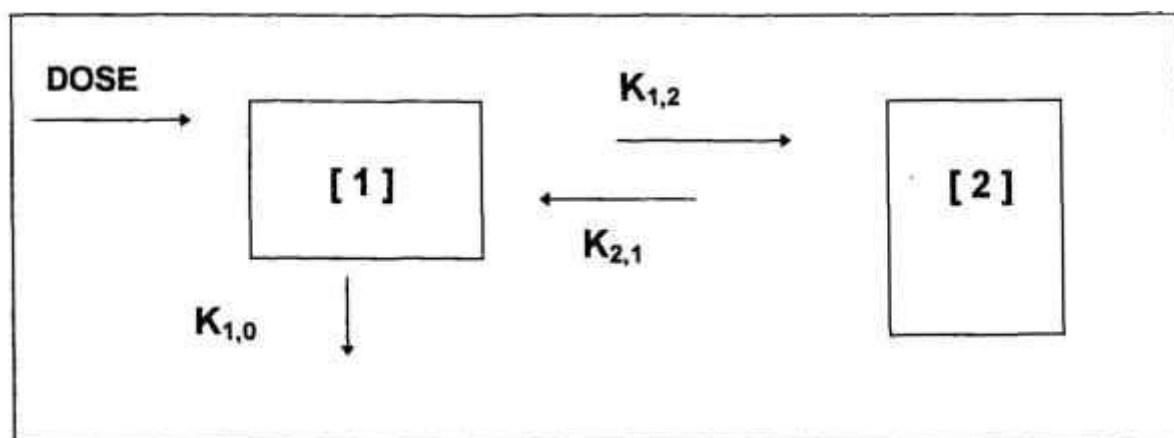


Figura 29. Esquema do modelo bicompartimental aberto representando o compartimento central [1]; o compartimento periférico [2] e as constantes de proporcionalidade ou distribuição ($K_{1,2}$ e $K_{2,1}$) e a de eliminação ($K_{1,0}$).

4.8.2. Medidas nas urinas e fezes

A eliminação (ou excreção) da [125 I]giroxina foi de $98,1 \pm 2,0$ % na via urinária, conforme representado na figura 31.

Tabela 6. Valores dos parâmetros toxicocinéticos obtidos para [125 I]giroxina crotálica no sangue segundo a equação $C_t = Ae^{-\alpha t} + Be^{-\beta t}$

PARÂMETROS	VALORES
Dose injetada (I.V.)	$3,2 \times 10^6$ cpm
A	410500 cpm/min.mL
α	4,460 h^{-1}
B	161100 cpm/min.mL
β	0,2400 h^{-1}
$T_{1/2}$ (fase eliminação rápida)	0,1554 h
$T_{1/2}$ (fase de eliminação lenta)	2,888 h
C_0	571600 cpm/min.mL
V_c	5,60 mL
$K_{1,2}$	2,522 h^{-1}
$K_{2,1}$	1,429 h^{-1}
$K_{1,0}$	0,749 h^{-1}

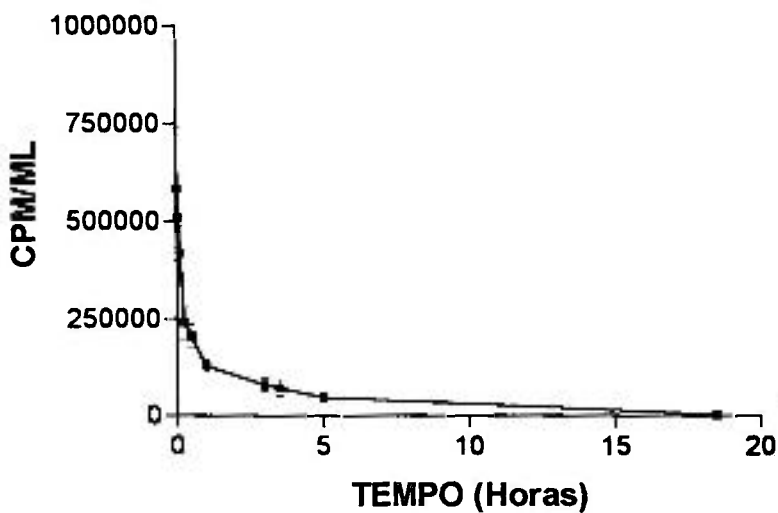


Figura 30. Gráfico dos valores concentração/tempo obtidos para as amostras de sangue. As barras de desvio indicam intervalo de confiança de 95%.

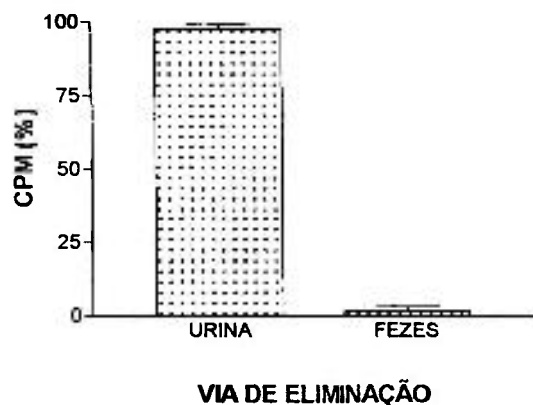


Figura 31. Porcentagem de eliminação da [¹²⁵I]giroxina crotática pela urina e fezes.

4.9. Teste de passagem da barreira hematoencefálica

Na tabela 7 encontram-se as porcentagens da radioatividade medida nos cérebros para cada grupo injetado com [¹²⁵I]giroxina e sacrificado em diferentes intervalos de tempo: 1, 3 ou 10 minutos. Para as tireóides os valores decaíram acompanhando a curva de depuração sanguínea, sendo $0,19 \pm 0,09$ % para 1 min. e $0,13 \pm 0,05$ % para 10 min.

Tabela 7. Teste de incorporação da [¹²⁵I]giroxina

GRUPO/TEMPO		CÉREBRO
		(média %/g \pm desvio padrão)
A	1 min.	$1,45 \pm 0,56$
B	3 min.	$0,80 \pm 0,52$
C	10 min.	$0,51 \pm 0,23$

As alterações na coagulação sanguínea decorrentes de picadas de serpentes são conhecidas já há alguns séculos, no entanto, somente na década de 70 as enzimas semelhantes à trombina começaram a ser isoladas, caracterizadas e iniciados os primeiros testes para aplicações clínicas (STOCKER, 1990). As propriedades físico-químicas destas enzimas dos venenos de *Lachesis muta muta* e *Crotalus durissus terrificus* são similares às descritas para ancrod, Arvin^R do *Calloselasma rhodostoma* (LATALLO, 1983), batroxobin, Defibrase^R do *Bothrops moojeni*, Reptilase^R do *Bothrops atrox* (STOCKER & BARLOW, 1975) e outras: são glicoproteínas, com cadeia única e peso molecular calculado entre 28000 e 36000 Daltons.

As técnicas utilizadas para isolar estas toxinas foram cromatografias em gel filtração e afinidade baseadas em procedimentos já descritos por outros autores (NAKAZONE, 1979; ALEXANDER et al., 1988; SILVEIRA et al., 1989) com pequenas alterações, buscando as condições ideais para melhor resolução e rendimento. Os eluentes das cromatografias em gel filtração foram diferentes para cada veneno, sendo iguais nas colunas de afinidade.

Os rendimentos finais foram compatíveis com os de outros autores (SEKI et al., 1980; CAMPOS et al., 1988; ALEXANDER et al., 1988); no entanto, foram menores que os obtidos por SILVEIRA et al. (1989) para giroxina de *Lachesis muta muta* utilizando agmatina-Sepharose 4B, uma resina não comercial. As perdas foram medidas pela dosagem protéica e puderam ser observadas na análise eletroforética da fração não retida na coluna de afinidade (figura 9).

As posições de eluição das giroxinas (laquética e crotálica) nos cromatogramas foram acompanhadas pela atividade amidásica, embora as duas toxinas tivessem apresentado as atividades amidásica e esterásica. As toxinas isoladas, também foram capazes de induzir a coagulação do fibrinogênio bovino e a rotação em barril no teste *in vivo* corroborando o resultado de outros autores (ALEXANDER et al., 1988, AGUIAR et al., 1996). Estes testes também permitiram verificar se as atividades estavam sendo preservadas ao longo das purificações.

As análises em HPLC indicaram sempre tempos de retenção muito próximos para as duas giroxinas, laquética e crotálica, e após a purificação final foram respectivamente, 21,7 e 21,8 minutos, sugerindo que possuem raios moleculares

semelhantes (a mesma observação foi feita com os valores de K_{av} obtidos com as colunas de gel filtração). Os picos das toxinas correspondem respectivamente, a 70 e 80 % da soma total das áreas, sendo que os "contaminantes" podem ser outras toxinas que eluíram das colunas de afinidade associadas às giroxinas ou, mais provavelmente, de formas alteradas da própria giroxina como, por exemplo, formas diméricas já descritas por BARRABIN et al.(1978).

Nas análises eletroforéticas as formas diméricas podem ter sido separadas no tratamento das amostras antes da corrida, o que sugere que as ligações envolvidas são fracas; com a adição de uréia e β -mercaptoetanol foi comprovado que não ocorreram quebras na cadeia protéica.

Nas preparações de giroxina crotálica foram realizados ensaios complementares para tentar detectar a presença de possíveis contaminantes como crotoxina e convulxina. Estas eluíram na cromatografia de gel filtração em picos adjacentes ao da giroxina (C_1 e C_3 , figura 5) e foram detectadas nas análises eletroforéticas deste passo do processo de purificação (figura 10).

Os ensaios escolhidos foram determinação de atividade fosfolipásica com o método do indicador vermelho de fenol (ARAUJO & RADVANYL, 1987) e agregação plaquetária por medidas de ativação de plaquetas em plasma humano (BORN et al.,1962).

A comprovação da ausência da crotoxina na preparação foi muito importante pois, por esta ser uma neurotoxina, poderia levar a resultados falso positivos no método de liberação de neurotransmissores. Já quanto a convulxina não era esperada uma interferência direta, pois MELLO et al. (1989) observaram que, quando aplicada por outras vias que não a endovenosa, ou seja, em áreas seletivas do sistema nervoso central, esta toxina é desprovida de atividade convulsiva.

Para o veneno de *Lachesis muta muta* não foi confirmado, até o momento, a presença de neurotoxinas que pudessem falsear os resultados. Assim, o grau de pureza obtido para as giroxinas pôde ser considerado adequado para os objetivos propostos.

A liberação de neurotransmissores é a resultante de uma seqüência de processos bioquímicos e constitui um parâmetro que permite avaliar interferências sobre o funcionamento do sistema nervoso central. O método de liberação fracional utilizando neurotransmissores tritiados, permite a observação destas alterações por

meio do registro dos perfis de liberação. As relações de inibição ou facilitação em circuitos neurais são susceptíveis de serem descritas neste método assim como a caracterização farmacológica dos subtipos de receptores envolvidos.

Teoricamente pode ser considerado um sistema intermediário aos ensaios de interações moleculares como os de ligação com os receptores ("binding") ou sinaptossomos e os de interações multi-funcionais complexas como os comportamentais.

O tecido escolhido para este estudo entre várias outras estruturas cerebrais foi o estriato pelo bom conhecimento disponível de suas relações neuroanatômicas e bioquímicas e, pelas observações de VÉCSEI & BEAL (1991) que descreveram o rolamento em barril após injeções de ácido kaínico ou ácido quinolínico diretamente no estriato esquerdo.

O estriato está localizado no gânglio da base; que inclui o núcleo caudato, o putamen, o globo pálido e o claustrum. Nos ensaios foram utilizados o globo pálido e o caudato-putamen que no rato se apresentam como uma estrutura única. A principal influência do gânglio da base é no córtex motor, o que sugere que tenha uma importante influência sobre o sistema lateral das vias motoras e nas desordens de movimentos observadas em algumas doenças. O estriato recebe estímulos de todas as áreas motoras do córtex cerebral mas não recebe informações somato-sensoriais que venham da medula e tem poucas conexões com o tronco cerebral (WILLIS, 1993).

Nas relações bioquímicas, a presença de terminais dopaminérgicos e a virtual ausência de noradrenalina torna o estriato muito adequado para estudos de liberação de [³H]dopamina. A recaptura é o principal processo de inativação deste neurotransmissor e este fato foi observado no método de liberação com o aumento do basal (B_2/B_1) após adição de bupropiona ao meio de perfusão.

A presença do neurônio colinérgico no estriato também é conhecida, assim como o processo de liberação de [³H]acetilcolina, a sua inativação pela acetilcolinesterase e a recaptura da colina. A adição de hemicolinium-3 bloqueou a recaptura da colina produzindo efeito semelhante à bupropiona, ou seja, aumentou o basal (B_2/B_1) sem interferir com o estímulo.

Também estão presentes nesta estrutura cerebral terminais liberadores de GABA e glutamato, assim como de neuropeptídeos como substância P,

colecistoquinina-8, encefalina, vasopressina etc. (KOZLOWSKI et al., 1983; WILLIS, 1993).

A adição de potássio ou glutamato ao meio de perfusão permitiu acessar a liberação dos neurotransmissores via despolarização da membrana e via receptores respectivamente, sendo que a liberação via despolarização foi muito maior do que via receptores de glutamato para os dois neurotransmissores. Esta diferença na quantidade de mensageiro químico liberado depende da corrente iônica gerada pela despolarização, da ativação de canais de receptores, de autoreceptores pré-sinápticos e de heteroreceptores assim como da recaptura e metabolização do neurotransmissor (COOPER et al., 1996).

Glutamato é o principal aminoácido excitatório e foi demonstrado que neste método induz a liberação dose-dependente de neurotransmissores no estriato (TRONCONE et al., 1995); sendo que seus receptores estão preferencialmente associados a canais iônicos de cálcio. Possui cinco tipos de receptores descritos: NMDA, kainato, AMPA/quisqualato, AP4 e ACPD, cada qual disparando características fisiológicas distintas. No ensaio a principal liberação para [³H]dopamina ou [³H]acetilcolina via receptores de glutamato foi pelo tipo NMDA, podendo ser observado pelos valores de S₁ (tabela 3) e confirmado pelo bloqueio da liberação promovido pela adição de MK.801 ou de íons magnésio (CAMILLO et al., 1995). Ácido quisquálico e kaínico foram fracos indutores de liberação de dopamina e de acetilcolina.

A liberação de neurotransmissores é dependente de cálcio pois este íon está envolvido em diversos passos deste processo. Esta dependência foi verificada nos ensaios de liberação de [³H]acetilcolina e de [³H]dopamina com a adição de um quelante (EGPA) e omissão do cálcio no tampão de perfusão. No ensaio com [³H]dopamina também foi adotado outro esquema experimental pois a retirada do cálcio se soma à ausência de magnésio (Mg²⁺) e poderia causar um comprometimento da estabilidade da célula neural. Assim uma estratégia viável foi a adição de cádmio (Cd²⁺) ou lantânio (Ln³⁺) 100µm ao meio de perfusão; o que também bloqueou a liberação de dopamina comprovando a dependência de cálcio para o processo (TRONCONE, comunicação pessoal; CAMILLO et al., 1995).

Os resultados dos testes com toxinas "padrões" foram compatíveis com os mecanismos de ação já descritos:

⇒ A tetrodotoxina (PM 319,28) é uma toxina encontrada em diversas espécies marinhas, entre elas o peixe baiacu (*Spherooides rubripes*) consumido no Japão como uma iguaria, após remoção das vísceras onde se encontra a neurotoxina. Atua bloqueando os canais de sódio voltagem dependente, impedindo o influxo de sódio e, portanto a transmissão da excitabilidade da membrana (MEBS & HUCHO,1990). No método de liberação seu mecanismo de ação foi evidenciado pelos bloqueios das liberações basal e estimulada com diminuição de B_2/B_1 e S_2/S_1 .

⇒ O ácido kaínico (PM 213,23) é uma toxina isolada da alga *Digenea simplex*. É um potente agente neurotóxico que atua potencializando a ação excitatória do glutamato em neurônios centrais (OLNEY et al.,1974). No método de liberação fracional atuou promovendo um pico de liberação semelhante ao obtido com glutamato, no entanto, de menor intensidade.

⇒ A crotoxina (PM 24000) pertence à classe das neurotoxinas que possuem ação pré e pós-sináptica e atividade enzimática de fosfolipase A_2 (OWNBY,1990). O efeito mais estudado é o bloqueio da junção neuromuscular embora já tenha sido demonstrado que também induz alterações comportamentais por ação no sistema nervoso central (MOREIRA et al.,1996). Bloqueia a transmissão nervosa segundo um modelo trifásico pré-sináptico descrito por um efeito depressor inicial, seguido por uma breve facilitação da liberação e, então, uma inibição irreversível do receptor de acetilcolina (RODRIGUES-SIMIONI,1990). Posteriormente há uma inibição da resposta pós-sináptica à acetilcolina aonde ela age induzindo uma alteração conformacional no receptor nicotínico, estabilizando-o em um estado farmacologicamente dessensibilizado (BON et al., 1979) e, finalmente, causa necrose ao músculo atuando preferencialmente na placa motora (CARDI et al.,1992). No ensaio de liberação fracional foi possível observar apenas a ação pré-sináptica, com aumento da liberação basal (B_2/B_1) e inibição da resposta ao estímulo (S_2/S_1). O controle com a enzima fosfolipase A_2 isolada permitiu descartar a possibilidade deste aumento do basal ser decorrente da degeneração do tecido.

⇒ A crotamina (PM 4900) pertence à classe das miotoxinas. Inicialmente causa uma contratura muscular nas patas traseiras do camundongo e por injeção intramuscular, necrose local. CHANG & TSENG (1978) demonstraram que age em canais de sódio ou em sua modulação, aumentando a permeabilidade da membrana a este íon. No ensaio promoveu um aumento da liberação basal (B_2/B_1) e da estimulada

(S_2/S_1), portanto, compatível com o aumento do influxo de sódio. Sua ação foi dependente de cálcio mostrando-se inativa em sua ausência.

Estes ensaios permitiram comprovar a sensibilidade e aplicabilidade do método de liberação fracional utilizando neurotransmissores tritiados nos estudos com neurotoxinas; podendo ser utilizado na triagem de atividades neurotóxicas em frações semi purificadas; podendo contribuir em estudos que visem estabelecer o mecanismo de ação de uma toxina pura ou ainda avaliar alterações do tecido cerebral após exposição a condições patológicas, agentes químicos ou físicos potencialmente lesivos a este tecido etc.

Neste contexto o método de liberação de neurotransmissores tritiados foi adequado para o teste de neurotoxicidade das giroxinas de *Lachesis muta muta* e *Crotalus durissus terrificus*. Diferentes doses destas toxinas não alteraram o perfil normal de liberação de [^3H]dopamina ou de [^3H]acetilcolina o que levou a ser descartada a possibilidade delas atuarem diretamente sobre a liberação destes neurotransmissores. A ausência de uma ação neurotóxica direta sobre o sistema nervoso central corrobora com o ensaio que demonstrou que a giroxina crotálica parece não atravessar a barreira hematoencefálica. A porcentagem de [^{125}I]giroxina detectada no cérebro foi menor que 1,5%/g de tecido, o que sugere que está restrita à circulação já que neste ensaio não foi feita perfusão. A diminuição de atividade observada entre os grupos (1, 3 e 10 minutos) está relacionada à depuração sangüínea da toxina.

Estes resultados foram contrários aos obtidos por MOREIRA (1993), o que talvez possa ser explicado pela ausência de testes de pureza das toxinas utilizadas naquele trabalho, pois as alterações comportamentais e eletrográficas obtidas foram semelhantes para giroxina, crotalina e crotamina (MOREIRA et al., 1992a, 1992b), o que levou a própria autora a ressaltar a necessidade de se caracterizar melhor os efeitos de cada toxina.

Os ensaios com a giroxina radioiodada nos forneceram algumas informações sobre o comportamento *in vivo* desta toxina crotálica. Foi utilizada com 95% de pureza, comprovado pelas análises eletroforéticas do marcado. Resultados falso positivos decorrentes da captação de Iodo-125 livre foram evitados oferecendo iodeto de potássio estável nos bebedouros dos animais e confirmado pela contagem nas tireóides. Condições suaves de marcação e baixa atividade específica do marcado,

foram critérios adotados para preservar a estrutura molecular e as atividades biológicas da gioxina. Os ensaios de atividade enzimática, a capacidade de ligação com anticorpo específico e a indução do rolamento em barril *in vivo* confirmaram que estes objetivos foram alcançados (CAMILLO et al., 1997)

A utilização de um programa computacional permitiu um ajuste preciso da curva plasmática pela decomposição em duas exponenciais. A primeira exponencial, a de distribuição, resultou do rápido clareamento da radioatividade sangüínea com meia-vida curta 0,155 horas (ou 9,3 minutos). A outra exponencial, com meia-vida maior (2,89 horas ou 173,4 minutos), caracteriza a seletividade e pouca retenção da toxina.

Desta forma, a decomposição da curva plasmática em duas exponenciais, sugeriu um modelo de distribuição em dois compartimentos, que pôde ser definido da seguinte forma: O coeficiente de proporcionalidade $K_{1,2}$ indica a transferência do compartimento intravascular, um compartimento central [1], para o extravascular ou compartimento adjacente [2] do qual a [125 I]gioxina injetada é transferida através da membrana biológica, exprimindo a velocidade de depuração sangüínea. Analisando este processo de troca entre os compartimentos, observa-se que uma quantidade ponderável de radioatividade retorna ao compartimento [1], segundo o coeficiente $K_{2,1}$, para então ser excretada com seu coeficiente de eliminação $K_{1,0}$.

O uso da toxina radioiodada permitiu fazer acreditar que esta toxina tem distribuição e eliminação relativamente rápidas, sendo eliminada pela via urinária e forneceu evidências que a gioxina não atravessa a barreira hematoencefálica estando de acordo com as hipóteses que o rolamento em barril deve ser induzido por ação indireta no sistema nervoso central.

Embora o rolamento em barril e todos os sintomas neurotóxicos envolvidos tenham sido descritos em 1961 por BARRIO, quando descobriu a gioxina no veneno de *Crotalus durissus terrificus*, apenas em 1975, COHN & COHN o introduziram nas neurociências, após observação deste efeito por administração intracerebroventricular de altas doses de somatostatina. Foi classificado como um efeito motor não usual, severo, associado à ação intracerebral de neuropeptídeos.

Logo em seguida, KRUSE et al.(1977) observaram o mesmo efeito com a administração intracerebroventricular de arginina-vasopressina, o que motivou os autores a realizarem alguns estudos para entender melhor este quadro patológico e

tentar definir seu local e mecanismo de ação. No entanto, embora muitas das características tenham sido descritas, o objetivo final ainda não foi alcançado pois todo o processo desta síndrome não está totalmente elucidado.

A rotação em barril tem sido descrita como um aumento repentino e assimétrico no tonus do músculo esquelético, acompanhado por opistotonus, distorções espasmódicas e rotação ao longo do eixo do corpo (KRUSE et al., 1977). Ocorre no sentido horário e anti-horário, no entanto, o mesmo rato gira sempre para o mesmo lado com 3% de exceções (WURPEL et al., 1986). Os rolamentos se alternam com períodos de prostração e estímulos por ruídos ou por pinçar a cauda aumentam o comportamento rotacional (COHN & COHN, 1975). Alguns ratos morrem, em geral por dificuldades respiratórias, enquanto outros ficam completamente assintomáticos em aproximadamente 1 hora. Muitos ratos que não desenvolveram a rotação em barril apresentam um ou mais sintomas, tais como imobilidade, alguns graus de ataxia, extensão dos membros posteriores e limpeza.

Outras características importantes do rolamento em barril são:

⇒ é um fenômeno tudo ou nada, não apresentando relação dose x resposta (WURPEL et al., 1986a),

⇒ sofre sensibilização - uma segunda injeção de arginina-vasopressina, via intracerebroventricular induziu o rolamento em barril em um número maior de ratos e causou uma diminuição do tempo de latência em relação ao primeiro dia (WURPEL et al., 1986b; WILLCOX et al., 1992).

⇒ ocorre degeneração do sistema nervoso: análises histológicas do hipocampo de ratos após injeções locais de giroxina crotálica foram caracterizadas pelo aparecimento de danos neuronais presentes tanto no local da injeção quanto em áreas distantes do sítio de aplicação (MOREIRA, 1993). Efeitos tóxicos semelhantes foram observados após injeção intracerebroventricular de somatostatina (BALABAN et al., 1988); e endotelina-3, que produziu alterações necróticas por constrição das arteríolas cerebrais (KANNAN et al., 1994). As injeções de arginina-vasopressina não produzem estas alterações patológicas no tecido (BALABAN et al., 1988).

Tomando como premissa que o rolamento em barril está associado à ação intracerebral de neuropeptídeos e que as giroxinas não tem uma ação direta sobre o tecido nervoso, duas hipóteses para o mecanismo de ação destas toxinas podem ser avaliadas. A primeira supõe que ocorra a liberação de formas ativas como produtos da

atividade enzimática da gioxina sobre substratos endógenos inativos e a segunda, que haja ativação de processos fisiológicos com liberação de vasopressina.

a) Liberação de formas ativas por atividade enzimática sobre substratos endógenos inativos: ALEXANDER et al. (1988) verificaram que a gioxina crotálica purificada por diferentes métodos assim como enzimas semelhantes à trombina obtidas comercialmente (crotalase do veneno de *Crotalus adâmanteus* e Ancrod^R do *Calloselasma rhodostoma*) induziram o rolamento em barril, a coagulação do fibrinogênio e possuíam atividade amidásica e esterásica. Segundo estes autores a capacidade de induzir o rolamento em barril estaria associada às atividades enzimáticas, se correlacionando melhor com a atividade coagulante do que com a esterásica.

Uma outra observação corrobora com a possibilidade do envolvimento de um substrato ou liberação de um mediador na indução do rolamento em barril: uma segunda injeção endovenosa de gioxina após curto intervalo de tempo da primeira dose, não é capaz de reproduzir o giro.

Alguns trabalhos reforçam estas relações utilizando diferentes agentes que inativaram rapidamente as duas atividades: aquecimento, 2-mercaptoetanol ou ditioneitol assim como a adição de inibidores específicos como PMSF (fluoreto de p-toluenosulfonila); DFP (fluorofosfato diisopropila) e TACK (tosil-arginina-clorometil-cetona) (BARRABIN et al., 1978; ALEXANDER et al., 1988).

Estas toxinas possuem serina, histidina e ácido aspártico na configuração espacial do centro catalítico. A serina é especificamente inativada com os fluorofosfato e fluorsulfatos orgânicos tais como o DFP e o PMSF. Estes inibidores reagem somente com a serina do sítio ativo formando um complexo inativo, diisopropilfosforil-enzima, que é estável. A denominação serino proteases decorre desta reação específica; e a inativação ocorre com tripsina, elastina, trombina e com as enzimas semelhantes à trombina isoladas dos venenos de serpentes (FERSHT, 1985).

A atividade TAME-esterásica e o rolamento em barril foram irreversivelmente inativados pela reação com TACK em baixas concentrações (10^{-5} a 10^{-6} M). Este inibidor requer um ambiente específico no sítio de ligação do substrato (que determina a orientação da ligação do inibidor) e a presença de um resíduo de histidina, o qual é

irreversivelmente modificado pelo grupo clorometilcetona do reagente (BARRABIN,1978).

A relação sugerida entre a atividade enzimática observada para as enzimas semelhantes à trombina e a latência para induzirem o rolamento em barril (BARRABIN et al., 1978; ALEXANDER et al.,1988) poderia ser relacionada ao tempo necessário para a gioxina exercer sua atividade enzimática, no entanto, esta possibilidade não está em concordância com as observações de WURPEL et al.(1986) pois mesmo com infusão contínua de altas doses de arginina-vasopressina, via intracerebroventricular, durante 60 minutos, estes autores observaram que alguns ratos não desenvolveram o rolamento em barril e nos demais o período de latência foi mantido.

Para explicar a latência WURPEL et al. (1986a) propuseram que o rolamento em barril necessitaria de várias etapas e/ou vários sítios de ação para ser desencadeado e posteriormente, MOREIRA (1993) sugeriu o envolvimento de processos intracelulares (segundos e terceiros mensageiros), mais lentos que aqueles ligados à facilitação ou bloqueios sinápticos.

Recentemente foi proposta a estrutura tridimensional do sítio ativo da gioxina de *Lachesis muta muta* (MAGALHÃES et al.,1997), tendo como tríade catalítica Asp-88, His-43 e Ser-177. Esta enzima tem peso molecular 25656 Daltons, 6 pontes dissulfeto e 4 pontos de glicosilação (MAGALHÃES et al.;1993). A gioxina do veneno de *Crotalus durissus terrificus* foi apenas parcialmente seqüenciada (DA SILVA et al.,1989) e apresentou 80% de homologia nos 30 aminoácidos N-terminais com esta de *Lachesis*.

A comparação das seqüências de aminoácidos de diversas toxinas semelhantes à trombina e algumas serino proteases como tripsina, trombina e calicreína, mostram altos índices de homologia e semelhança nos sítios de atividade catalítica; no entanto, estas enzimas não induzem o rolamento em barril e a clivagem apenas de fibrinogênio por injeção de trombina em doses até dez vezes maior do que a de gioxina, não foi capaz de desencadear o efeito. Isto nos levou a pensar que a atividade enzimática é essencial para induzir o giro e que o sítio enzimático tem uma especificidade própria.

Analisando a estrutura tridimensional da crotalase após modelagem, MASSOVA et al. (1997) observaram que a superfície molecular ao redor da "cavidade" do sítio ativo S1 é única e diferente de outras serino proteases. Na crotalase duas "cavidades" estão juntas formando a fenda do sítio ativo. Uma "cavidade" é similar à do exossítio da

trombina, onde ocorre a ligação do fibrinogênio, e a outra é única. Esta segunda "cavidade" está ausente na trombina e se localiza na alça 60A - 60I. Uma das paredes desta segunda "cavidade" é formada por seis aminoácidos adicionais num prolongamento do C-terminal. Esta segunda "cavidade" se alinha também com resíduos básicos (Arg60-Lys85-Lys89-Arg107-Lys110) formando duas superfícies espelhadas, carregadas positivamente. Este segundo sítio pode ser considerado como um exosítio alternativo de reconhecimento do fibrinogênio. A maioria das enzimas semelhantes à trombina tem carga negativa na área de localização do exosítio de ligação do fibrinogênio. Por outro lado, os resíduos básicos nas posições 85, 89 e 107 são conservadas nas sete enzimas semelhantes à trombina já seqüenciadas e as posições 60 e 110 são básicos em seis delas, sugerindo a existência deste sítio alternativo.

Este sítio alternativo identificado na crotalase poderia ser o responsável pelo efeito de induzir a rotação em barril pois é exclusivo das enzimas semelhantes à trombina, não tendo sido descrito em outras serino proteases.

b) Ativação de processos fisiológicos com liberação de vasopressina: A vasopressina está presente em estruturas cerebrais associadas com as funções motoras e diversos trabalhos relacionam algumas de suas ações fisiológicas com o rolamento em barril (YOSHIZAWA et al.,1990; WILLCOX et al.,1992; DE WIED et al.,1993; DIAMANT et al.,1994; KANNAN et al.,1994).

Da mesma forma, algumas enzimas semelhantes à trombina como, por exemplo, a giroxina do veneno de *Crotalus durissus terrificus* (ALEXANDER et al.,1988) e a crotalase do *Crotalus adamanteus* (MARKLAND et al., 1982), geram acentuada queda da pressão arterial o que poderia levar à liberação de vasopressina como uma resposta fisiológica do organismo para restabelecer a homeostasia (BERNE & LEVY, 1993).

Processo semelhante foi observado com outras substâncias. A administração intracerebroventricular de endotelina-3 induziu uma resposta pressora aumentando a liberação de vasopressina e o rolamento em barril teve início com o aumento da pressão arterial (YOSHIZAWA et al.,1990; KANNAN et al.,1994).

O envolvimento de receptores vasopressinérgicos V1, foi comprovado quando o pré tratamento com antagonistas específicos deste receptor preveniram

completamente o rolamento em barril induzido em ratos por altas doses de arginina-vasopressina, via intracerebroventricular (DIAMANT et al., 1994).

A associação com a hipotermia ocorreu em ratos que sofreram o rolamento em barril após injeção de arginina-vasopressina, via intracerebroventricular e que invariavelmente apresentaram acentuada diminuição da temperatura corporal (KASTING et al., 1980; DIAMANT et al., 1994).

Como a arginina-vasopressina é um agonista vasopressor surgiu a hipótese de que os efeitos motores fossem decorrentes de vasoconstrições locais. No entanto, esta relação foi questionada por diversos autores parecendo ser pouco provável pois:

⇒ a angiotensina II é um agente vasopressor mais potente e não induz atividade motora em ratos, e a lisina-vasopressina que possui ação motora maior do que a arginina-vasopressina, tem menor atividade vasoconstritora (KRUSE et al., 1977; WILLCOX et al., 1992),

⇒ a endotelina-3 que também é um potente agente vasoconstritor, em administração endovenosa não induziu o rolamento em barril (KANNAN et al., 1994)

Assim muitas evidências sugerem que a liberação de vasopressina seja o passo intermediário para as toxinas e outras substâncias induzirem o rolamento em barril. No entanto, o mecanismo de ação destas toxinas assim como a causa do rolamento em barril ainda se constituem em incógnitas a serem elucidadas, embora "inúmeras peças estejam sendo somadas, dia a dia, para se montar este quebra-cabeça".

Novos experimentos com outras abordagens serão necessários para uma melhor compreensão destes mecanismos.

. Considerações finais

Uma toxina que afeta simultaneamente o sistema nervoso (mesmo que de forma indireta), a homeostasia circulatória e o mecanismo de coagulação traz muitas vantagens evolutivas para as serpentes. Isto talvez explique porque estas toxinas são tão largamente encontradas nos venenos ofídicos.

No veneno de *Lachesis muta muta* a gioxina parece ser a toxina de maior toxicidade (DA SILVA et al., 1989) e a hipotensão induzida pela enzima liberadora de cininas (DINIZ & OLIVEIRA, 1992), assim como, a hemorragia causada pelas toxinas hemorrágicas (SANCHEZ et al., 1987; 1991) potenciam a sua ação (BURNARD et

al.,1983); novamente demonstrando o efeito sinérgico entre componentes dos venenos. No veneno de *Crotalus durissus terrificus* sua importância foi superada pela crotoxina, o que corrobora com a posição das duas serpentes na árvore evolutiva (BRATTSTROM,1964).

Para as futuras pesquisas resta o interesse na química de proteína destas enzimas, em suas estruturas e relações evolutivas com outras enzimas proteolíticas de forma a elucidar reações neurofisiológicas ou de coagulação.

Podem ser ferramentas importantes para esclarecer uma série de etapas envolvidas nestes sistemas como, por exemplo, na relação dos neuropeptídeos com as funções motoras; nos processos de excitose, ou como um modelo animal para as doenças convulsivas e outros. Já há algum tempo estão sendo úteis para elucidar a polimerização da fibrina e remover fibrina e/ou fibrinogênio do sangue *in vitro* e em condições *in vivo*.

Do ponto de vista clínico, estas enzimas provaram ser úteis na dissolução de coágulos formados, por exemplo, durante infarto do miocárdio, trombozes em veias profundas, pancadas e embolia pulmonar (MARKLAND,1988). As informações adicionais geradas neste trabalho visaram elucidar possíveis efeitos colaterais e contribuir para uma maior segurança em seu uso clínico.

Da análise dos resultados que obtivemos, nas condições e pelas metodologias utilizadas podemos concluir que:

⇒ as gíroxinas dos venenos de *Lachesis muta muta* e de *Crotalus durissus terrificus* foram obtidas com rendimento e pureza adequados para os ensaios de neurotoxicidade e toxicocinética, via de eliminação e passagem pela barreira hematoencefálica e com suas propriedades físico-químicas e biológicas compatíveis com as descritas por outros autores,

⇒ o método de liberação *in vitro* de [³H]acetilcolina ou [³H]dopamina respondeu à presença e ausência de cálcio e os resultados foram compatíveis com os mecanismos de ação de fármacos, o que permite concluir que processos neurofisiológicos podem ser acessados neste ensaio,

⇒ o método de liberação *in vitro* de [³H]acetilcolina ou [³H]dopamina mostrou sensibilidade a toxinas conhecidas, com diferentes estruturas químicas e pesos moleculares, portanto, podendo ser utilizado para estudos com neurotoxinas,

⇒ as gíroxinas laquélica e crotálica não agiram sobre as liberações, basal ou estimulada, de acetilcolina ou dopamina do estriato de ratos,

⇒ a gíroxina crotálica na forma radioiodada foi obtida com bom rendimento e 95% de pureza, tendo suas atividades enzimáticas e biológica preservadas,

⇒ a gíroxina crotálica foi rapidamente distribuída, segundo um modelo bicompartimental, eliminada pela via urinária e forneceu evidências de não atravessar a barreira hematoencefálica.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUIAR, A.S.; ALVES, C.R.; MELGAREJO, A.; GIOVANNI-DE-SIMONE, S. Purification and partial characterization of a thrombin-like/gyroxin enzyme from Bushmaster (*Lachesis muta rhombeata*) venom. *Toxicon*, v.34, n.5, p. 555-565, 1996.
- ALEXANDER,G.; GROTHUSEN,J.; ZEPEDA,H. & SCHWARTZMAN,R.J.. Gyroxin, atoxin from the venom of *Crotalus durissus terrificus* , is a thrombin-like enzyme. *Toxicon*, v.26, n.10, p.953-960,1988.
- ARAGÓN-ORTIZ, F .Purification and properties of a coagulant proteinase isolated from Bushmaster (*Lachesis muta*)venom (Serpentes:*Viperidae*). *Rev.Biol.Trop.*, v.34, n.1, p. 55-58, 1986.
- ARAGÓN-ORTIZ, F. Isolation and partial characterization of *Lachesis muta melanocephala* coagulant proteinase: biochemical parameters of the venom. *Rev.Biol.Trop.*, v.36, n. 2B, p. 387-392, 1988.
- ARAGÓN-ORTIZ, F.; GUBENSEK, F. A thrombin-like enzyme from Bushmaster (*Lachesis muta stenophrys*) venom. *Toxicon*, v.31, n11, p. 1435-1443, 1993.
- ARAÚJO, A.L.; RADVANYL, F. Determination of phospholipase A2 activity by a colorimetric assay using a pH indicator. *Toxicon*, v.25, p.1181-1188, 1987.
- AZEVEDO-MARQUES, M.M.; CUPO, P.; HERING, S.E. Acidente crocálico. In: SCHVARTSMAN, S. *Plantas e Animais Peçonhentos*. São Paulo, Brasil, Sarvier, 1992. p. 161-170.
- BALABAN, C.D.; FREDERICKS, D.A.; WURPEL, J.N. & SEVERS, W.B. Motor disturbances and neurotoxicity by centrally administered somatostatin and vasopressin in conscious rats: interactive effects of two neuropeptides. *Brain Res.*, v.445, p.117-129, 1988.
- BARD, R.; R.DE LIMA, J.C.; SANETO, R.P.; OLIVEIRA, S.G.; SANTOS, M.C. Ineficácia do antiveneno botrópico na neutralização da atividade coagulante do veneno de *Lachesis muta muta*. Relato de caso e comprovação experimental. *Rev.Inst.Med.Trop.SP.*, v. 36, n.1, p.77-81, 1994

- BARRABIN, H.; MARTIARENA, J.L.; VIDAL, J.C.; BARRIO, A. Isolation and characterization of gyroxin from *Crotalus durissus terrificus* venom. In: ROSEMBERG, P. **Toxins: Animals, Plant and Microbial**. New York, USA, Pergamon Press, 1978. p. 113-133.
- BARRIO, A. Gyroxin, a new neurotoxin of *Crotalus durissus terrificus* venom. **Acta Physiol. Latinoamer.**, v.11, p. 224, 1961
- BARTOLINI, P.; RIBELA, M.T.C.P. Influence of chloramine T iodination on the biological and immunological activity or the molecular radius of the human growth hormone molecule. **J.Immunoassay**, v.7, n.3, p.120-138, 1986.
- BERNE,R.M. & LEVY,M.N. The circulatory system: Interplay of central and peripheral factors in the control of the circulation. In: FARREL,R. & LEVY,M.N. **Physiology**. Missouri, USA. Mosby Year Book Inc., 1993, p.532-543.
- BOLANOS, R.; ROJAS, O.; FLORES, C.E.V. Aspectos biomédicos de cuatro casos de mordedura de serpentes por *Lachesis muta* (Ophidea Viperidae)) en Costa Rica. **Rev.Biol.Trop.**, v.30, n.1, p.53-58, 1982.
- BON, C.; CHANGEUX, J.P.; JENG, T.W.; FRANKEL-CONRAT, H. Postsynaptic effects of crotoxin and of its isolated subunits. **Eur.J.Biochem.**, v.99, p.471-84, 1979.
- BORN, G.V.R. Aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate and its reversal. **Nature**, v.194, p.927-929, 1962.
- BRATTSTROM, B.H. Evolution of the pit vipers. **Transactions San Diego Society of Natural History.**,v.13, p. 185-268, 1964.
- BURNARD,D.M.; PITTMAN,Q.J. & VEALE, W.L. Increase motor disturbances in response to arginine vasopressin following hemorrhage or hypertonic saline: evidence for central AVP release in rats. **Brain Res.**, v.273, p.59-65, 1983.
- CAMILLO, M.A.P.; PAES,P.C.A.; RIBELA,M.T.C.P. & RÓGERO,J.R. Purificação e radioiodação da giroxina (toxina semelhante à trombina) do veneno de *Crotalus durissus terrificus*. In: **Proc. IV Meeting Nuclear Applications**. Aug, 18-22, p.345, Poços de Caldas, MG. 1997.
- CAMILLO,M.A.P.; TRONCONE, L.R.P. & ROGERO,J.R. In vitro labelled neurotransmitters release for the study of neurotoxins. In: **Proc. III Meeting Nuclear Applications.**; Aug. 7-11. Águas de Lindóia, SP. p.963-968, 1995.

- CAMPBELL, J.A. & LAMAR, W.W. Bushmaster. Genus *Lachesis* Daudin, 1803. In: ***The venomous reptiles of Latin America***. Cornell University Press, New York, 1989, p.307-310.
- CAMPOS, S.; ESCOBAR, E.; LAZO, F.; YARLEQUE, A. Partial separation and characterization of a thrombin-like enzyme from the venom of the Peruvian Bushmaster snake, *Lachesis muta muta*. In: PIRKLE, H.; MARKLAND, F.S. ***Hemostasis and Animal Venoms***. New York, USA, Marcel Dekker Inc., 1988. p. 107-115.
- CARDI, B.A.; NASCIMENTO, N.; ROGERO, J.R. & ANDRADE Jr., H.F. Immunochemical detection of purified crotoxin from *Crotalus durissus terrificus* in the motor end plate of striated muscle in CBA/J mice. ***Braz.J.Med.Biol.Res.***, v.25, p.905-908, 1992.
- CHANG, C.C. & TSENG, K.H. Effect of crotoxin, a toxin of South American rattlesnake venom, on the sodium channel of murine skeletal muscle. ***Br.J.Pharmacol.***, v.63, p.551-9, 1978.
- COHN, M.L. & COHN, M. Barrel rotation induced by somatostatin in the non-lesioned rat. ***Brain Res.***, v.96, p.139-141, 1975.
- COOPER, J.R.; BLOOM, F.E. & ROTH, R.H. ***Modulation of synaptic transmission. The biochemical basis of neuropharmacology***. New York, USA. Oxford University Press, Inc. 1996, p.103-125.
- DA SILVA, N.J.; AIRD, S.D. SEEBART, C. & KAISER, I.I. A gyroxin analog from the venom of the bushmaster (*Lachesis muta muta*). ***Toxicon***, v.27, n.7, p.763-771, 1989.
- DE WIED, D.; DIAMANT, M. & FODOR, M. Central nervous system effects of the neurohypophyseal hormones and related peptides. ***Front. Neuroendocr.***, v.14, n4, p.251-302, 1993.
- DIAMANT, M., BAARS, A.M., KOVÁČX, G. L., DE WIED, D. Barrel rotation induced by central arginine-vasopressin treatment: involvement of neurohypophyseal peptide receptors. ***Pharm. Biochem. Behavior***, v. 47, p. 27-32, 1994.
- DINIZ, M.R.V. & OLIVEIRA, E.B. Purification and properties of a kininogenin from the venom of *Lachesis muta* (Bushmaster). ***Toxicon***, v.30, n.3, p.247-258, 1992.
- ERLANGER, B.F.; KOKOWSKY, N. & COHEN, W. The preparation and properties of two chromogenic substrates of trypsin. ***Arch.Biochem.Biophys.***, v.95, p.271-278, 1961.

- ESCOBAR, E.; RODRIGUES, E.; YARLEQUE, A. Isolation and partial characterization of a fibrinogenase from the venom of the Peruvian Bushmaster *Lachesis muta*. In: GOPALAKRISHNAKONE, P.; TAN CHOON KIN. **Recent Advances in Toxinology Research.**, Singapore, National University of Singapore, 1992. p. 421-430.
- FERSHT, A. The structures and mechanisms of selected enzymes. **Enzymes structure and mechanism.** New York, USA. W.H. Freeman and Company, 1985, p.405-413.
- FULY, A.L.; FRANCISCHETTI, I.M.; ZINGALI, R.B. & CARLINI, C.R. Partial purification and some physicochemical properties of phospholipase A2 from the venom of the bushmaster snake (*Lachesis muta*). **Braz.J.Med.Bio.Res.**, v.26, p.459-463, 1993.
- GENÉ, J.A.; ROY, A.; ROJAS, G.; GUTIERREZ, J.M.; CERDAS, L. Comparative study on coagulant, defibrinating, fibrinolytic and fibrinogenolytic activities of Costa Rican Crotalinae snake venoms and their neutralization by a polyvalent antivenom. **Toxicon**, v.27, n.8, p.841-848, 1989.
- JORGE, M.T. & RIBEIRO, L.A.. Acidentes por animais peçonhentos. **Rev.Ass.Med.Brasil.**, v.36, n.2, p. 66-77, 1990.
- JORGE, M.T.; SANO-MARTINS, I.S.; TOMY, S.C.; CASTRO, S.C.B.; FERRARI, R.A.; RIBEIRO, L.A.; WARREL, D.A. Snakebite by the Bushmaster (*Lachesis muta*) in Brazil. Case report and review of the literature. **Toxicon**, v.35, n.4, p.545-554, 1997.
- KAMIGUTI, A.S.; SANO-MARTINS, I.S. South american snake venoms affecting haemostasis. **J.Toxicol.-Toxins Reviews**. v.14, n.3, p. 359-347, 1995.
- KANNAN, H., TANAKA, H., UETA, Y., HAYASHIDA, Y., KUNITAKE, T., YAMASHITA, H. Effects of centrally administered endothelin-3 on renal sympathetic nerve activity and renal blood flow in conscious rats. **J. Autonomic Nervous System**, v. 49, p. 105-113, 1994.
- KASTING, N.W.; VEALE, W.L. & COOPER, K.E. Convulsive and hypothermic effects of vasopressin in the brain of the rat. **Can.J.Physiol.Pharmacol.**, v.58, p.316-319, 1980.
- KORNALIK, F. Toxins affecting blood coagulation and fibrinolysis. In: SHIER, W.T.; MEBS, D. **Handbook of Toxinology.** New York, USA, Marcel Dekker Inc., 1990. p. 683-759.
- KOZLOWSKI, G.P.; NILAVER, G. & ZIMMERMAN, E.A. Distribution of neurohypophysial hormones in the brain. **Pharmacol. Ther.**, v.21, p.325-349, 1983.

- KRUSE, H.; GREIDANUS, V.W.T.J.B. & DE WIED, D. Barrel rotation induced by vasopressin and related peptides in rats. *Pharmacol.Biochem.Behav.*, v.7, p.311-313, 1977.
- LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature (London)*, v.227, p.680-685, 1970.
- LATALLO, Z.S. Retrospective study on complications and adverse effects of treatment with thrombin like enzymes. *Thromb.Haemost.*, v.50, p.604, 1983
- MAGALHÃES, A.; FONSECA, B.C.B.; DINIZ, C.R.; GILROY, J.; RICHARDSON, M. The complete amino acid sequence of a thrombin-like enzyme/ gyroxin analogue from venom of the Bushmaster snake (*Lachesis muta muta*). *FEBS*, v.329, n.1,2, p. 116-120, 1993.
- MAGALHÃES, A.M.; OLIVEIRA, G.J.; DINIZ, C.R. Purification and partial characterization of a thrombin-like enzyme from the venom of the Bushmaster snake, *Lachesis muta noctivaga*. *Toxicon*, v.19, n.2, p.279-294, 1981.
- MAGALHÃES, A.; MONTEIRO, M.R.; MAGALHÃES, H.P.B.; MARES-GUIA, M. & ROGANA, E. Thrombin-like enzyme from *Lachesis muta muta* venom: isolation and topographical analysis of its active site structure by means of the binding of amidines and guanidines as competitive inhibitors. *Toxicon*, v.35, n.10, p.1549-1559, 1997.
- MAGALHÃES, H.P.B. **Estudo da especificidade da enzima semelhante à trombina do veneno de *Lachesis muta muta***. Belo Horizonte, MG., 1992. Dissertação de Mestrado, UFMG.
- MARIEN, M.; BRIEN, K. & JHAMANDAS, K. Regional release of [3H]dopamina from rat brain in vitro effects of opioids on release induced by K⁺, nicotine and L-glutamic acid. *Can.J.Physiol.Pharmacol.*, v.61, p.43-60, 1983.
- MARKLAND, F.S. Fibrin(ogen)olytic enzymes from snake venoms. In: PIRKLE, H. & MARKLAND JR., F. S. *Hemostasis and animal venoms*. New York, USA, Marcel Dekker Inc., 1988, p. 149-172.
- MARKLAND, F.S.; KETTNER, C.; SCHIFFMAN, S.; SHAW, E.; BAJWA, S.S.; REDDY, K.N.N.; KIRAKOSSIAN, H.; PATKOS, G.B., THEODOR, I. & PIRKLE, H. Kallikrein-like action of a fibrinogen clotting snake venom enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, v.79, p.1688, 1982.

- MARSH, N.A. Snake venoms affecting the haemostatic mechanism - a consideration of their mechanism, practical applications and biological significance. **Blood Coagulat.Fibrin.**, v.5, p. 399-410, 1994.
- MASSOVA, I., PIRKLE, H., EDWARDS, B.F.P., MOBASHERY, S. Insights into the three-dimensional structure of crotalase: implications for biological activity and substrate specificity. **Bioorganic & Medicinal Chem. Lett.**, v. 7, n. 24, p. 3144, 1997.
- MEBS, D.& HUCHO, F. Toxins acting on ions channels and synapses. In: SHIER; W.T.; MEBS, D. **Handbook of Toxinology**. New York, USA, Marcel Dekker Inc., 1990. p. 493-599.
- MELLO, L.E.A.M; PRADO-FRANCESCHI, J.; GIGLIO, J.R.; CAVALHEIRO, E.A. Convulxin does not induce convulsions when injected into the rat dorsal hippocampus. **Acta Physiol. Pharmacol. Latinoamer.**, v.39, p. 353-358, 1989.
- MILLER, G.L. Protein determination for large numbers of samples. **Anal. Chem.**, v.31, p.964, 1959.
- MOREIRA, V.M.T.S. **Efeitos da injeção intrahipocampal de crotoxina, crotamina e giroxina em ratos**. São Paulo, 1993. Tese de Doutorado - (Escola Paulista de Medicina) Universidade Federal de São Paulo.
- MOREIRA, E.G; NASCIMENTO, N.; ROSA, G.J.M.; ROGERO, J.R. & VASSILIEFF, V.S. Crotoxin-induced behavioral effects in rats. **Braz.J.Med.Bio.Res.** v.29, p.629-632, 1996.
- MOREIRA, V.M.T.S.; LANDUCCI, E.T.; OLIVEIRA FILHO, B.; MARANGONI, S.; MELLO, L.E.A.M. & CAVALHEIRO, E.A. Efeitos da injeção intrahipocampal da crotoxina. In: XVI Congresso Brasileiro de Neurociências e Comportamento. Caxambu, MG. Resumos **Braz.J.Med.Biol.Res.**, p.21, 1992a.
- MOREIRA, V.M.T.S.; LANDUCCI, E.T.; OLIVEIRA FILHO, B.; MARANGONI, S.; MELLO, L.E.A.M. & CAVALHEIRO, E.A. Efeitos da injeção intrahipocampal da crotamina. In: XVI Congresso Brasileiro de Neurociências e Comportamento. Caxambu, MG. Resumos **Braz.J.Med.Biol.Res.**, p.21, 1992b.
- MOURA GONÇALVES, J.; VIEIRA, L.G. Estudos sobre venenos de serpentes brasileiras. **Anais da Acad.Bras.Ciências**, t.XXII, n.1, p.141-150, 1950.

- MURPHY, C.A. **Manual de farmacocinética**. Tlalpan, México, SOC. MEX. MEDIC. NUCLEAR / ASSOC. LATINOAMERICANA SOC. BIOL. MEDIC. NUCLEAR, 1990, p.1-77.
- NAKAZONE, A. **Aspectos imunoquímicos da crotoxina e suas subunidades**. São Paulo, SP., 1979. Tese de Doutorado, Instituto de Química, USP.
- NASCIMENTO, N.; SEEBART, C.S.; FRANCIS, B.; ROGERO, J.R.; KAISE, I. Influence of ionizing radiation on crotoxin: biochemical and immunological aspects. **Toxicon**, v.34, n.1, p.123-131, 1996.
- OLNEY, J.W.; RHEE, V.; HO, O.L. Kainic Acids: a powerful neurotoxic analogue of glutamate. **Brain Res.**, v.77, p. 507-512, 1974.
- OREJUELA, P.; ZAVALETA, A.; SALAS, M.; MARSH, N. Thrombin-like activity in snake venoms from Peruvian *Bothrops* and *Lachesis* genera. **Toxicon**, v.29; n.9, p. 1151-1154, 1991.
- OUYANG, C.; TENG, C.H.; HUANG, T.F. Characterization of snake venom components acting on blood coagulation and platelet function. **Toxicon**, v.30, n.9, p.945-966, 1992.
- OWNBY, C.H. Locally acting agents: myotoxins, hemorrhagic toxins and dermonecrotic factors. In: SHIER, W.T.; MEBS, D. **Handbook of Toxinology**. New York, USA, Marcel Dekker Inc., 1990. p.601-653.
- PIRKLE, H.; THEODOR, I. Structure of thrombin like snake venom proteinases. In: STOCKER, K.F. **Medical use of snake venom protein**. Boca Raton, USA, CRC Press Inc., 1990, p.201-211.
- RAW, I.; ROCHA, M.C.; ESTEVES, M.I.; KAMIGUTI, A.S. Isolation and characterization of a thrombin-like enzyme from the venom of *Crotalus durissus terrificus*. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 19, p. 333-338, 1986.
- REID, H.A.; CHAN, K.E. The paradox in therapeutic defibrination. **Lancet**, v.1, p.485,486, 1968.
- RIBELA, M.T.C.P.; MURATA, Y.; MORGANT, L.; TONIOLO, D.; BARTOLINI, P. The use of recombinant human growth hormone for radioiodination and standard preparation in radioimmunoassay. **J.Immunol.Meth.**, v.159, p.269-274, 1993.
- RODRIGUES-SIMIONI, L.; HAWGOOD, B.J.; SMITH, I.C.H. Properties of the early phases of crotoxin poisoning at frog neuromuscular junctions. **Toxicon**, v.28, n.12, p.1479-1489, 1990.

- ROMANO-HOGE, S.A.R.W.L.; Principais serpentes de interesse médico. Reconhecimento. Distribuição geográfica no continente americano. SOERENSEN, B. **Animais peçonhentos**. Rio de Janeiro/São Paulo, Atheneu, 1990. p.1-45.
- ROSENFELD, G.; KELEN, M.A. Cross neutralization of the coagulant activity of some snake venoms by antivenins. *Toxicon*, v.4, p.7-15, 1966.
- SANCHEZ, E.F.; FREITAS, T.V.; FERREIRA-ALVES, D.L.; VELARDE, G.; DINIZ, C.R. Biological activities of venoms from South American snakes. *Toxicon*, v.30, n.1, p.95-103, 1992.
- SANCHEZ, E.F. & MAGALHÃES, A. Purification and partial characterization of na L-aminoacid oxidase from bushmaster snake (surucucu pico de jaca) *Lachesis muta muta*. **Braz.J.Med.Biol.Res.**, v.24, n.3, p. 249-269, 1991.
- SANCHEZ, E.F., MAGALHÃES, A., DINIZ, C. R. Purification of the hemorrhagic factor (LHF I) from the venom of the Bushmaster snake, *Lachesis muta muta*. *Toxicon*, v.25, p. 611-619, 1987.
- SANCHEZ, E.F., MAGALHÃES, A., MANDELBAUM, F. R. , DINIZ, C. R. Purification and characterization of the hemorrhagic factor II from the venom of the Bushmaster snake *Lachesis muta muta*. **Biochimica et Biophysica Acta.**, v.1074, p. 347-356, 1991a.
- SANCHEZ, E.F.; DINIZ, C.R. & RICHARDSON, M. The complete amino acid sequence of the haemorrhagic factor LHFII, a metalloproteinase isolated from the venom of the bushmaster snake (*Lachesis muta muta*). **FEBS**, v.282, n.1, p.178-182, 1991b.
- SEKI, C.; VIDAL, J.C.; BARRIO, A. Purification of gyroxin from a South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*) venom. *Toxicon*, v.18, p. 235-247, 1980.
- SILVEIRA, A.M.V.; MAGALHÃES, A.; DINIZ, C.R.; OLIVEIRA, E.B. Purification and properties of the thrombin-like enzyme from the venom of *Lachesis muta muta*. **Int. J. Biochem.** v. 21, n.8, p. 863-871, 1989.
- STOCKER, K.F. Snake venom proteins affecting hemostasis and fibrinolysis. In: STOCKER, K.F. **Medical use of snake venom proteins**. Boston, USA, CRC Press., 1990, p.97-159.
- STOCKER, K. & BARLOW, G.H. In: L.LORAND. **Methods in Enzymology- vol.45**. New York, USA, Academic Press. 1976, p.214-222.

- TAN, N.H.; PONNUDURAI, G. Biochemical characterization of snake venoms. In: GOPALAKRISHNAKONE, P.; TAN, C.K. **Recent Advances in Toxinology Research**. Kent Ridge, Singapore, Venom & Toxin Research Group, National University of Singapore. 1992, p. 210-258.
- TORRES R., J.R.; TORRES A., M.A.; ARROYO-PAREJO, M.A. Coagulation disorders in Bushmaster envenomation. **Lancet**, v.346, p.449-450, 1995.
- TRONCONE, L.R.P.; LEBRUN, I.; MAGNOLI, F. & YAMANE, T. Biochemical and pharmacological studies on a lethal neurotoxic polypeptide from *Phoneutria Nigriventer* spider venom. **Neurochem. Res.** n.20, v.7; p.879-883, 1995.
- TU, A.T.; JAMES,G.P. & CHUA,A.. Some biochemical evidence in support of the classification of venomous snakes. **Toxicon**, v.3; p. 5-8, 1965.
- VÉCSEI,L. & BEAL,M.F. Comparative behavioral and pharmacological studies with centrally administered kynurenine and kynurenic acid in rats. **Eur. J. Pharmacol.**, v.196, p.239-246, 1991.
- VITAL BRAZIL. Nova contribuição ao estudo do envenenamento ofídico. **Rev. Med. S. P.**, v.XII, n.21, p. 415-425,1909.
- WILLCOX, B.J., POULIN, P., VEALE, W.L., PITTMANM Q.J. Vasopressin-induced motor effects: localization of a sensitive site in the amygdala. **Brain Res.**, v.596, n. 1-2, p. 58-64, 1992.
- WILLIS Jr., W.D. The nervous system: motor control by cerebral cortex, cerebellum and basal ganglia. In: FARREL,R. & LEVY,M.N. **Physiology**. Missouri, USA. Mosby Year Book Inc., 1993, p.225-243.
- WURPEL,J.D.; DUNDORE,R.L.; BARBELLA,Y.R.; BALABAN,C.D.; KEIL,L.C. & SEVERS,W.B. Barrel rotation evoked by intracerebroventricular vasopressin injections in conscious rats. I. Description and general pharmacology. **Brain Res.**, v.365, p.21-29, 1986a.
- WURPEL,J.D.; DUNDORE,R.L.; BARBELLA,Y.R.; BALABAN,C.D.; KEIL,L.C. & SEVERS,W.B. Barrel rotation evoked by intracerebroventricular vasopressin injections in conscious rats. II. Visual/ vestibular interactions and efficacy of antiseizure drugs. **Brain Res.**, v.365, p. 30-41, 1986b.

- YARLEQUÉ, A.; CAMPOS, S.; ESCOBAR, E.; LAZO, F.; SANCHEZ, N.; HYSLOP, S.; MARSH, N.A.; BUTTERWORTH, P.J.; PRICE, R.G. Isolation and characterization of a fibrinogen-clotting enzyme from venom of the snake *Lachesis muta muta* (Peruvian Bushmaster). **Toxicon**, v.27, n.11, p. 1189-1197, 1989.
- YARLEQUE,A.; CAMPOS,S.; ESCOBAR,E.; LAZO,F.; SANCHEZ,N. HYSLOP,S.; MARSH,N.A. BUTTERWORTH,P.J. & PRICE,R.G.. Isolation and characterization of a fibrinogen-clotting enzyme from venom of the snake *Lachesis muta muta* (Peruvian bushmaster). **Toxicon** , v.27, n.11, p. 1189-1197, 1989.
- YOSHIZAWA,T.; SHINMI,O.; GIAID,A.; YANAGISAWA,M.; GIBSON,S.J.; KIMURA,S.; UCHIYAMA,Y.; POLAK,J.M.; MASAKI,T. & KANAZAWA,I. Endothelin: a novel peptide in the posterior pituitary system. **Science**, v.247, p.462-464, 1990.