

BR771-056



ASPECTOS IMUNOQUÍMICOS DA CROTOXINA E SUAS SUBUNIDADES

Atsuko Kumagai Nakazone

**DISSERTAÇÃO E TESE - IEA 112
IEA - DT - 112**

ABRIL/1979

CONSELHO DELIBERATIVO

MEMBROS

Klaus Reinach – Presidente
Roberto D'Utra Vaz
Helcio Modesto da Costa
Ivano Humbert Marchesi
Admar Cervellini

PARTICIPANTES

Regina Elisabete Azevedo Beretta
Flávio Gori

SUPERINTENDENTE

Rômulo Ribeiro Pieroni

ASPECTOS IMUNOQUÍMICOS DA CROTOXINA E SUAS SUBUNIDADES

Atsuko Kumagai Nakazono

**Tese para obtenção do Título de "Doutor em Ciências -
Área de Bioquímica" - Orientador Prof. Dr. José Moura
Gonçalves. Apresentada e defendida em 22 de Junho de
1978, no Instituto de Química da Universidade de São Paulo.**

Série DISSERTAÇÃO E TESE IEA

INIS Categories and Descriptors

C45

C11

Immunology

Toxins

Proteins

Venoms

Nota: A redação, ortografia e conceitos são de responsabilidade dos autores.

SUMÁRIO

	Página
1 – INTRODUÇÃO E PROPÓSITO	1
A – Considerações Gerais sobre Crotoxina, Fosfolipase A, Crotapotin e Crotamina	1
B – Interação Proteína-Proteína. Aspectos Imunológicos	3
C – Modificadores Estruturais: Bloqueio de Alguns Aminoácidos Iodação e Irradiação dos Antígenos	4
2 – MATERIAL E MÉTODOS	5
A – Material Biológico	5
B – Obtenção de Crotapotin, Fosfolipase A e Crotamina	5
1 – Purificação	5
1.1 – 1ª Etapa: Filtração por Exclusão Molecular	8
1.2 – 2ª Etapa: Cromatografia de Troca Iônica – Trocadora de Cátions	8
1.3 – 3ª Etapa	8
1.3.1 – Cromatografia de Crotapotin por Troca Iônica – Trocadora de Ânions	8
1.3.2 – Filtração por Exclusão Molecular	8
1.4 – 4ª Etapa	8
1.4.1 – Recromatografia de Fosfolipase A por Troca Iônica – Trocadora Catiônica	9
1.4.2 – Filtração por Exclusão Molecular	9
1.5 – 5ª Etapa	9
1.5.1 – Cromatografia de Troca Iônica – Trocadora de Cátions	9
1.5.2 – Filtração por Exclusão Molecular	9
2 – Análise de Aminoácidos	9
2.1 – Padrão de Aminoácidos	9
2.2 – Crotapotin, Fosfolipase A e Crotamina	9
3 – Eletroforese em Gel de Poliacrilamida	10
3.1 – Eletroforese de Crotapotin	10
3.2 – Eletroforese de Fosfolipase A e Crotamina	10
4 – Espectrofotometria	10
4.1 – Determinação do Conteúdo Protéico e Coeficiente de Absorção Molar	10
4.2 – Espectros de Absorção	10
5 – Determinação de DL ₅₀ das Proteínas Purificadas	10
6 – Determinação de Grupos Sulfidrílicos Livres	11
7 – Determinação da Atividade Enzimática de Fosfolipase A	11
8 – Determinação da Presença do Fator de Coagulação	12

C – Reações Imunológicas	12
1 – Reação de Crotapotin, Fosfolipase A e Crotoxina (Crotapotin + Fosfolipase A) com Soro Anticrotático do Instituto Butantan	12
1.1 – Reação de Precipitina Segundo Kabat	12
1.2 – Imunodifusão Dupla Radial	12
2 – Reação de Precipitação do Produto de Interação Crotapotin – Fosfolipase A	12
3 – Reações de Absorção	13
4 – Reação de Crotapotin ¹²⁵ I com Soro Anticrotático. Eletroforese em Papel	13
D – Obtenção de Soros Específicos: Anticrotapotin, Antifosfolipase A e Anticrotoxina	14
E – Reações de Crotapotin, Fosfolipase A e Crotoxina com Soros Específicos	14
1 – Reações com Soros Específicos Correspondentes	14
2 – Reações Cruzadas	15
3 – Reações de Absorção	15
F – Interação Crotapotin – Crotamina	15
G – Bloqueio de Epsilon Amino Grupos das Lisinas de Crotapotin e Fosfolipase A. Interações	16
1 – Carbamilação dos Epsilon Amino Grupos das Lisinas	16
2 – Análise das Proteínas Carbamiladas	16
2.1 – Espectrofotometria	16
2.2 – Análise de Aminoácidos da Crotapotin e Fosfolipase A Carbamiladas em Analisador BECKMAN	16
3 – Estudos com Proteínas Carbamiladas	16
3.1 – Imunodifusão	16
3.2 – Reação de Precipitação	17
3.3 – Hemólise Indireta da Fosfolipase A Carbamilada	17
H – Bloqueio de Argininas de Crotapotin e Fosfolipase A. Interações	17
1 – Reação de Fosfolipase A com Fenilglioal	17
1.1 – Determinação da Atividade Enzimática	17
1.2 – Determinação da Curva de Absorção	17
1.3 – Determinações Imunológicas	17
1.4 – Determinação de Argininas Bloqueadas	17
2 – Reação da Crotapotin com Fenilglioal	18
2.1 – Reações Imunológicas de Crotapotin Tratada com Fenilglioal	18
2.2 – Estudo Espectrofotométrico	18
I – Tirocinas na Interação Crotapotin – Fosfolipase A	18
1 – Marcação da Crotoxina com ¹³¹ INa	18
2 – Purificação da Crotoxina ¹³¹ I	19
3 – Fracionamento da Crotoxina ¹³¹ I em Coluna de DEAE Sephadex	19
4 – Determinação da Radioatividade Específica dos Produtos Marcados	19

	Página
5 – Reações Imunológicas com as Proteínas Radioiodadas	19
6 – Atividade Enzimática da Fosfolipase A ¹³¹ I	20
J – Irradiação de Crotopotín e Fosfolipase A	20
1 – Imunodifusão em Placas de Agarose	20
2 – Reações de Precipitação em Solução	20
3 – Análise Espectrofotométrica	20
4 – Atividade Enzimática	20
3 – RESULTADOS	20
A – Purificação das Toxinas do Veneno de Cascavel	20
B – Análises para Confirmar a Pureza de Crotopotín, Fosfolipase A e Crotoxina Obtidas ..	22
1 – Análise de Aminoácidos	22
2 – Eletroforese em Gel de Poliacrilamida	22
3 – Espectrofotometria	22
4 – Determinação da DL ₅₀	22
5 – Grupos Sulfidrílicos Livres na Crotoxina, Crotopotín e Fosfolipase A	31
6 – Atividade Enzimática da Fosfolipase A	31
7 – Fator Coagulante	31
C – Reações de Interação de Crotopotín, Fosfolipase A e Crotoxina com Soro Anticrotálico do Instituto Butantan	31
D – Interação de Crotopotín, Fosfolipase A e Crotoxina com Soros Específicos	39
E – Interação Crotopotín-Crotoxina	39
F – Carbamilação dos Epsilon Amino Grupo das Lisinas de Crotopotín e Fosfolipase A. Interações	39
G – Bloqueio de Argininas de Crotopotín e Fosfolipase A. Interações	47
H – Tirosinas na Interação Crotopotín-Fosfolipase A	47
I – Crotopotín e Fosfolipase A Irradiadas com ⁶⁰ Co	59
4 – DISCUSSÃO	59
A – Purificação das Proteínas. Interações	59
B – Carbamilação de Crotopotín e Fosfolipase A. Interações	63
C – Modificação de Argininas de Crotopotín e Fosfolipase A. Interações	64
D – Tirosinas na Interação Crotopotín e Fosfolipase A	66
E – Irradiação de Crotopotín e Fosfolipase A	66
5 – CONCLUSÕES	67
APÊNDICE	67

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 74

ASPECTOS IMUNOQUÍMICOS DA CROTOXINA E SUAS SUBUNIDADES

Atsuko Kumagai Nakazone

RESUMO

A partir do veneno bruto de *Crotalus durissus terrificus*, foram purificadas a crotamina, a crotóxina e suas subunidades fosfolipase A e crotapotin.

Estudos de interação, utilizando soro anticrotático do Instituto Butantan, revelaram que a crotóxina é formada de interação crotapotin-fosfolipase A na proporção molar 1:1. O emprego de crotapotin marcada com iodo-125 indica a formação de complexo solúvel com soro anticrotático.

Soros específicos produzidos em coelhos contra crotapotin, fosfolipase A e crotóxina (crotapotin + fosfolipase A) demonstram, através de reações imunológicas de precipitação que: crotapotin é antigênica e produz soro anticrotapotin; crotapotin e fosfolipase A apresentam um ou mais determinantes antigênicos semelhantes ou comuns; o soro anticrotóxina reage com crotapotin e fosfolipase A, mas a interação crotapotin-fosfolipase A para formar crotóxina deve mascarar determinantes antigênicos.

A crotamina, proteína fortemente básica, interage com crotapotin na proporção 1:1 sem mascarar determinantes antigênicos de crotapotin apresentando, nessa proporção, máxima precipitação com o soro anticrotapotin.

As lisinas de crotapotin e fosfolipase A modificadas através de carbemilação levam à queda de atividade imunológica de crotapotin, sugerindo que uma lisina possa participar da determinante antigênica de mesma; a carbemilação de duas lisinas de fosfolipase A, não alterando nem a atividade enzimática nem a imunológica da mesma.

O bloqueio de grupos guanidinos das argininas de crotapotin e fosfolipase A com fenilgloxiol a diferentes valores de pH demonstra que: a atividade enzimática da fosfolipase A é inativada a pH 8,0. Em pH 6,0, mesmo com tempo prolongado de reação, as atividades enzimática e imunológica permanecem inalteradas; as argininas de crotapotin não devem estar localizadas nos determinantes antigênicos da mesma.

A crotóxina radioiodada com ^{131}I Na e passada em DEAE Sephadex A-25 serviu para estudo de tirosinas de crotapotin e fosfolipase A. Há tirosinas em fosfolipase A mais radioiodáveis do que tirosinas de crotapotin.

A irradiação de crotapotin e fosfolipase A, em solução aquosa, com bomba de ^{60}Co , sob taxas de doses variando de 20 a 500 Krad, determina: modificação no espectro de absorção em ultravioleta; diminuição de atividade enzimática da fosfolipase A em função da dose de irradiação; permanência de atividade imunológica de crotapotin e fosfolipase A.

1 - INTRODUÇÃO E PROPÓSITO

A - Considerações Gerais sobre Crotóxina, Fosfolipase A, Crotapotin e Crotamina

A crotóxina, princípio neurotóxico do veneno de *Crotalus durissus terrificus*, foi isolada pela primeira vez em 1938 sob forma cristalizada por SLOTTA e FRAENKEL-CONRAT⁽⁶⁴⁾, e por longo

tempo foi considerada protótipo de proteína homogênea, cristalizável, com propriedades neurotóxicas e fosfolipásicas.

NEWMANN e HABERMANN⁽⁵⁰⁾, em 1955, prepararam uma fração tóxica com baixa atividade fosfolipásica e acharam que a verdadeira toxina era a crotactina, porém essa substância nunca mais foi conseguida com grande pureza e quantidades suficientes para confirmar o fato.

HABERMANN⁽²⁸⁾, em 1957, purificou a fosfolipase A com baixa toxicidade a partir da crottoxina altamente tóxica, por meio de cromatografia em alumina, com recuperação da atividade enzimática de 100%, indicando que houve remoção de "inibidor" simultaneamente presente no veneno. Face a esta evidência e a confirmação de que a toxicidade e atividade enzimática de outros venenos (abelhas e cobras) eram atribuídas a diferentes constituintes, HABERMANN⁽²⁷⁾, em 1968, retomou as investigações daquela "enzima tóxica" de SLOTTA e FRAENKEL-CONRAT⁽⁶⁴⁾.

Data de 1971 os trabalhos de HABERMANN e RUBSAMEN⁽²⁹⁾, BREITHAUPT et al⁽¹⁰⁾, HENDON e FRAENKEL-CONRAT⁽³¹⁾ sobre as primeiras separações de crottoxina em várias frações utilizando CM celulose ou DEAE celulose. Os dois primeiros trabalhos citam duas frações principais identificadas como: uma proteína fortemente básica, fosfolipase A, apresentando toxicidade relativamente baixa; uma proteína ácida destituída de qualquer atividade nos testes realizados. A recombinação das duas frações restabelece a toxicidade da crottoxina. Porém, "in vitro", o potenciador da toxidez inibe a ação enzimática da fosfolipase A. A proteína ácida foi denominada crotapotin que significa: substância do veneno de *Crotalus* que potencia a toxidez e inibe a atividade enzimática da fosfolipase A.

HENDON e FRAENKEL-CONRAT⁽³¹⁾ estabeleceram o peso molecular das proteínas componentes da crottoxina através de determinação da composição em aminoácidos, após purificação em DEAE celulose, constatando valores de 8.400 para crotapotin e 13.000 para fosfolipase A. Os autores acharam que a máxima atividade é recuperada quando se junta crotapotin mais duas vezes o excesso de fosfolipase A, correspondendo à composição de crottoxina, frisando a possibilidade de haver fenômeno cooperativo de duas proteínas não tóxicas para produzir a neurotoxicidade da crottoxina.

RUBSAMEN et alii⁽⁵⁹⁾, em 1971, por cromatografia da crottoxina em CM celulose, chegaram também a separar uma proteína fortemente básica e uma proteína ácida verificando que fosfolipase é aproximadamente 5 vezes menos tóxica que a crottoxina, com atividade enzimática 4 vezes superior. A crotapotin é desprovida de toxidez e de atividade fosfolipásica, contudo sua combinação com fosfolipase A pode aumentar até 12 vezes a toxidez desta porém inibindo a atividade enzimática.

Existem discrepâncias na literatura quanto a valores de peso molecular dessas frações protéicas. BREITHAUPT et al⁽¹⁰⁾, em 1972, considera o peso molecular de crotapotin = 14.000 e de fosfolipase A = 16.000. BREITHAUPT et alii⁽¹²⁾, em 1974, purificaram as frações da crottoxina até homogeneidade obtendo peso molecular e ponto isoelétrico para crotapotin, 8.900 e 3,4; e para fosfolipase A, 15.800 e 9,7, respectivamente.

Os dados obtidos por filtração em gel revelaram que o monômero de crotapotin, de peso molecular 8.900, consiste de pelo menos duas cadeias peptídicas de aproximadamente 4.000, unidas por ligações dissulfídicas, e a fosfolipase A apresenta uma simples cadeia polipeptídica com tendência a formar agregados dímeros, trímeros e tetrâmeros, em solução de baixa força iônica. Não há grupos sulfidrílicos livres detectáveis nessas proteínas. Após redução, carboxamidometilação e filtração em gel, os autores⁽¹²⁾ concluíram que a crotapotin é formada por quatro cadeias: A₁, A₂, B e C, sendo as duas últimas não detectáveis por absorção a 280 nm porque tirosinas e triptofanos se localizam nas cadeias A. As quatro cadeias não são capazes de isoladamente potencializar a toxicidade de fosfolipase A, nem inibir a atividade enzimática da mesma. Os autores verificaram a existência de sete pontes S-S em fosfolipase A. Na crotapotin nativa, somente o aminoácido terminal da cadeia A foi detectável, mostrando ser resíduo de serina, o que confirma o achado de FRAENKEL-CONRAT e SINGER⁽²⁰⁾, em 1956, que

descreveram o resíduo amino terminal da fração solúvel em água do derivado da crotóxina como sendo serina.

BREITHAUPT et alii⁽¹¹⁾, em 1975, e BREITHAUPT⁽⁹⁾, em 1976, isolaram três fosfolipases A de crotóxina: duas básicas, com mesmo ponto isoelétrico, mesma atividade enzimática, mesmas propriedades imunológicas e mesma toxicidade; a terceira, ácida, com atividade enzimática igual às básicas, porém, não tóxica e com atividade antigênica diferente. Somente as fosfolipases básicas de *Crotalus* têm sido descritas como formadoras de complexo com crotapotin que potencia a toxidez da enzima.

No que diz respeito a sequenciação de aminoácidos de crotóxina e suas subunidades, somente o trabalho de OMORI-SATO et alii⁽⁶⁾ de 1975 mostra em breve comunicação uma análise parcial da fosfolipase A.

HENDON e FRAENKEL-CONRAT⁽³²⁾, em 1976, discutem a alta neurotoxicidade de *Crotalus durissus terrificus* sugerindo ser resultado do sinergismo entre as proteínas da crotóxina. Crotapotin e fosfolipase A reassociam entre pH 4 e pH 7, restituindo a plena toxicidade da toxina, produzindo o mesmo efeito que quando injetadas separadamente. Os dados sugerem que a neurotoxicidade não é dependente da formação do complexo, embora se admita a formação do complexo "in vivo".

A crotamina foi isolada por GONÇALVES e VIEIRA⁽²⁵⁾, em 1950, e estudada do ponto de vista químico por GONÇALVES e seu grupo^(22,23,21). A crotamina é uma toxina polipeptídica altamente básica, de ponto isoelétrico 10,3, com grupo amino terminal tirosina, 3 pontes sulfidril e ausência de grupos tióis^(21,24) e está presente em venenos de cascavéis de certas regiões. Com o progresso da análise automatizada de composição de ácidos aminados por Moore e Stein, as discrepâncias quantitativas de resultados anteriores foram corrigidas, possuindo a crotamina 44 resíduos de ácidos aminados e peso molecular 4.890. Recentemente, a crotamina foi estudada do ponto de vista farmacológico por CHEYMOL et alii^(15,16) e BRAZIL et alii⁽⁸⁾. A sequenciação dos aminoácidos da crotamina foi realizada por LAURE⁽⁴⁰⁾.

B – Interação Proteína-Proteína. Aspectos Imunológicos

Os venenos animais, inclusive os ofídicos, são proteínas fortemente antigênicas que produzem anticorpos capazes de neutralizar os efeitos tóxicos correspondentes.

A partir de 1922 reconheceu-se que toxina e antitoxina eram capazes de precipitar quando em proporções ótimas, o que levou RAMON a desenvolver um método "in vitro" para dosagem das antitoxinas. O estudo quantitativo das reações de precipitação específica iniciado em 1929 por HEILDEBERG e colaboradores, introduzindo método analítico preciso, foi o marco inicial da imun química moderna. As reações toxina-antitoxina revelam curvas inteiramente semelhantes às obtidas com outros sistemas precipitantes anti-proteínas dando curvas do "tipo cavalo" ou "tipo coelho".

No soro de cavalo, animal geralmente utilizado para a produção de soros antitóxicos em larga escala, como no caso do soro anticrotálico do Instituto Butantan, as antitoxinas estão associadas a imunoglobulinas 7S das seguintes classes: no início da imunização, a IgG (mobilidade gama 2); no fim da hiperimunização a YG (mobilidade gama 1) denominada IgGT⁽⁷⁾. Enquanto as antitoxinas IgG dão curvas de precipitação do "tipo coelho", as antitoxinas IgGT dão flocação de Ramon, com curva tipicamente campanular, exibindo zona nítida de excesso de antígeno. No entanto, em coelho, a antitoxina está sempre associada a IgG dando curvas de precipitação do "tipo coelho".

As primeiras reações quantitativas entre frações do veneno crotálico (crotóxina) e o soro do Butantan datam de 1945 e 1947, realizadas por BIER^(5,6), GONÇALVES e DEUTSCH⁽²³⁾, fizeram os primeiros estudos qualitativos das frações protéicas imunologicamente ativas, por difusão em agar, utilizando soro anticrotálico do Butantan.

Quanto a estudos mais profundos referentes a antigenicidade das frações crotapotin, fosfolipase A e crotoxina pouco consta na literatura. BREITHAUPT et alii^(11,12), em 1974 e 1975, citam somente reações de difusão em placa de agar e imunoeletroforese de fosfolipase A e crotapotin. Como resultado dessas investigações, estabeleceu-se que fosfolipase A pura forma linha de precipitação e que crotapotin não precipita com soro anticrotálico do Instituto Butantan. Nenhum trabalho se refere à imunização de animais contra as proteínas componentes da crotoxina.

Nosso propósito volta-se no sentido de caracterizar o comportamento imunológico da interação crotapotin-fosfolipase A, verificando a atividade imunológica de ambas proteínas e a possível existência de determinantes antigênicos obscurecidos no processo de interação. Com esse intuito, foram preparados soros específicos contra as sub-unidades da crotoxina e realizados os ensaios de interação correspondentes.

C – Modificadores Estruturais: Bloqueio de Alguns Aminoácidos, Iodação e Irradiação dos Antígenos

Dentre uma gama enorme de técnicas para modificação química de proteínas, abrangendo bloqueio de quase todos os aminoácidos, o estudo mais enfiatizado é o que relaciona estrutura-função de enzimas. O mesmo pode ser aplicado com sucesso às investigações voltadas a toxicidade-estrutura de toxinas. Quanto ao estudo da interação antígeno-anticorpo devido a bloqueios nos determinantes antigênicos, tem-se uma longa literatura principalmente do grupo de ATASSI^(1,2,3,38,55).

Cobrotoxina é a toxina mais estudada: assim, a modificação do grupo amino livre da lisina e N-terminal com fluoresceína feita por YANG et alii⁽⁸⁰⁾, em 1967, não alterou a antigenicidade embora tenha diminuído a toxicidade. Em 1970, YANG⁽⁷⁹⁾ fez um estudo relacionando estrutura-atividade da mesma toxina. No nosso estudo, bloqueou-se o ε-amino grupo das lisinas de crotapotin, fosfolipase A, crotoxina e crotamina com piridoxal 5'-fosfato^(17,69) porém sem obter dados conclusivos, pois fosfolipase A, crotoxina e crotamina precipitaram em presença do bloqueador. O tratamento com cianato para carbamilar os ε-amino grupo das lisinas, seguindo o método de STARK^(65,66,67), STARK et alii⁽⁶⁸⁾ e NAKAGAWA et alii⁽⁴⁷⁾ é um dos processos adequados para modificação de proteínas. Os ε-amino grupo das lisinas, dois na crotapotin e nove na fosfolipase A, devido a sua grande reatividade, podem representar papel importante tanto na formação da molécula de crotoxina como na interação das subunidades com seus soros específicos.

Segundo os trabalhos de TU et alii^(74,75), modificações nas argininas não alteraram a toxicidade das toxinas a e b de *Laticauda semi fasciata*. A alteração química dos resíduos de arginina e conseqüente inativação seletiva da ribonuclease A com fenilgloxal⁽⁷²⁾ e trabalhos de YANG et alii⁽⁸¹⁾ são métodos simples e eficientes para bloquear guanidino grupo das argininas.

As tirosinas da cobrotoxina também foram modificadas com tetranitrometano e a atividade tóxica do veneno estudada por CHANG et alii⁽¹³⁾ e CHICHEPORTICHE et alii⁽¹⁷⁾. Há modificações nas tirosinas da crotoxina, por iodação empregando ¹³¹INa⁽⁴³⁾, e embora não haja alteração da atividade antigênica nas proteínas radioiodadas^(18,32,41,43), nosso propósito é averiguar a participação da tirosina na interação crotapotin-fosfolipase A, através da utilização de traçador radioativo.

Os danos causados pela radiação gama sobre proteínas é um dos primeiros e mais estudados problemas da radiobiologia. A irradiação de proteínas, em estado sólido ou em solução, mostra mudanças químicas e propriedades físico-químicas afetando estruturas primária, secundária e terciária. Estas modificações estão evidentemente ligadas às alterações de atividade enzimática, hormonal e tóxica, bem como das propriedades imunológicas, estudadas após irradiação^(4,42,63). SUNDARAN et alii⁽⁷⁰⁾ verificaram os efeitos da radiação sobre o veneno de *Naja naja* e sobre o seu soro polivalente. LAUHATIRANDA et alii⁽³⁹⁾ verificaram as modificações causadas por irradiação com ⁶⁰Co sobre veneno de cobra da Tailândia, no sentido de estudar as reações imunológicas. De todas as investigações realizadas é curioso e importante assinalar que as propriedades antigênicas de enzimas, hormônios

protéicos ou venenos são mais radio-resistentes do que suas funções biológicas. Esses interessantes dados da literatura nos levaram a investigação de ordem primária e simples; a irradiação de crotapotin e fosfolipase A serviu como meio alterador da interação protefna-protefna nos nossos estudos.

2 – MATERIAL E MÉTODOS

A – Material Biológico

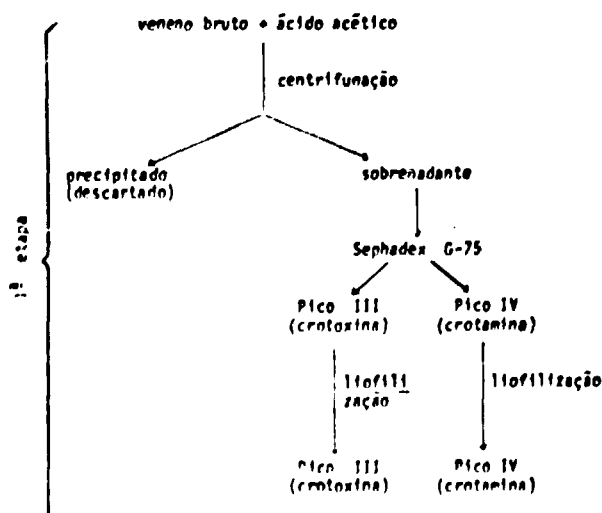
- Veneno bruto de *Crotalus durissus terrificus*, seja crotamina positiva ou crotamina negativa, foi adquirido comercialmente de fornecedores particulares.
- Soro anticrotálico, produzido no Instituto Butantan, foi comercialmente adquirido.
- Soros específicos anticrotapotin, antifosfolipase A, anticrotoxina (crotapotin + fosfolipase A) foram obtidos por nós através da imunização de coelhos (Nova Zelândia, idade de 8 meses, 3 a 4 Kg de peso), conforme descrição posterior.

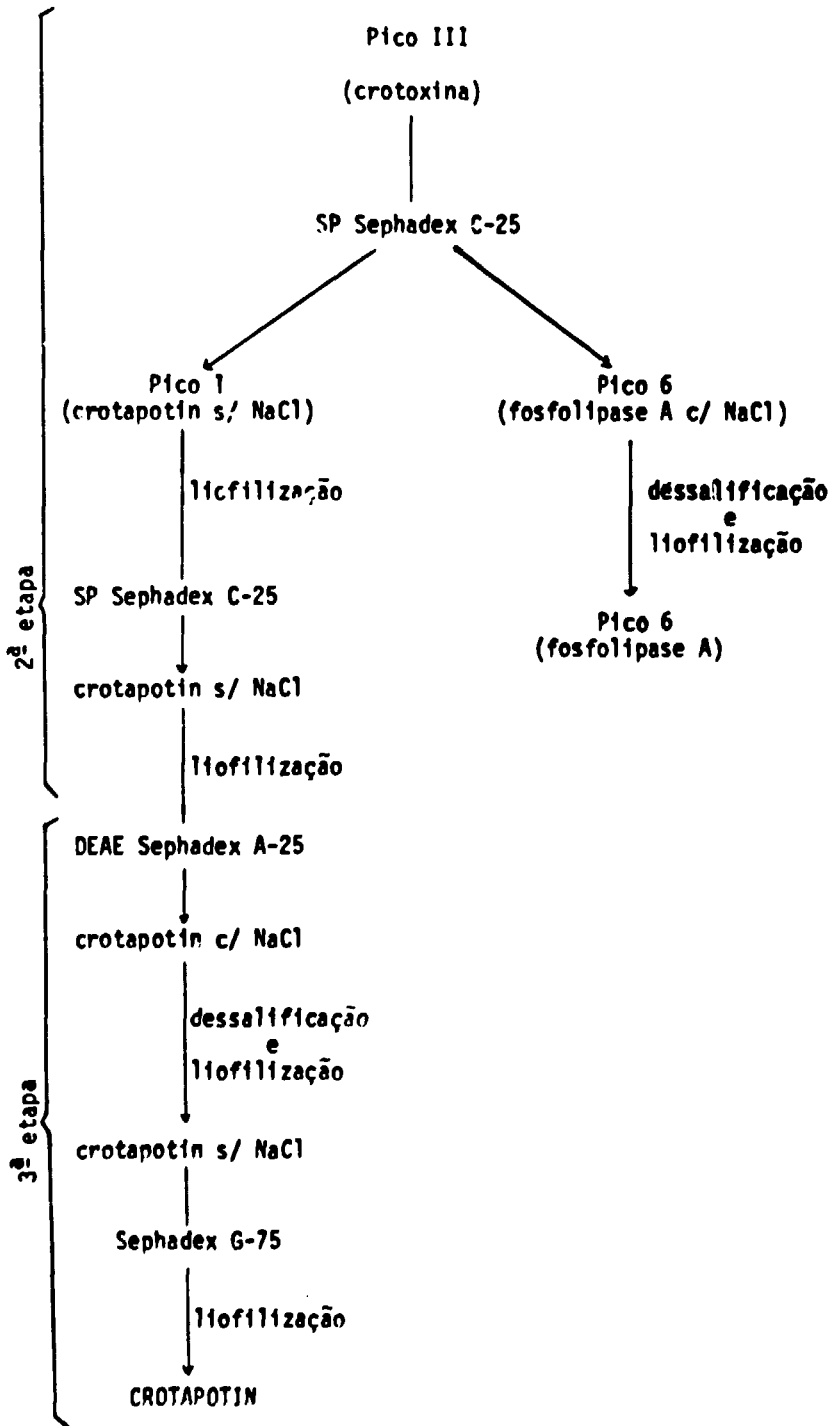
B – Obtenção de Crotapotin, Fosfolipase A e Crotamina

1 - Purificação

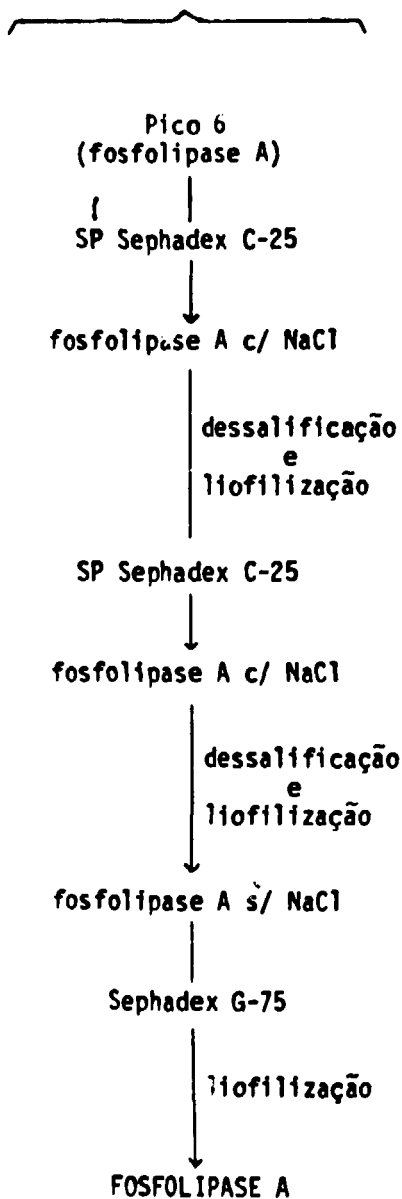
Para obtenção das frações protéicas necessárias ao desenvolvimento deste trabalho foi utilizada uma partida de 12 g do veneno bruto crotamina positiva, e obedeceu-se o seguinte esquema de purificação, introduzindo algumas modificações nas técnicas empregadas por HENDON et al⁽³¹⁾, BREITHAUPT et alii⁽¹²⁾, RUBSAMEN et alii⁽⁵⁹⁾:

ESQUEMA DE PURIFICAÇÃO

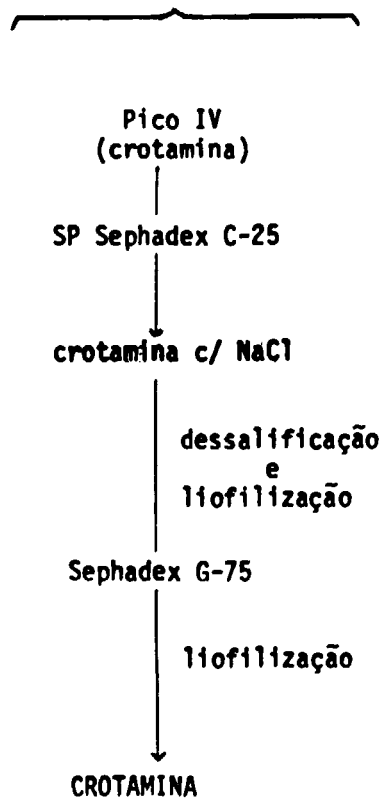




4ª etapa



5ª etapa



1.1 – 1a. Etapa: Filtração por Exclusão Molecular

300 mg de veneno bruto seco foram dissolvidos em 15 ml de ácido acético 0,1 M e centrifugados a 5000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi passado através de uma coluna de Sephadex G-75 (Pharmacia, Uppsala, Sweden) previamente entumecido e equilibrado em tampão formiato de amônio pH 4,0, 0,1 M e livre de ar, de 4,1 cm X 35 cm. A eluição foi feita com o próprio tampão formiato, fluxo 45 ml/hora, coletando 10 ml por tubo em coletor de frações refrigerado (Gilson Medical Electronics, Wiscosin), acompanhada de monitoração a 280 nm e graficada em registrador.

O material do pico III correspondente a crotoxina e do pico IV correspondente a crotamina foram separados e liofilizados em Liofilizador Virtis, modelo 10-100, Gardiner, N. Y.

1.2 – 2a. Etapa: Cromatografia de Troca Iônica – Trocadora de Cátions

50 mg do material do pico III foram dissolvidos em 10 ml de tampão formiato pH 4,0, 0,1 M e passados através da coluna de SP Sephadex C-25 (Pharmacia, Uppsala, Sweden) previamente entumecido em solução 0,5 M de formiato de amônio, equilibrado a seguir em tampão formiato 0,1 M, pH 4,0, livre de ar, de 0,9 cm X 30 cm. Um gradiente linear de NaCl de 0 a 3 M em tampão formiato pH 4,0, 0,1 M foi utilizado para eluição da amostra. Um conjunto Ultrograd da LKB ou um sistema de agitação da Beckman serviram para fazer um gradiente homogêneo de acordo com a necessidade, coletando amostras de 15 em 15 minutos no sistema coletor refrigerado Gilson.

O pico 1, crotapotin, foi coletado antes de ligar o gradiente. O material correspondente ao pico 6, fosfolipase A, foi juntado e dessalificado em sacos de diálise, previamente tratados com uma mistura piridina-anidrido acético 1:1 para diminuir a porosidade, contra água deionizada até teste negativo para íons cloreto por meio da reação com solução de nitrato de prata.

O material do pico 1 e do pico 6 dessalificados foram liofilizados e recromatografados, separadamente, em colunas de SP Sephadex C-25 segundo o procedimento acima descrito.

1.3 – 3a. Etapa:

1.3.1 – Cromatografia de Troca Iônica-Trocadora de Ânions

50 mg do material do pico 1, crotapotin, foram dissolvidos em 10 ml tampão formiato pH 4,0, 0,1 M e passados através de uma coluna de DEAE Sephadex A-25, previamente entumecido em solução 0,5 M de formiato de amônio e equilibrado em tampão formiato pH 4,0, 0,1 M, livre de ar, de 0,9 X 30 cm. Foi utilizado um gradiente de NaCl de 0 a 3 M em tampão formiato para eluir o pico correspondente a crotapotin. O material coletado foi dialisado contra água deionizada até teste negativo para Cl^- e liofilizado.

1.3.2 – Filtração por Exclusão Molecular

Para garantir a homogeneidade e dessalificação da crotapotin, 100 mg do produto acima preparado foram dissolvidos em 10 ml de tampão formiato pH 4,0, 0,1 M e passados por uma coluna de Sephadex G-75 equilibrado com mesmo tampão, de 1,5 cm X 35 cm. A eluição com tampão formiato mostrou somente um pico protéico a 280 nm. A crotapotin assim purificada foi liofilizada e dessecada até peso constante.

1.4 – 4a. Etapa:

1.4.1 – Recromatografia de Fosfolipase A, por Troca Iônica-Trocadora Catiônica

50 mg do material do pico 6 foram dissolvidos em tampão formiato pH 4,0, 0,1 M e passados através da coluna de SP Sephadex C 25, 0,9 cm X 30 cm e eluídos com solução gradiente salino 0-3 M em tampão formiato conforme procedimento já descrito.

O material correspondente ao pico fosfolipase A repurificada foi coletado, dialisado e liofilizado.

1.4.2 – Filtração por Exclusão Molecular

100 mg de fosfolipase A acima obtida foram dissolvidos em 10 ml de tampão formiato pH 4,0, 0,1 M e passados por coluna de Sephadex G-75, 1,5 X 35 cm, coletados por eluição com o próprio tampão. O material do pico correspondente a fosfolipase pura foi liofilizado e dessecado até peso constante.

1.5 – 5a. Etapa:

1.5.1 – Cromatografia de Troca Iônica-Trocadora Catiônica

50 mg de crotamina, pico IV, obtidos no item 1.1, foram dissolvidos em 10 ml de tampão formiato pH 4,0, 0,1 M e passados em coluna de SP Sephadex C-25 de 0,9 X 30 cm. A eluição foi feita com gradiente salino em tampão formiato como se procedeu no item 1.2.1. O material correspondente ao pico da crotamina foi dessalificado por diálise, liofilizado e recromatografado.

1.5.2 – Filtração por Exclusão Molecular

100 mg de crotamina, obtidos em 1.5.1., foram dissolvidos em 10 ml de tampão formiato pH 4,0, 0,1 M e cromatografados em colunas de Sephadex G-75 e eluídos com o próprio tampão. A crotamina assim pura foi liofilizada e dessecada até peso constante.

2 – Análise de Aminoácidos

Analisador modelo 120 C da Beckman foi utilizado para determinar a composição em aminoácidos das frações protéicas isoladas e purificadas.

2.1 – Padrão de Aminoácidos

Solução estoque padronizada de aminoácidos (Aminoacid Calibration Mixture – Beckman) serviu para determinar as constantes relativas às áreas correspondentes a cada aminoácido.

Solução contendo 0,1 μ mol de cada aminoácido em tampão citrato 0,2 N, pH 2,2 foi analisada em: coluna de resina PA-35 (custom resin type PA-35-Beckman), eluindo-se com tampão citrato 0,35 N, pH 5,8 para aminoácidos básicos; coluna de resina AA 15 (custom resin type AA 15 – Beckman) eluindo-se inicialmente com tampão citrato 0,2 N, pH 3,28 que foi depois substituído pelo mesmo tampão com pH 4,25, para aminoácidos ácidos e neutros.

2.2 – Crotapotín, Fosfolipase A e Crotamina

250 μ l de soluções aquosas contendo crotapotin, fosfolipase A ou crotamina a 2 mg/ml foram hidrolisados em meio ácido clorídrico 6 N, em ampolas fechadas sob vácuo, durante 20 horas a 110°C. Os hidrolisados foram secados, lavados com água bidestilada por três vezes. Os materiais assim tratados foram dissolvidos em 500 μ l de tampão citrato e analisados segundo o procedimento do padrão, usando 250 μ l de amostras em cada coluna.

3 – Eletroforese em Gel de Poliacrilamida

A pureza de crotapotin, fosfolipase A e crotamina foi estudada também por meio de eletroforese em gel de poliacrilamida, levada a efeito no aparelho Canalco modelo 1200, segundo instruções anexas ao equipamento. Todo o material, drogas e reagentes utilizados foram adquiridos da Canalco.

3.1 – Eletroforese de Crotapotin

50 μ l da solução de crotapotin a 2 mg/ml de tampão tris-glicina foram usados para cada tubo de gel. A eletroforese foi desenvolvida em tampão tris-glicina pH 9,5, empregando 3mA por tubo. A fixação foi feita em solução a 12% de ácido tricloroacético, a coloração em coomassie blue* a 2%, e a descoloração em ácido acético:água:metanol (75:875:50).

3.2 – Eletroforese de Fosfolipase A e Crotamina

50 μ l da solução de crotamina ou fosfolipase A a 2 mg/ml de tampão beta alanina-ácido acético foram usados para cada tubo de gel. A eletroforese foi desenvolvida em tampão beta alanina-ácido acético pH 4,3, empregando 3mA por tubo. Após a corrida, os géis foram fixados em ácido tricloroacético a 12% e corados com coomassie blue. A descoloração foi feita em solução aquosa contendo ácido acético e metanol.

4 – Espectrofotometria

Estudos espectrofotométricos de crotapotin, fosfolipase A e crotamina purificadas, foram efetuados em aparelho Carl Zeiss, modelo PMQ II.

4.1 – Determinação do Conteúdo Protéico e Coeficiente de Absorção Molar

Pelo método de LOWRY⁽⁴⁴⁾, foram determinadas concentrações das proteínas e baseando-se no peso molecular (PM) de crotapotin = 8.400, PM de fosfolipase A = 13.600, PM de crotamina = 4.890 foram calculados os respectivos coeficientes de absorção molar.

4.2 – Espectros de Absorção

Os espectros de absorção foram determinados em soluções a pH 8,0, utilizando concentrações de 1,0 mg/ml para crotapotin, 0,5 mg/ml para crotamina e 1,0 mg/ml para fosfolipase A.

5 – Determinação da DL₅₀ das Proteínas Purificadas

A toxicidade de fosfolipase A, crotamin; e crotoxina (fosfolipase A + crotapotin) foi (*) Coomassie Brilliant Blue R-250, BIO-RAD Laboratories.

demonstrada em camundongos Swiss pesando cerca de 20 g cada animal. A DL_{50} foi determinada pelo processo de REED e MUENCH⁽⁵⁷⁾, injetando intraperitonealmente 0,2 ml das soluções: 1/1, 1/2, 1/4, 1/8, 1/16 (partindo de 50 µg/ml de solução fisiológica), em seis lotes de seis camundongos por proteína. As leituras foram feitas 24 horas após as injeções, e aplicou-se a seguinte equação:

$$\text{distância proporcional} = \frac{50\% - \text{mortalidade a diluição logo abaixo}}{\text{mortalidade logo acima} - \text{mortalidade logo abaixo}}$$

$$\begin{array}{l} \text{logaritmo da diluição acima de 50\% de mortalidade} \dots\dots\dots x \\ \text{distância proporcional vezes log2 (fator de diluição)} \dots\dots\dots \frac{y}{z} \end{array} +$$

$$z = \text{logaritmo da } DL_{50}$$

6 – Determinação de Grupos Sulfidrílicos Livres

Para determinar grupamentos -SH livres de crotapotin, fosfolipase A e crotamina, empregou-se o processo colorimétrico de ELLMAN⁽¹⁹⁾, usando como reagente o ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzólico, Sigma, e cisteína como padrão.

6.1 – A reação foi realizada de acordo com as modificações introduzidas por SIMIZU⁽⁶²⁾ ao processo de Ellman.

0,50 ml de solução contendo 0,1 mg de proteína; 0,88 ml de tampão tris 0,1 M, pH 8,0; 0,03 ml de EDTA 0,1 M, pH 8,0; foram juntados e completados a 3,00 ml com água destilada. Adicionou-se à mistura 0,02 ml do reativo de Ellman (20 mg de ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzólico para 5 ml de tris 0,1 M, pH 8,0). Decorridos 10 minutos, determinou-se a absorbância a 412 nm contra branco contendo somente tris, EDTA, água destilada e reativo.

6.2 – Outro ensaio se procedeu da mesma forma que no item anterior, somente adicionando ao meio 0,6 ml de uréia 10,0 M.

7 – Determinação da Atividade Enzimática de Fosfolipase A

O método utilizado foi empregado por NEUMAN et al⁽⁵⁰⁾, que é um processo indireto onde a lisolecitina, liberada da gema de ovo por ação da enzima, age sobre as hemácias provocando a lise. A oxihemoglobina liberada é quantificada no espectrofotômetro a 578 nm.

7.1 – Foi inicialmente determinada uma curva de hemólise com fosfolipase A onde todos os testes confirmaram a pureza do material como isento de contaminantes, inclusive dando DL_{50} igual à literatura. 0, 5, 20, 30, 40 e 50 µg de fosfolipase/50 µl de solução fisiológica foram pipetados a tubos contendo 50 µl de gema de ovo e incubados por duas horas a 37°C. 4,9 ml da suspensão, a 0,6%, de glóbulos vermelhos lavados três vezes em solução fisiológica, foram adicionados às misturas incubadas, reagindo-se por mais 40 minutos a 37°C. Centrifugou-se a 1500 rpm por 10 minutos e os sobrenadantes foram lidos no espectrofotômetro contra branco isento de fosfolipase A.

7.2 – Outras determinações da atividade enzimática de fosfolipase A foram feitas com solução de 1 mg/ml de solução fisiológica, calculando a porcentagem de hemólise através da comparação com fosfolipase padrão.

B – Determinação da Presença do Fator de Coagulação

Para verificar a possível contaminação das frações protéicas com fator coagulante, as amostras foram colocadas em presença de fibrinogênio: 0, 100, 200 e 500 µg de fosfolipase A, crotapotin ou crotamina foram juntados a 1 ml de solução fisiológica contendo 1 mg de fibrinogênio humano (preparado no Hospital das Clínicas da F. M. U.S.P.) e incubados à temperatura ambiente por 2 horas.

C – Reações Imunológicas

1 – Reações de Crotapotin, Fosfolipase A e Crotoxina (Crotapotin + Fosfolipase A) com Soro Anticrotálico do Instituto Butantan*

1.1 – Reações de Precipitina Segundo KABAT⁽³⁶⁾

A uma série de tubos contendo quantidades crescentes de antígenos (0, 50, 75, 100, 150, 200, 300, 400 e 600 µg de crotapotin ou fosfolipase A ou crotoxina em 0,8 ml de tampão fosfato pH 7,0, 0,1 M) foram adicionados 0,2 ml de soro anticrotálico. As amostras foram incubadas durante uma hora a 37°C e 24 horas a 4°C, centrifugadas a 2.000 rpm por 10 minutos, os precipitados lavados com o mesmo tampão fosfato a 4°C. A lavagem foi repetida por mais duas vezes. Os precipitados assim obtidos foram dissolvidos em 1 ml de NaOH, 0,1 N, e quantificados a 280 nm no espectrofotômetro.

Ao mesmo tempo, sobrenadantes da primeira centrifugação foram testados por imunodifusão em placa de agarose (Indubiose-A-37, L'Industrie O. Française) para confirmar a zona de equivalência antígeno-anticorpo, zona de excesso de antígenos e excesso de anticorpo.

1.2 – Imunodifusão Dupla Radial

Imunodifusão dupla foi realizada em placa de agarose para crotapotin, fosfolipase A e crotoxina contra soro anticrotálico do Butantan, segundo OUCHTERLONY^(52,53), sobre lâmina comum de microscópio.

2 – Reação de Precipitação do produto de Interação Crotapotin Fosfolipase A

Foram preparadas interações de crotapotin e fosfolipase A com seguintes proporções:

– 1 crotapotin + 1 fosfolipase A

8,4 mg de crotapotin + 13,6 mg de fosfolipase foram dissolvidos em 22 ml de tampão fosfato pH 7,0, 0,1 M.

– 2 crotapotin + 1 fosfolipase A

16,8 mg de crotapotin + 13,6 mg de fosfolipase foram dissolvidos em 30,4 ml de tampão fosfato.

– 1 crotapotin + 2 fosfolipase A

8,4 mg de crotapotin + 27,2 mg de fosfolipase foram dissolvidos em 35,6 ml de tampão fosfato.

(*) Segundo a bula que acompanha o soro comercial, 1 ml de soro neutraliza, 1 mg de veneno bruto.

2.1 – As três interações protéicas acima preparadas foram pipetadas em diferentes tubos de ensaio, tal que cada 0,8 ml de tampão fosfato contivesse 0, 50, 75, 100, 200, 300, 400, 600 μg de crotapotin + fosfolipase A (2 crotapotin + 1 fosfolipase A ou 1 crotapotin + 1 fosfolipase A ou crotapotin + 2 fosfolipase A). Pipetou-se 0,2 ml de soro anticrotático em cada tubo. As amostras, após incubação de 1 hora a 37°C seguido de incubação por mais 24 horas a 4°C, foram centrifugadas a 2.000 rpm por 10 minutos. Os precipitados foram novamente lavados e centrifugados, por mais duas vezes, com tampão fosfato a 4°C. Os precipitados assim obtidos foram dissolvidos em 1 ml de NaOH 0,1 N e quantificados espectrofotometricamente a 280 nm.

2.2 – Imunodifusão Dupla Radial das Três Amostras de Interação

As amostras do item 2. foram semeadas em placas de agarose com soro anticrotático do Butantan.

Os sobrenadantes da primeira centrifugação da reação de precipitina do item 2.1. também foram utilizados para verificar a zona de equivalência e zona de excesso do antígeno e excesso de anticorpo.

3 – Reação de Absorção

3.1 – Aos tubos contendo 0, 50, 75, 100, 200, 300, 400 e 600 μg de crotapotin/0,8 ml de tampão fosfato pH 7,0, 0,1 M foram adicionados 0,2 ml de soro anticrotático. Após incubação de 1 hora a 37°C e 24 horas a 4°C (não houve formação de precipitado nem turvação), foram juntados 200 μg de fosfolipase A em todas as amostras, incubando-se por mais 1 hora a 37°C e 24 horas a 4°C. As amostras foram centrifugadas, os precipitados lavados e quantificados como nos itens anteriores.

3.2 – Aos tubos contendo 0, 50, 75, 100, 200, 300, 400 e 600 μg de fosfolipase ou crotapotin/0,8 ml de tampão fosfato pH 7,0, 0,1 M foram adicionados 0,2 ml de soro anticrotático. Após incubação de 1 hora a 37°C e 24 horas a 4°C, centrifugação a 2.000 rpm, os sobrenadantes foram coletados em tubos para nova incubação. Aos tubos correspondentes a quantidades crescentes de crotapotin foram adicionadas mesmas quantidades crescentes de fosfolipase A e aos tubos que continham fosfolipase A foram adicionadas quantidades crescentes de crotapotin, tomando-se o cuidado de manter em 1 ml o volume de reação. Deixou-se incubar por uma hora a 37°C e 24 horas a 4°C. Após centrifugação e lavagem por três vezes, os precipitados foram dissolvidos em 1 ml NaOH, 0,1 N e as absorbâncias determinadas a 280 nm.

3.3 – Foram preparados tubos contendo 0, 50, 75, 100, 200, 300, 400 e 600 μg de fosfolipase ou crotapotin/0,8 ml de tampão fosfato, pH 7,0, 0,1 M e foram adicionados a cada tubo 0,2 ml de soro anticrotático. Após 1 hora de reação a 37°C foram adicionadas mesmas quantidades crescentes de antígeno (crotapotin nos tubos de fosfolipase A e fosfolipase A nos tubos que continham crotapotin), deixando reagir por mais 1 hora a 37°C e 24 horas a 4°C. As amostras foram centrifugadas, os precipitados lavados e dissolvidos em NaOH, 0,1 N e quantificados a 280 nm.

4 – Reação de Crotapotin ¹²⁵I como Soro Anticrotático. Eletroforese em Papel

Essa reação serviu para confirmar a formação do complexo crotapotin-soro anticrotático. A crotapotin ¹²⁵I utilizada foi: obtida por método de marcação com cloramina T^(26,33), radioiodando crotapotin com ¹²⁵I Na livre de carregador e redutor; purificada por cromatografia em Sephadex G-25, testada quanto a pureza radioquímica por eletroforese em papel.

Crotapotin ^{125}I foi incubada com soro anticrototático por 1 hora a 37°C e 24 horas a 4°C (aproximadamente $100\ \mu\text{g}$ de crotapotin ^{125}I com 0,2 ml de soro anticrototático). Seguiu-se um branco de crotapotin ^{125}I como soro normal de cavalo (gentilmente cedido pelo Dr. Saliba do Instituto Butantan).

4.1 -- $50\ \mu\text{l}$ do material incubado foram semeados em tiras de papel Whatman nº 1, desenvolvendo-se corridas eletroforéticas em tampão fosfato pH 7,0, f.i. 0,25, 350 v, 3mA/fita, durante uma e quatro horas.

Cada fita seca foi cortada longitudinalmente em duas: uma para determinar radioatividade em contador Nuclear Chicago modelo 120-C para radiações gama; outra para corar com Negro de Amido.

4.2 -- Eletroforese de 1 e 4 horas foram feitas também, nas mesmas condições, para Crotapotin ^{125}I , soro normal + crotapotin ^{125}I . As tiras de papel foram contadas e coradas conforme item anterior.

D – Obtenção de Soros Específicos

anticrotapotin

antifosfolipase A

anticrotoxina (1 crotapotin + 1 fosfolipase A = crotoxina)

4 mg de cada antígeno foram dissolvidos em 0,5 ml tampão fosfato pH 7,0, 0,1 M e adicionou-se 0,5 ml de Adjuvante de Freund completo*. Após homogeneização, as amostras foram injetadas em coelhos, subcutaneamente, na região dorsal. Passadas duas semanas, foram injetadas doses de reforço, contendo 2 mg de proteína, em cada animal. Um segundo reforço foi aplicado 15 dias após a última injeção. Semanalmente, coletou-se amostras de sangue de cada coelho para verificar os níveis de anticorpo. Um mês após a última dose de reforço, os animais apresentaram alto grau de imunização, sendo sacrificados por exanguinação através de punção cardíaca.

Os soros foram separados e testados em placas de agarose por imunodifusão dupla radial e a imunoprecipitação acusou que 0,1 ml dos soros reagem integralmente com 0,1 mg de antígenos correspondentes.

Alíquotas de soros imunes separadas em diversos tubos de ensaio foram guardadas congeladas até o momento de uso.

E – Reações de Crotapotin, Fosfolipase A, Crotoxina (Crotapotin + Fosfolipase A) com Soros Específicos

1 – Reações com Soros Específicos Correspondentes

1.1 – Tubos contendo 0, 50, 75, 100, 200, 300, 400 e 600 μg de crotapotin ou fosfolipase A ou crotoxina em 0,8 ml de tampão fosfato pH 7,0 0,1 M foram acrescidos de 0,2 ml de soros específicos correspondentes. Após incubação por 1 hora a 37°C e mais 24 horas a 4°C , as amostras foram centrifugadas, os precipitados lavados por três vezes com tampão fosfato a 4°C , dissolvidos em 1 ml de NaOH 0,1 N e lidos espectrofotometricamente a 280 nm para construção das curvas de precipitação.

(*) Adjuvante de Freund completo: 9 partes de Nujol + 1 parte de Arlacel + 2 mg de bacilos de tuberculose secos e mortos pelo calor.

1.2 – Imunodifusão dupla radial dos antígenos contra seus soros específicos foi efetuada em placas de agarose.

2 – Reações Cruzadas

2.1 – Aos tubos contendo quantidades crescentes de crotapotin ou fosfolipase A, 0, 50, 75, 100, 200, 300, 400 e 600 μg , foram juntados a série contendo crotapotin 0,2 ml de soro anti-fosfolipase A, e, na série contendo fosfolipase juntou-se 0,2 ml de soro anti-crotapotin. Depois da incubação, os precipitados foram quantificados por espectrofotometria.

2.2 – Foram efetuados testes de imunodifusão para verificar reação cruzada entre antígenos e soros imunes.

3 – Reações de Absorção

3.1 – Às amostras crescentes de crotapotin ou fosfolipase A (0, 50, 75, 100, 200, 300, 400 e 600 μg) foram adicionados 0,2 ml de soro anti-crototoxina.

Após incubação normal e decantação, aos sobrenadantes dos tubos que foram precipitados com fosfolipase A juntou-se crotapotin em quantidades igualmente crescentes e aos sobrenadantes de crotapotin adicionou-se fosfolipase A. Após incubação procedeu-se a quantificação do precipitado de maneira usual.

F – Interação Crotapotin – Crotamina

Foram utilizadas soluções nas seguintes concentrações:

- crotapotin (1 mg/ml de tampão fosfato pH 7,0, 0,1 M)
- crotamina (1 mg/ml de tampão)
- 1 crotapotin: 1 crotamina (8,4 mg de crotapotin + 5 mg de crotamina dissolvidos em 8,4 ml de tampão fosfato pH 7,0, 0,1 M).
- 2 crotapotin: 1 crotamina (16,8 mg de crotapotin + 5 mg de crotamina/16,8 ml de tampão).
- 1 crotapotin: 2 crotamina (8,4 mg de crotapotin + 10 mg de crotamina dissolvidos em 8,4 ml de fosfato).

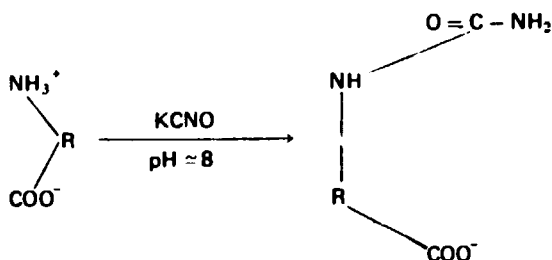
0, 50, 75, 100, 150, 200, 300, 400 e 600 μl das amostras acima foram pipetados em tubos de ensaio e completados a 0,8 ml com tampão fosfato. A cada tubo juntou-se 0,2 ml de soro anti-crotapotin e incubou-se a 37°C por 1 hora e 24 horas a 4°C. Após centrifugação e lavagem, os precipitados foram determinados quantitativamente por espectrofotometria a 280 nm.

Foram realizadas placas de imunodifusão das interações acima referidas.

G – Bloqueio de ϵ -Amino Grupo das Lisinas de Crotapotin e Fosfolipase A. Interações

1 – Carbamilação dos ϵ -Amino Grupos das Lisinas

A reação com cianato é um meio de converter ϵ -amino grupo dos resíduos de lisina, carregado positivamente, em homocitrulina neutra sob condições moderadas de reação^(65,67).



Em tubos contendo 1 mg de crotapotin ou fosfolipase/ml de tampão fosfato 0,1 M, pH 7,9, em banho termostático a 37°C, juntou-se sob constante agitação lenta 20,25 mg de cianato de potássio/ml de proteína (recentemente recristalizado em água-etanol, cedido pelo Departamento de Química Orgânica, Instituto de Química, USP). O pH das soluções foi mantido a 7,9 através de adição de ácido acético 1 M ou NaOH 0,1 M durante o decorrer das 8 horas de reação.

As amostras foram dialisadas por 24 horas contra água deionizada em sacos de diálise previamente tratados (1 anidrido acético; 1 piridina, para diminuir a porosidade), até eliminar todo cianato excedente. O teste de cianato foi efetuado segundo VOGUEL⁽⁷⁷⁾ – algumas gotas de piridina foram acrescentadas à solução 1% de sulfato de cobre. A 1 ml dessa solução juntou-se gotas de solução de cianato ou amostras a testar. Depois de agitação, juntando clorofórmio, este se torna azul na presença de cianato. A reação é sensível até uma parte de cianato para 20.000.

2 – Análise das Proteínas Carbamiladas

2.1 – Espectrofotometria

Foram determinados os espectros de absorção das amostras carbamiladas entre 200 a 500 nm.

2.2 – Análise de Aminoácidos da Crotapotin e Fosfolipase A Carbamiladas em Analisador Beckman

Crotapotin e fosfolipase A carbamiladas foram hidrolisadas por 10 horas, tomando-se 0,1 ml de amostras, 0,4 ml de água bidestilada e 0,5 ml de ácido clorídrico 12 N em ampolas fechadas e isentas de ar. Após lavagem por 3 vezes com 1 ml de água e dessecação com pentóxido de fósforo, os materiais foram analisados em coluna básica, conforme procedimento usual, para determinar o número de resíduos de lisina que não se transformaram em homocitrulina.

3 – Estudos com Proteínas Carbamiladas

3.1 – Foi realizada imunodifusão de crotapotin carbamilada contra soro anticrotapotin, fosfolipase A carbamilada contra soro antifosfolipase A; crotapotin carbamilada + fosfolipase A contra soro anticrotaxina.

3.2 – Reação de Precipitação

As subunidades de crotoxina carbamiladas e a mistura crotapotin carbamilada: fosfolipase A, foram postas a reagir (0, 100, 200, 300 e 400 μ g) com os soros específicos e os precipitados quantificados nas mesmas condições anteriormente mencionadas.

3.3 – Hemólise Indireta da Fosfolipase A Carbamilada

50 μ l da solução 1 mg/ml foram utilizados para determinar a atividade enzimática da fosfolipase A modificada.

H – Bloqueio de Argininas de Crotapotin e Fosfolipase A. Interação

1 – Reação de Fosfolipase A com Fenilglioal

As soluções de fosfolipase A contendo 1,3 mg/ml de tampão fosfato 0,1 M, pH 6, pH 7 e pH 8, foram adicionados 1,5 mg de fenilglioal (Phenylglyoxal/Hydrat – Fluka A. G., Buchs, S. G.), na proporção molar de 1 fosfolipase A: 100 fenilglioal. Juntos seguiram-se brancos. Decorridos 0, 5, 10, 20, 30 minutos e 1, 2, 4 e 5 horas de reação foram retiradas alíquotas para:

1.1 – Determinação da Atividade Enzimática

50 μ l da amostra incubada foram adicionados a 50 μ l de gema de ovo, deixando reagir durante uma hora a 37°C. Juntou-se 4,9 ml de hemácias a 0,6% em solução fisiológica. Incubou-se por mais 1 hora, após centrifugação, os sobrenadantes foram lidos a 578 nm para verificar a porcentagem de hemólise (contra uma curva já predeterminada de fosfolipase A).

1.2 – Determinação da Curva de Absorção

Foram determinadas curvas de absorção da fosfolipase A com zero, 5, e 15 minutos, e 1, 2, 5 horas de reação das amostras acima citadas, fazendo leituras espectrofotométricas entre 200 a 500 nm.

1.3 – Determinações Imunológicas

Placas de imunodifusão em agarose a 2% foram efetuadas com amostras retiradas a zero, 5, 10, 20, 30 minutos, e 1, 4, e 5 horas de reação nos três valores de pH acima referidos.

Precipitações quantitativas de 100, 200, 300 e 400 μ g das fosfolipasas ensaiadas a 5 horas de reação foram realizadas de maneira usual contra 0,2 ml de soro anti-fosfolipase A.

1.4 – Determinação de Argininas Bloqueadas

100 μ l de soluções de fosfolipase A com fenilglioal foram dosados a 0, 5, 10, 20, 30 minutos, 2 e 5 horas de reação, quanto a conteúdo guanidínico, com reativo de Sakaguchi segundo SAKAGUCHI⁽⁶⁰⁾, IZUMI⁽³⁴⁾ e TOMLINSON⁽⁷³⁾, seguindo o esquema:

0,1 ml de soluções foram incubadas a pH 6, pH 7 ou pH 8 com 1,4 ml de tampão fosfato correspondente, juntando 0,3 ml de alfa-naftol a 0,02%, mais 0,3 ml de NaOH 10%. Após 2 a 3 minutos,

juntou-se 2 gotas de hipobromito a 2% com agitação rápida, adicionando a seguir 0,3 ml de uréia a 40%. As amostras foram lidas a 520 nm no espectrofotômetro. A curva de dosagem do grupo guanidino foi realizada com fosfolipase A em solução aquosa.

O possível bloqueio de alfa amino N terminal da enzima por fenilgloixal nas amostras com 0, 5, 10, 20, 30 minutos, 2 e 5 horas de reação, foi averiguado no papel Whatman qualitativo, revelando com ninidrina.

2 – Reação de Crotapotin com Fenilgloixal

As soluções de crotapotin contendo 0,8 mg/ml de tampão fosfato pH 6, pH7 e pH 8 foram adicionados 1,5 mg de fenilgloixal (1 crotapotin: 100 fenilgloixal). Brancos com crotapotin e fenilgloixal foram realizados. Decorridos 0, 5, 10, 20 e 30 minutos, e 1, 2, 4, 5 horas de reação, foram retiradas amostras para realizar:

2.1 – Reações Imunológicas de Crotapotin Tratada com Fenilgloixal

2.1.1 – Placas de imunodifusão dupla radial com soro anticrotapotin foram realizadas em agarose.

2.1.2 – Imunoprecipitação quantitativa de 100, 200, 300 e 400 µg das amostras com 5 horas de reação, contra 0,2 ml de soro anticrotapotin, foi realizada conforme descrição anterior.

2.2 – Estudo Espectrofotométrico

Com amostras a zero, 5, 15 minutos, 1, 2, 4 e 5 horas de reação foram determinadas curvas de absorção na região compreendida entre 200 a 500 nm.

1 – Tirosinas na Interação Crotapotin-Fosfolipase A

1 – Marcação da Crotoxina com ^{131}I Na

A iodação da proteína pelo processo de GREENWOOD et alii⁽²⁶⁾, realiza-se mediante incorporação de iodo radioativo nas moléculas de tirosina utilizando Cloramina T, sal sódico de N-monocloro-p-sulfonamida (Merck, W. G.), em meio levemente alcalino.

2 mg de crotoxina^o foram dissolvidos em menor volume possível de tampão fosfato 0,05 M, pH 8,0 (aproximadamente 0,5 ml). A amostra foi transferida a um frasco contendo 2 mCi de ^{131}I Na, isento de carregador e redutor (produzido pelo Centro de Processamento de Material Radioativo, Instituto de Energia Atômica, São Paulo). Juntou-se a seguir 30 mg de Cloramina T/0,2 ml de tampão fosfato.

Após um minuto de reação, pipetou-se 0,2 ml de solução contendo 17 mg de metabissulfito de sódio para neutralizar o excesso de Cloramina T. Após a marcação, o pH da mistura, 6,0, foi elevado a 7,0 com NaOH 0,1 N.

^o Crotoxina cristalizada, cedida pela equipe do Prof. Oswaldo Vital Brazil, Universidade de Campinas, São Paulo.

2 – Purificação da Crotoxina ¹³¹I

A purificação foi feita através da passagem por coluna de 0,9 X 30 cm, de Sephadex G-25 equilibrada com tampão fosfato pH 7,0, 0,1 M. Com fluxo de 0,6 ml/minuto, as amostras foram coletadas de minuto em minuto e lidas em contador de radiação gama, "Mediac dose calibrator" de Nuclear Chicago, para localização dos picos radioativos.

Foram efetuadas eletroforeses em papel Whatman nº1, em tiras de 2,5 X 33 cm, usando 3 mA/fita, 350 v, para verificar a pureza radioquímica do material iodado.

3 – Fracionamento da Crotoxina ¹³¹I em Coluna de DEAE Sephadex

A crotoxina radioiodada foi passada por coluna de 1,1 cm X 30 cm de Sephadex DEAE A-25, previamente entumecido em tampão formiato de amônio pH 4,0, 0,05 M, para separar a crotapotin ¹³¹I de fosfolipase A ¹³¹I. A eluição foi feita com mesmo tampão utilizando gradiente salino de NaCl de 0 a 3 M. As amostras coletadas foram lidas no espectrofotômetro a 280 nm para localização dos picos protéicos, e contadas no Mediac para determinar a radioatividade de crotapotin ¹³¹I e fosfolipase ¹³¹I.

4 – Determinação da Radioatividade Específica dos Produtos Marcados

4.1 – Foi determinada a densidade ótica a 280 nm para crotoxina ¹³¹I, fosfolipase A ¹³¹I e crotapotin ¹³¹I.

4.2 – A determinação do conteúdo protéico pelo método de LOWRY⁽⁴⁰⁾ foi feita para crotapotin ¹³¹I e fosfolipase ¹³¹I, utilizando albumina humana Behring como padrão.

4.2.1 – Reativos utilizados:

- solução A: 2 g de Na₂CO₃ + 0,4 g de NaOH para 100 ml de água
- solução B: 0,2 g de CuSO₄ . 5 H₂O para 10 ml de água
- solução C: 0,4 g de citrato de Na para 10 ml de água

Reagentes: mistura de 100 A + 1 B + 1 C

Folin : diluído : 1,5 com água, na hora do uso.

4.2.2 – Juntamente com 0, 10, 25, 50, 75 e 100 µg de albumina padrão/ml de água bidestilada foram dosadas proteínas radioiodadas para poder calcular a atividade específica expressa em µCi/µg de tirosina. Às amostras foram adicionadas 2,5 ml do reagente. Após 10 minutos de reação, juntou-se 0,25 µl de Folin e decorrida 1 hora foram feitas determinações espectrofotométricas a 660 nm.

5 – Reações Imunológicas com as Proteínas Radioiodadas

5.1 – Imunodifusão de crotapotin ¹³¹I, fosfolipase A ¹³¹I e crotoxina ¹³¹I foram efetuadas em placas de agarose contra soros específicos correspondentes.

5.2 – Realizou-se reações de precipitação com 0, 100, 200, 300 e 400 µg de crotapotin ¹³¹I ou fosfolipase A ¹³¹I/0,8 ml de tampão fosfato pH 7,0, 0,1 M, juntando a cada tubo 0,2 ml de soros específicos correspondentes. A quantificação dos precipitados foi feita de maneira rotineira.

6 – Atividade Enzimática de Fosfolipase A^{131I}

Determinou-se a atividade enzimática da fosfolipase A^{131I} dosando 50 µg da mesma pelo processo habitual.

J – Irradiação de Crotopotin e Fosfolipase A

Soluções de crotopotin e fosfolipase A contendo 1 mg de proteína/ml de água deionizada foram submetidas a irradiação com bomba de ⁶⁰Co, taxa de dose de 497 K rad/60 minutos, do Centro de Radioterapia do Instituto de Energia Atômica.

As amostras foram irradiadas a 20, 50, 100, 200 e 500 K rad à temperatura ambiente, em tubos abertos. Após irradiação, teve-se o cuidado de manter as amostras a zero graus e usá-las imediatamente em seguida nos ensaios:

1 – Imunodifusão em Placas de Agarose

As amostras irradiadas foram testadas contra soros imunes correspondentes. O produto da interação crotopotin-fosfolipase A irradiadas também foi semeado contra soro anticrotoxina.

2 – Reações de Precipitação em Solução

0, 100, 200, 300 e 400 µl de soluções irradiadas foram completadas a 0,8 ml com tampão fosfato pH 7,0, 0,1 M. Juntou-se 0,2 ml de soro anticrotopotin nos tubos contendo crotopotin, e 0,2 ml de soro antifosfolipase A para a série de amostras contendo fosfolipase A. Às soluções de 50, 100, 200, 300 e 400 µl de crotopotin + fosfolipase A, completadas a 0,8 ml com tampão fosfato, juntou-se 0,2 ml de soro anticrotoxina. As reações e determinações quantitativas do precipitado se processaram de maneira usual.

3 – Análise Espectrofotométrica

Foram estabelecidos espectros de absorção de crotopotin e fosfolipase A irradiadas.

4 – Atividade Enzimática

Determinou-se a atividade enzimática das amostras de fosfolipase A irradiadas segundo metodologia já descrita.

3 – RESULTADOS

A – Purificação das Toxinas do Veneno de Cascavel

Na primeira etapa do processo de purificação através da passagem do veneno bruto em Sephadex G-75, obteve-se vários picos de proteínas (Figura 1) e quando testados em camundongos revelou que: pico III corresponde a crotoxina, causando morte por paralisia respiratória e o pico IV corresponde a crotamina, provocando a característica paralisia das patas posteriores.

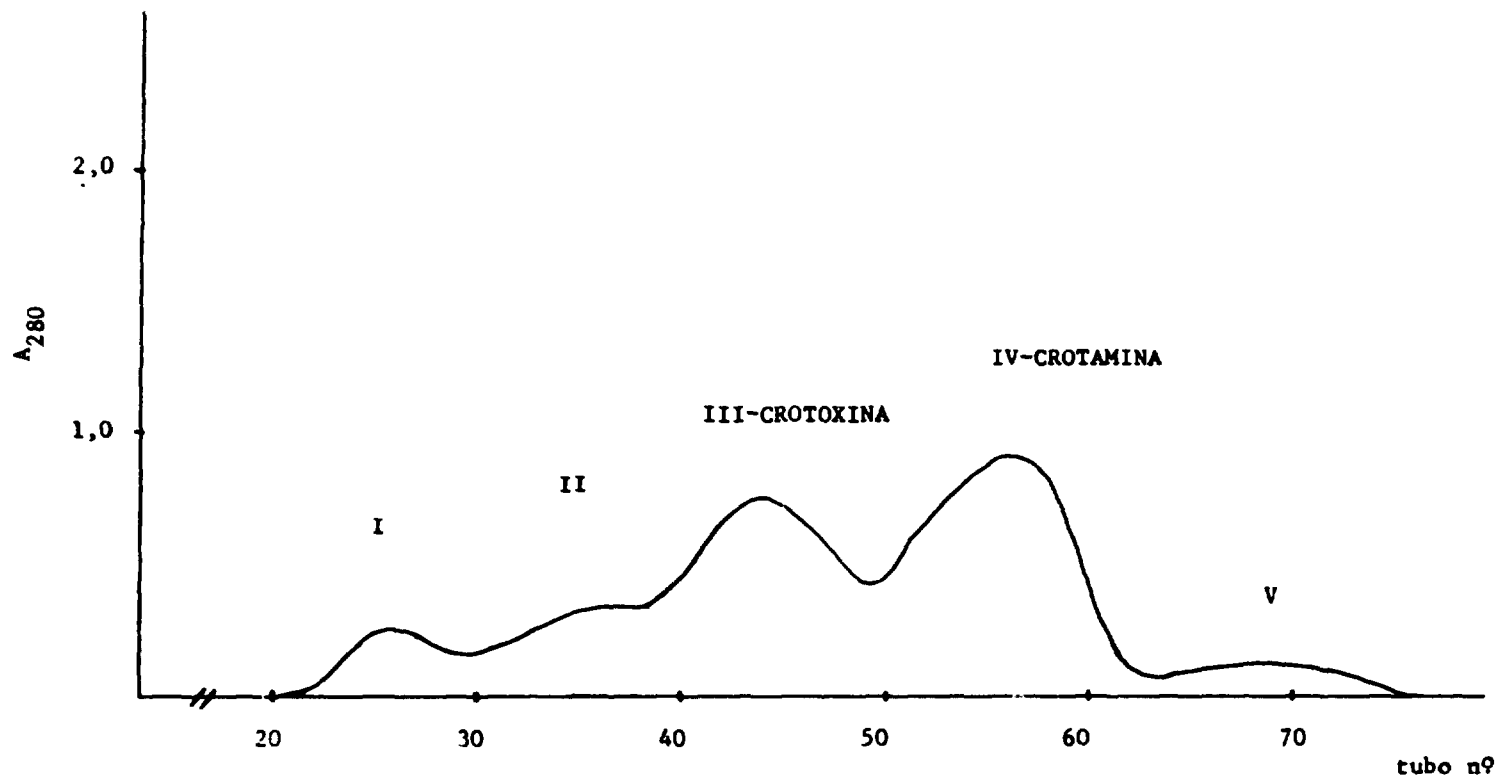


Figura 1 — Cromatografia do Veneno Bruto de Cascavel, Crotamina Positiva. 300 mg do Material foram Dissolvidos em 15 ml de Ácido Acético 0.1M. Passados em Coluna de Sephadex G-75 de 4,1 cm X 35 cm e Eluídos com Tampão Formiato pH 4,0, 0,1M, Fluxo 45 ml/h, Coletando 10 ml por Tubo

A crotoxina, resultante da liofilização do pico III acima descrito, passada através da coluna de Sephadex C-25 separou em subunidades crotapotin e fosfolipase A que correspondem respectivamente a picos 1 e 6 da Figura 2.

A terceira etapa, que constituiu na purificação sucessiva de crotapotin em colunas de DEAE Sephadex A-25 e Sephadex G-75, permitiu a obtenção de crotapotin pura (Figura 3) que foi utilizada para realização dos ensaios.

A quarta etapa, correspondente a purificação da fosfolipase A por cromatografia em SP Sephadex C-25 e Sephadex G-75, está representada na Figura 4.

A purificação da crotamina por troca iônica através de SP Sephadex C-25 e filtração em gel de Sephadex G-75 está representada na Figura 5.

B – Análises para Confirmar a Pureza de Crotapotin, Fosfolipase A e Crotamina Obtidas

1 – Análise de Aminoácidos

Os resultados constantes da Tabela I correspondem às medidas de três análises realizadas para cada proteína e concordam plenamente com os dados da literatura^(24,31). Assim, a crotapotin apresenta Lys 2, His 1, Arg 2, Asp 10, Thr 4, Ser 4, Glu 12, Pro 4, Gly 9, Ala 5, Cys 12, Val 1, Met 1, Ile 2, Leu 1, Tyr 2, Phe 2, Trp 1.

A fosfolipase A apresenta Lys 9, His 2, Arg 9, Asp 9, Thr 6, Ser 6, Glu 9, Pro 5, Gly 11, Ala 6, Cys 12, Val 2, Met 2, Ile 4, Leu 6, Tyr 9, Phe 5, Trp 2.

A crotamina apresenta Lys 9, His 2, Arg 2, Asp 2, Ser 3, Glu 2, Pro 3, Gly 5, Cys 6, Met 1, Ile 1, Leu 1, Tyr 1, Phe 2, Trp 2.

2 – Eletroforese em Gel de Poliacrilamida

Pelos resultados obtidos, confirma-se a pureza tanto de crotapotin, fosfolipase A como de crotamina que apresentam somente uma única banda de migração quando coradas com coomassie blue (Figura 6).

3 – Espectrofotometria

3.1 – Curvas de absorção de fosfolipase A, crotapotin e crotamina estão representadas na Figura 7.

3.2 – Considerando-se o peso molecular de crotapotin = 8.400, peso molecular de fosfolipase A = 13.600 e de crotamina = 4.890, o coeficiente de absorção molar será respectivamente: 9.047; 21.840; 11.460.

4 – Determinação da DL₅₀

O resultado da determinação de DL₅₀ realizada em camundongos para crotamina, fosfolipase A e crotapotin purificadas está expresso na Tabela II juntamente com os dados obtidos por

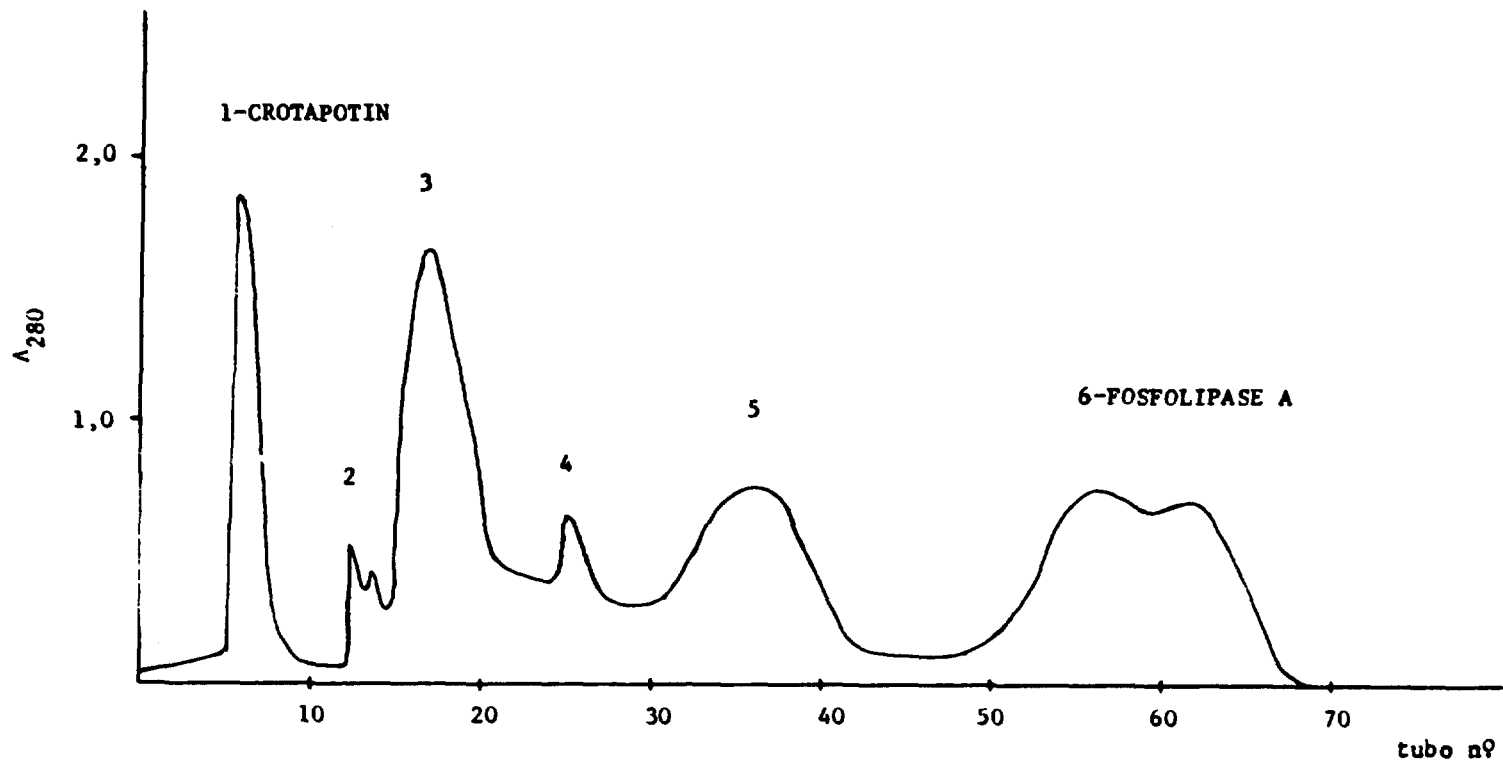


Figura 2 — Cromatografia de Crotoxina Amorfa. 50 mg do Material, Dissolvidos em Tampão Formiato pH 4,0, 0,1M, foram Passados por SP Sephadex C-25, 0,9 cm X 30 cm, e Eluídos com mesmo Tampão com Gradiente Linear de 0 a 3M de NaCl

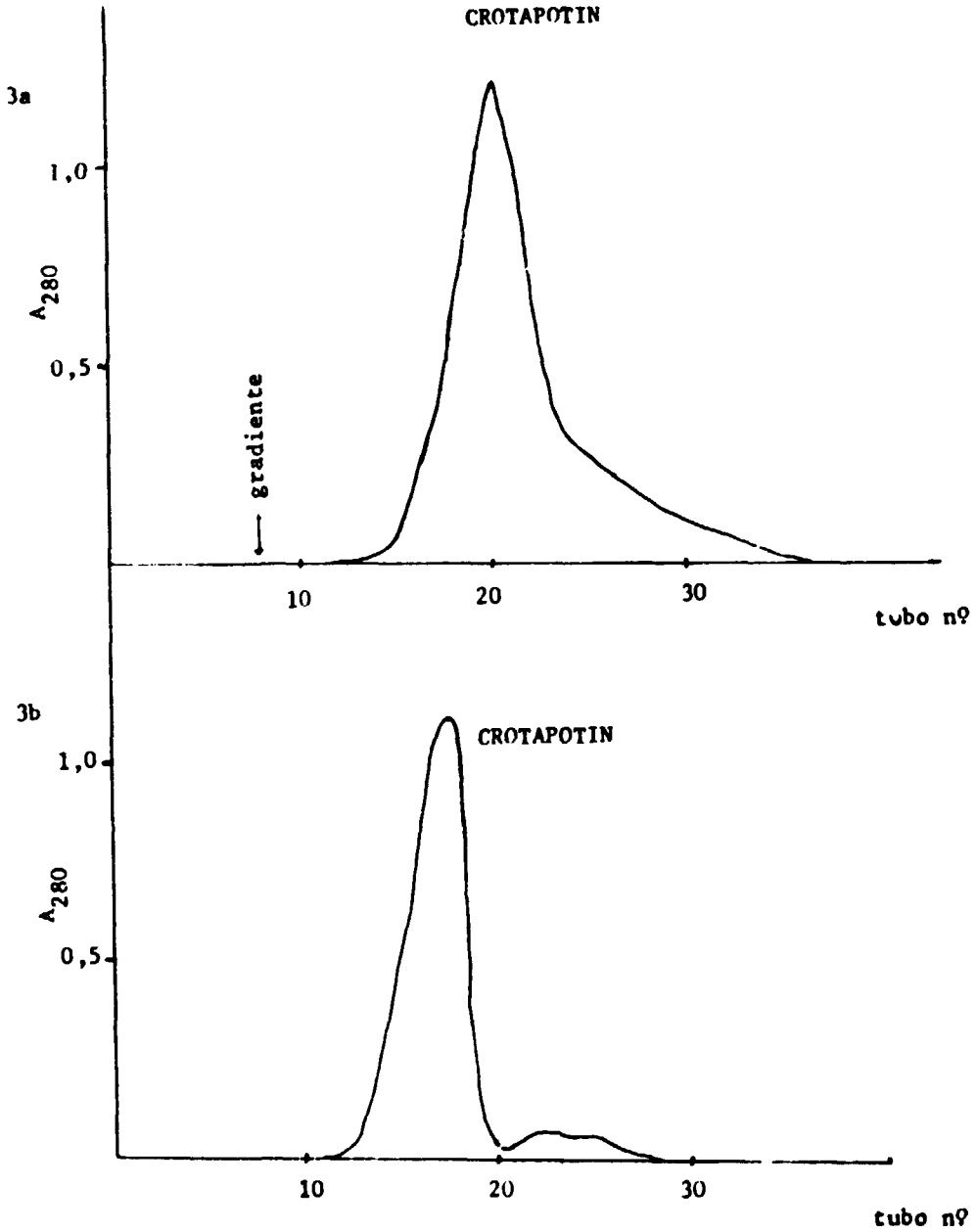


Figura 3 - Recromatografia de Crotapotin

3a - 50 mg de Crotapotin, Dissolvidos em 10 ml de Tampão Formiato pH 4,0, 0,1M, foram Passados em DEAE Sephadex A-25, 0,9 cm X 30 cm e Eluídos com Gradiente de NaCl.

3b - 100 mg do Material Dessalificado Obtidos em 3a foram Dissolvidos em 10 ml de Tampão Formiato e Passados por Sephadex G-75, 1,5 cm X 30 cm

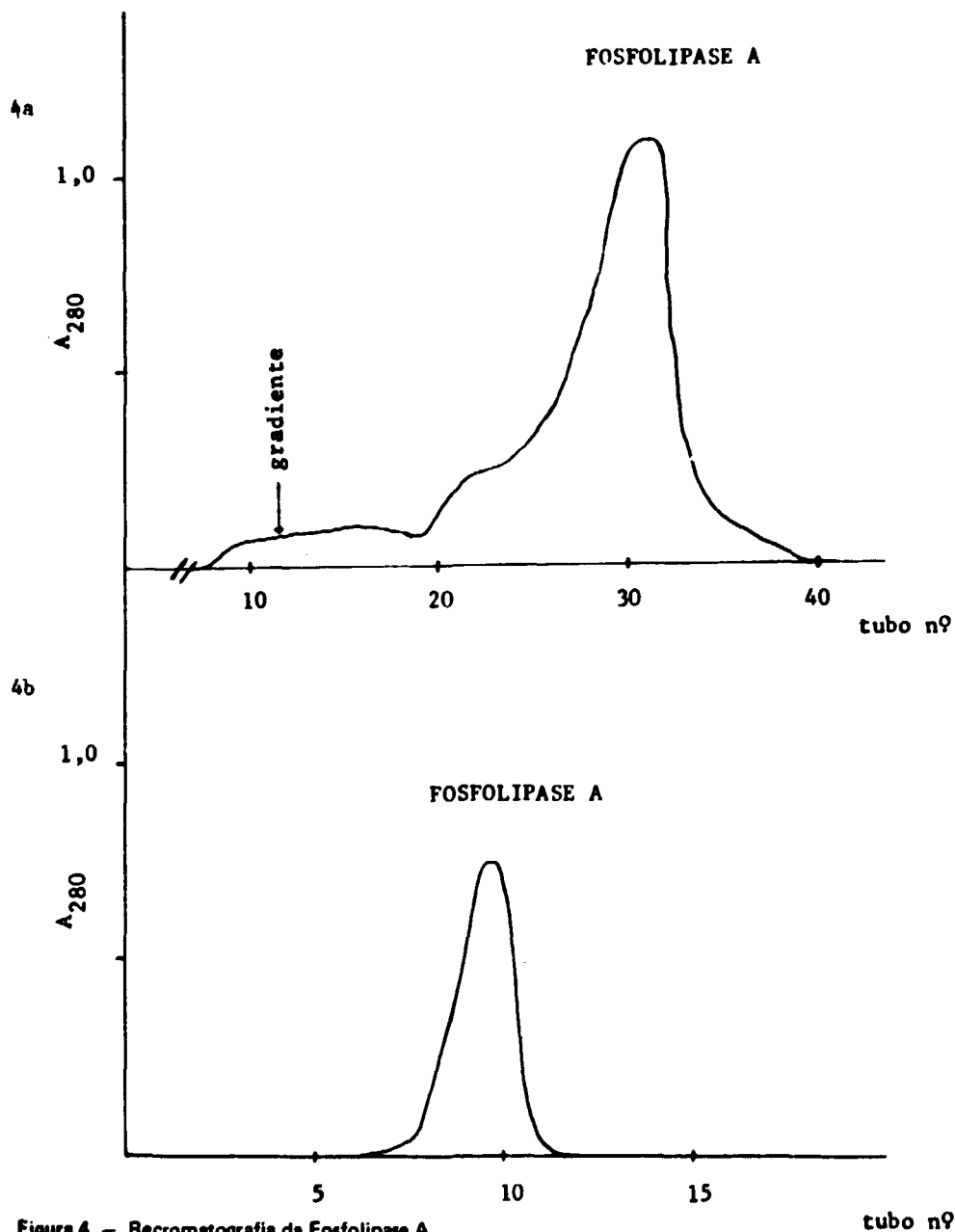


Figura 4 - Recromatografia da Fosfolipase A

4a - 50 mg de Fosfolipase A foram Dissolvidos em Tampão Formiato pH 4,0, 0,1M e Passados SP Sephadex C-25, 0,9 cm X 30 cm, Eluídos com mesmo Tampão em Gradiente de NaCl de 0 a 3M.

4b - 6 mg de Fosfolipase A Obtidos em 4a, Dessalificados, foram Dissolvidos em 5 ml de Tampão Formiato pH 4,0, 0,1M e Passados Através de Sephadex G-75, 1,5 cm X 30 cm

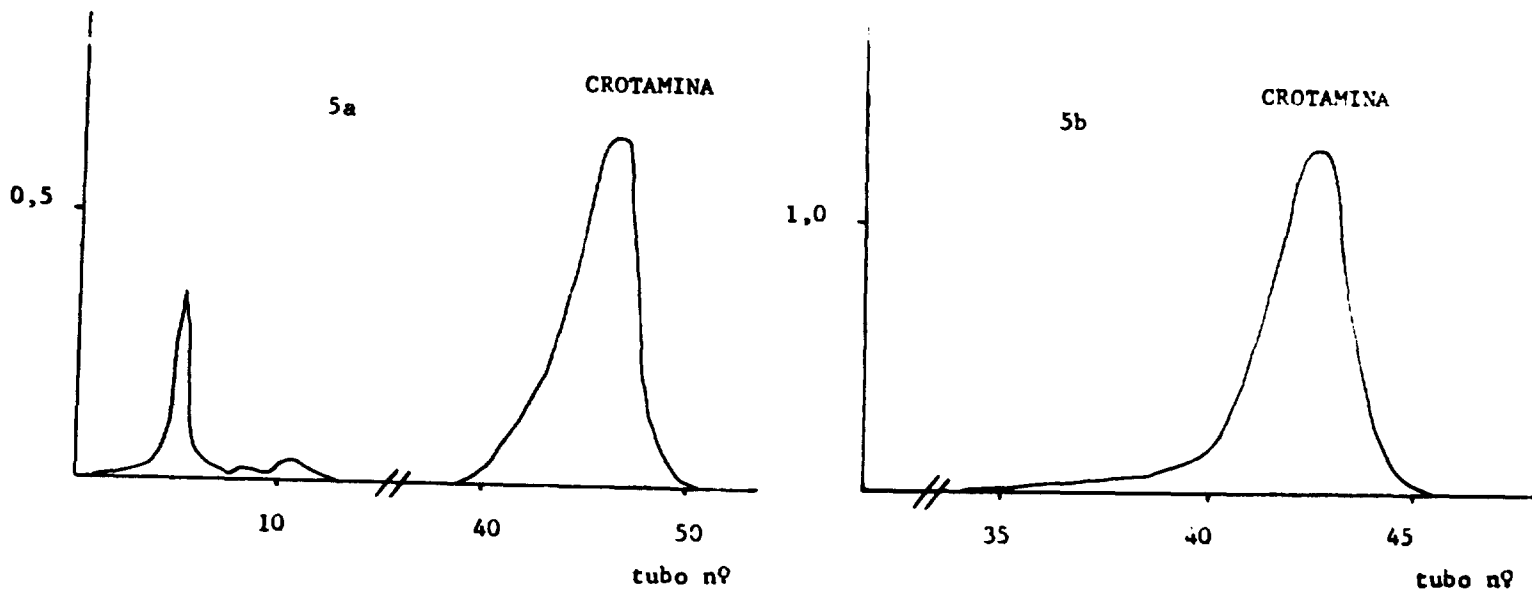


Figura 5 - Recromatografia de Crotamina

5a - 50 mg de Crotamina Dissolvidos em 10 ml de Tampão Formiato pH 4,0, 0,1M foram Passados em SP Sephadex C-25 e Eluídos com mesmo Tampão, com Gradiente Salino.

5b - 100 mg do Material Obtidos em 5a foram Dissolvidos em Tampão Formiato pH 4,0, 0,1M e Passados em Sephadex G-75, e, Eluídos com mesmo Tampão

Tabela I

Análise de Aminoácidos de Crotopotín, Fosfolipase A e Crotamina

proteínas \ resíduos de a.a.																			*** Trp	res. totais
	Lys	His	Am	Arg	Asp	Thr	Ser	Glu	Pro	Gly	Ala	Cys	Val	Met	Ile	Leu	Tyr	Phe		
crotopotín	1,7	0,8	—	1,6	10,0	3,6	4,3	12,5	4,2	8,6	5,1	11,8	0,5	0,7	1,8	0,9	2,2	2,2	1,0	74
*crotopotín	1,8	0,9	—	1,8	10,0	3,5	4,8	12,5	4,5	8,6	5,2	10,8	1,0	0,8	2,5	1,0	2,5	2,5	1,0	76
fosfolipase A	9,3	1,5	—	9,2	9,0	6,4	5,9	9,2	4,6	10,9	5,8	12,3	1,9	2,1	3,9	5,6	9,6	5,9	2,0	113
*fosfolipase A	9,0	1,8	—	8,0	9,0	6,0	6,0	8,2	4,6	10,4	5,8	10,6	2,0	1,6	4,4	5,6	9,2	5,6	2,0	110
crotamina	8,9	2,0	—	2,1	2,1	0,0	3,1	2,5	3,1	5,5	0,0	5,8	0,0	0,9	0,8	1,1	1,2	2,3	2,0	44
**crotamina	9	2	—	2	2	0	3	2	3	5	0	6	0	0	1	1	1	2	2	44

* resultados de Hendon et al⁽³¹⁾.

** resultados de Gonçalves et al⁽²⁴⁾.

*** determinado espectrofotometricamente.

A tabela mostra os resultados da análise de aminoácidos, após hidrólise ácida, de crotopotín, fosfolipase A e crotamina purificada. Os resultados são médias de três determinações

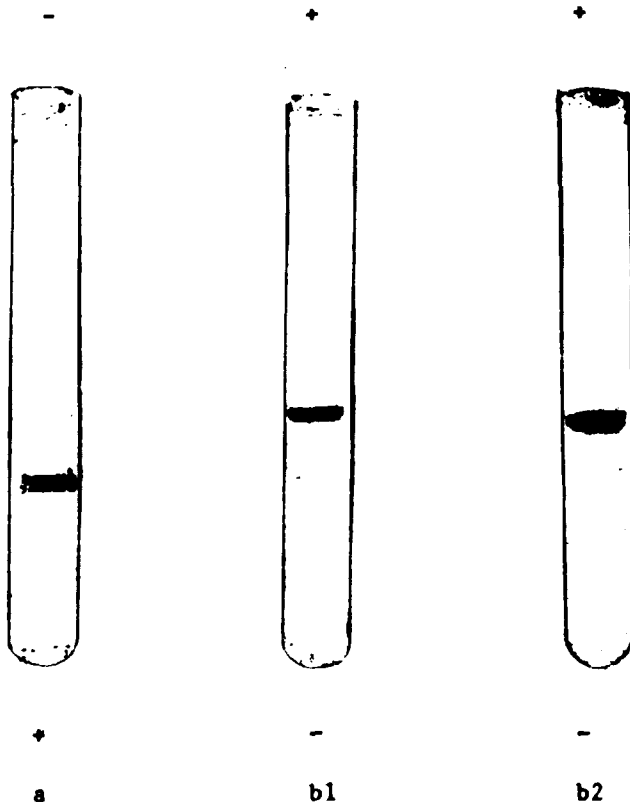


Figura 6 – Eletroforese em Gel de Poliacrilamida

a – Eletroforese de 100 μ g de Crotapotin em Meio Tampão Tris Glicina pH 9,5.

b – Eletroforese de 50 μ g de Fosfolipase A (b1) e 50 μ g de Crotamina (b2) em Meio Tampão Alamina - Ácido Acético, pH 4,3.

A Coloração foi Feita com Coomassie Blue

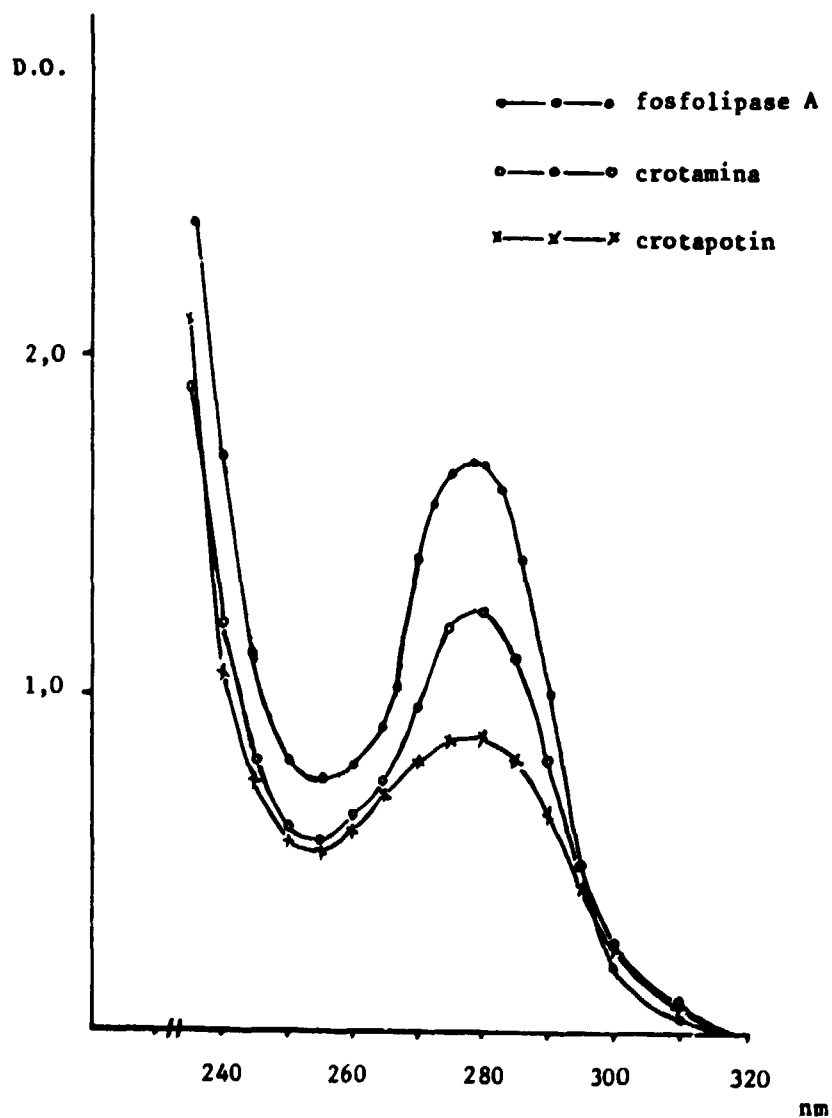


Figura 7 - Espectrofotometria. Foram Determinados Espectros de Absorção de Soluções de 1,0 mg de Crotopotin/ml, 1,0 mg de Fosfolipase A/ml e 0,5 mg de Crotamina/ml de Tampão Fosfato de Sódio pH 8,0, 0,05M

Tabela II

Determinação da DL₅₀ de Fosfolipase A, Crotoxina e Crotamina

diluições a partir de 100 µg/ml	% de mortalidade em 24 h		
	fosf. A	crotox.*	crotam.
1/1	100	100	100
1/2	83,3	83,3	83,3
1/4	64	83,3	50
1/8	3,2	66,6	0
1/16	0	0	0
proteínas			DL ₅₀ mg/kg
crotapotin**			> 280 (i.v.)
fosfolipase A			0,5 (i.p.)
crotoxina			0,1 (i.p.)
crotamina			0,7 (i.p.)

* crotapotin + fosfolipase A

** resultados obtidos por Breithaupt et al⁽¹⁰⁾As DL₅₀ foram determinadas em camundongos, segundo Reed & Muench⁽⁵⁷⁾

BREITHAUPT⁽¹⁰⁾, assim, a crotapotin apresenta $DL_{50} > 280$ mg/kg; a fosfolipase A = 0,5 mg/kg; a crotamina = 0,7 mg/kg; a crotoxina = 0,1 mg/kg.

5 – Grupos Sulfidrídricos Livres na Crotamina, Crotapotin e Fosfolipase A

A reação colorimétrica de Ellman, tanto para determinar os grupos sulfidrídricos livres expostos à superfície, quanto para os -SH "embutidos", através da adição de uréia 10,0 M, revelou a inexistência de grupos dosáveis nas proteínas estudadas. Essa reação foi acompanhada pela dosagem de -SH no padrão de cisteína.

6 – Atividade Enzimática de Fosfolipase A

A curva de hemólise apresentada pela dosagem indireta da atividade de fosfolipase A está representada na Figura 8.

7 – Fator Coagulante

Os testes para fator coagulante foram negativos para todas as amostras ensaiadas.

C – Reações de Interação de Crotapotin, Fosfolipase A e Crotoxina com Soro Anticrotálico do Instituto Butantan

A reação de imunoprecipitação quantitativa foi descrita desde há muito tempo por Bier para veneno bruto^(5,6), e, mais recentemente tem sido reportada a determinação qualitativa para fosfolipase A e crotapotin^(30,31) onde descreveram a falta de reatividade da crotapotin com soro anticrotálico.

A Tabela III e a Figura 9 dizem respeito à determinação quantitativa das interações antígeno-anticorpo da toxina mais potente do veneno de cascavel e suas subunidades. A Tabela III esquematiza o procedimento adotado na imunoprecipitação segundo K ABAT⁽³⁶⁾ para obter curvas de precipitina. A Figura 9 representa a curva de precipitação crotoxina-soro anticrotálico e fosfolipase A-soro anticrotálico onde se verifica a não identidade de curvas denotando que a atividade imunológica de crotoxina parece não se dever somente à fosfolipase A. O máximo de precipitação se obtém quando se junta 0,2 mg de crotoxina a 0,2 ml de soro e 0,4 mg de fosfolipase A para mesma quantidade de soro. Verifica-se que não foi possível quantificar a reação crotapotin – soro anticrotálico.

A Figura 10 representa curvas de imunoprecipitação das interações antígeno-anticorpo para as seguintes misturas; 1 crotapotin + 1 fosfolipase A; 2 crotapotin + 1 fosfolipase A; 1 crotapotin + 2 fosfolipase A contra soro anticrotálico. A curva que mais se aproxima à da crotoxina é aquela em que a mistura crotapotin: fosfolipase A está em proporção molar 1:1, apresentando precipitação máxima com antígeno (crotapotin + fosfolipase A) na concentração de 0,2 mg para 0,2 ml de soro.

A curva de imunoprecipitação quando se absorve o soro anticrotálico com crotapotin e se adiciona quantidades iguais de fosfolipase A aos sobrenadantes está expressa na Figura 11, observando-se que nas amostras onde reagiu menos crotapotin há formação de maior quantidade de precipitado.

As Figuras 12a e 12b correspondem às curvas obtidas da absorção de soro anticrotálico com crotapotin ou fosfolipase A e adição posterior do outro antígeno aos mesmos tubos iniciais, mostrando que a curva de precipitação tanto em 12a como 12b se assemelham à da fosfolipase A, apresentando um máximo de precipitação com 0,4 mg de antígeno para 0,2 ml de soro anticrotálico.

Resultados da utilização de crotapotin^{125I}, para confirmar a formação do complexo solúvel crotapotin-anticrotálico por eletroforese em papel, estão na Figura 13. Observa-se que a crotapotin^{125I}

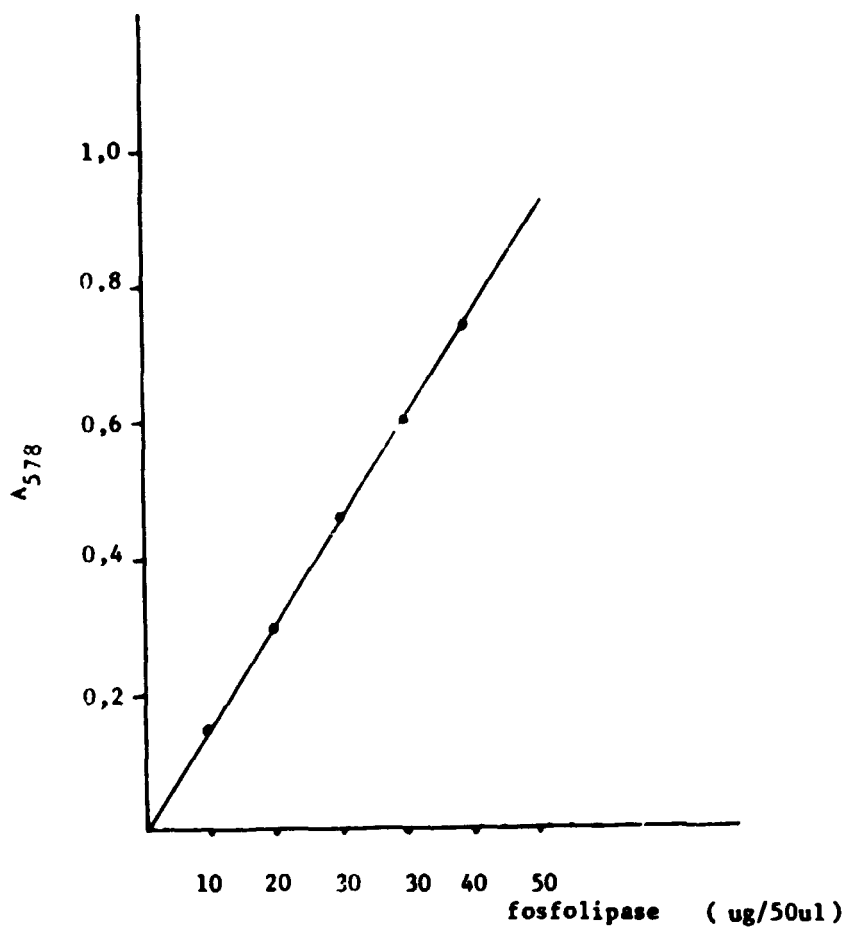


Figura 8 - Atividade Enzimática de Fosfolipase A. 50 μ l de Fosfolipase A foram Incubados com 50 μ l de Gema de Ovo Durante 1 hora a 37°C. Adicionou-se 4,9 ml de Hemácias a 0,6% e Incubou-se Durante 50 min a 37°C. Após Centrifugação, os Sobrenadantes foram Determinados Espectrofotometricamente

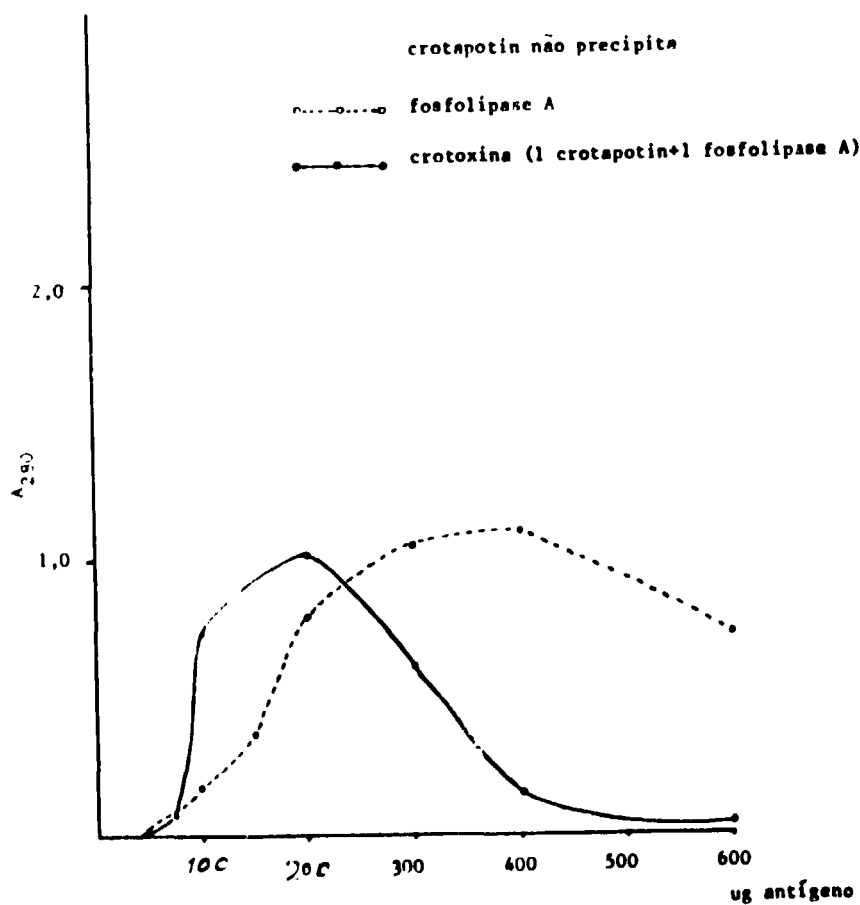


Figura 9 - Curvas de Precipitina. As Reações de Crotopotina, Fosfolipase A, Crotoxina foram Realizadas com 0,2 ml de Soro Anticrotálico do Instituto Butantan, em Meio Tampão Fosfato pH 7,0, 0,1M, Incubando as Amostras por 1 hora a 37°C mais 24 horas a 0°C. Os Precipitados foram Determinados Espectrofotometricamente

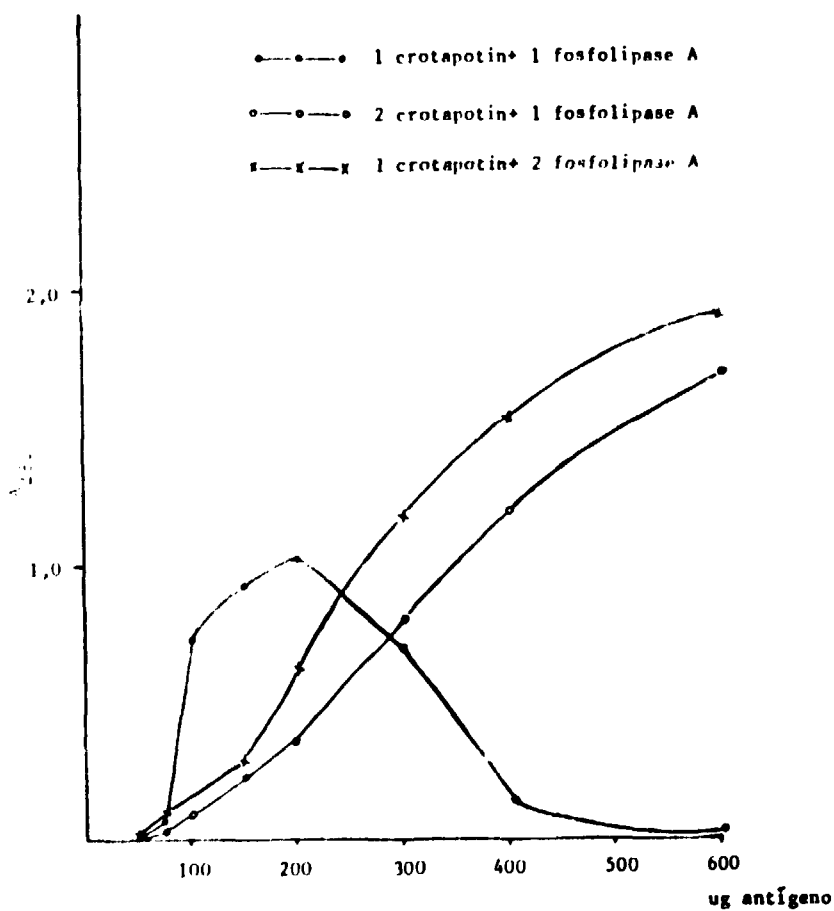


Figura 10 – Curvas de Precipitina. Os Produtos de Interação Crotopotina: Fosfolipase A foram Reagidos com Soro Anticrotálico de Instituto Butantan, em Meio Tampão Fosfato pH 7,0, 0,1M, com Incubação de 1 hora a 37°C e 24 horas a 0°C. Os Precipitados foram Quantificados Espectrofotometricamente

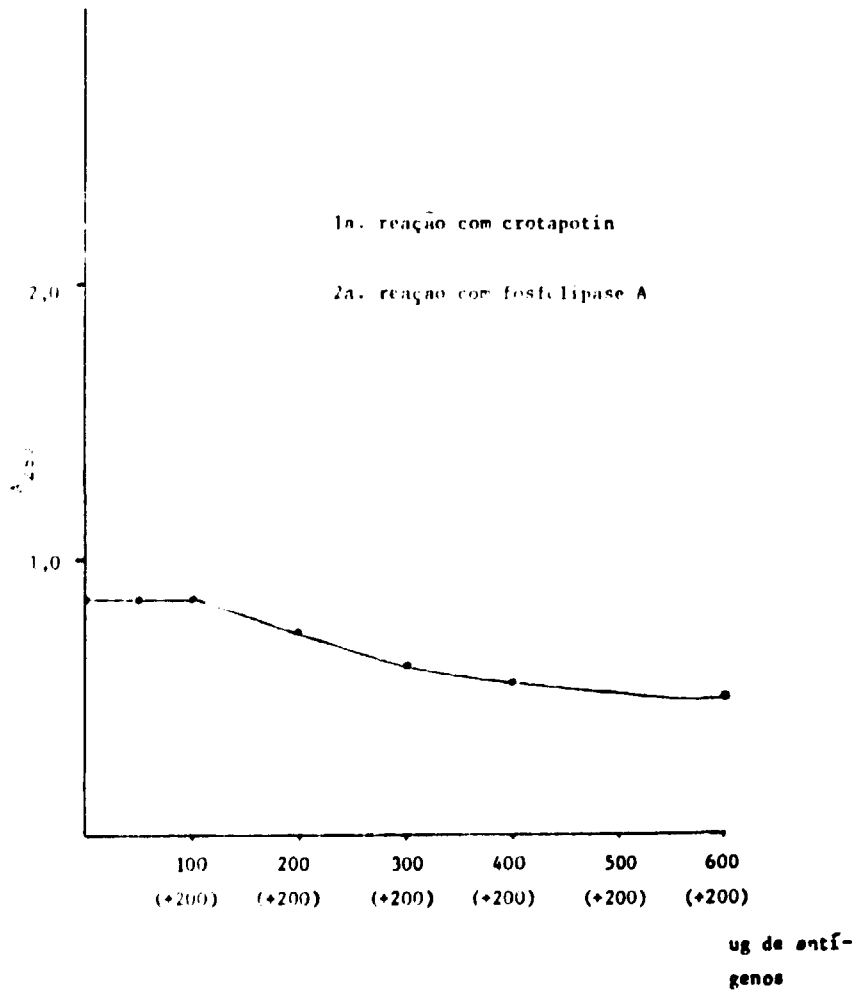


Figura 11 - Curva de Precipitina

0,2 ml de Soro Anticrotálico foram Absorvidos em 1ª Reação com Quantidades Crescentes de Crotapotin Durante 1 hora a 37°C e mais 24 horas a 4°C. 2ª Reação - foram Juntados 200µg de Fosfolipase A em Todas as Amostras, Incubando 1 h a 37°C e 24 h a 4°C. Os Precipitados foram Determinados a 280 nm

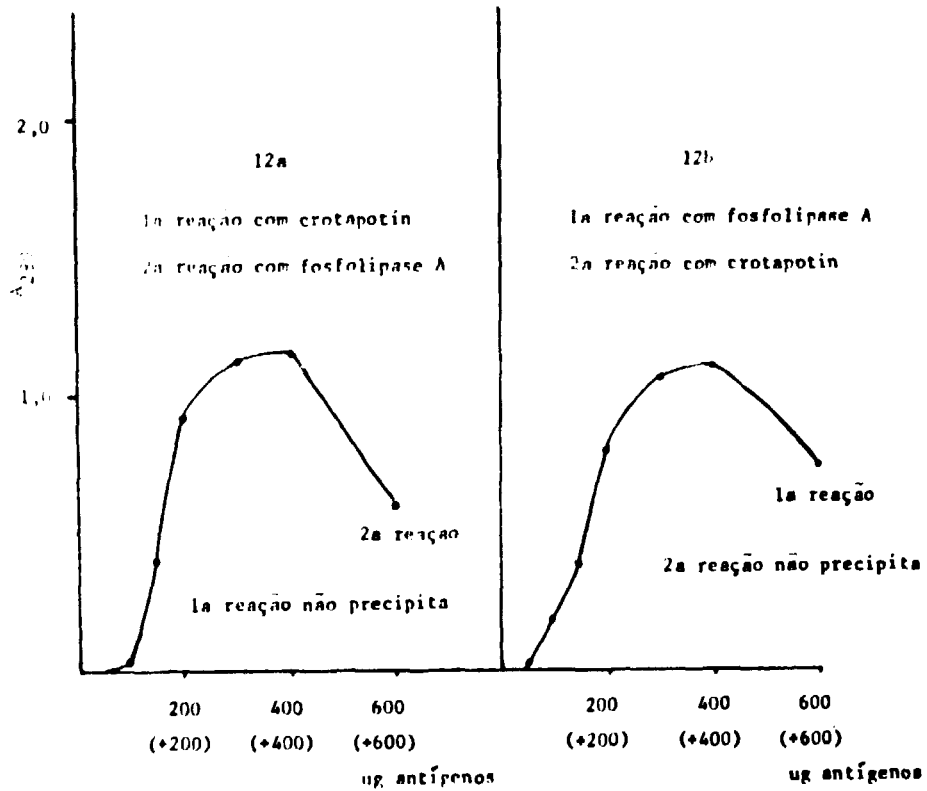


Figura 12 - Curva de Precipitina. 0,2 ml de Soro Anticrotálico foram Absorvidos em 1a Reação com Crotopotín (não Precipita) ou Fosfolipase A, em Quantidades Crescentes por 1 h a 37°C e 24 h a 4°C. 2a Reação - aos Sobrenadantes da 1a Reação foram Adicionadas Quantidades Crescentes de Outro Antígeno, Incubando-se por 1 h a 37°C e 24 h a 4°C. Os Precipitados foram Lavados e Determinados Espectrofotometricamente

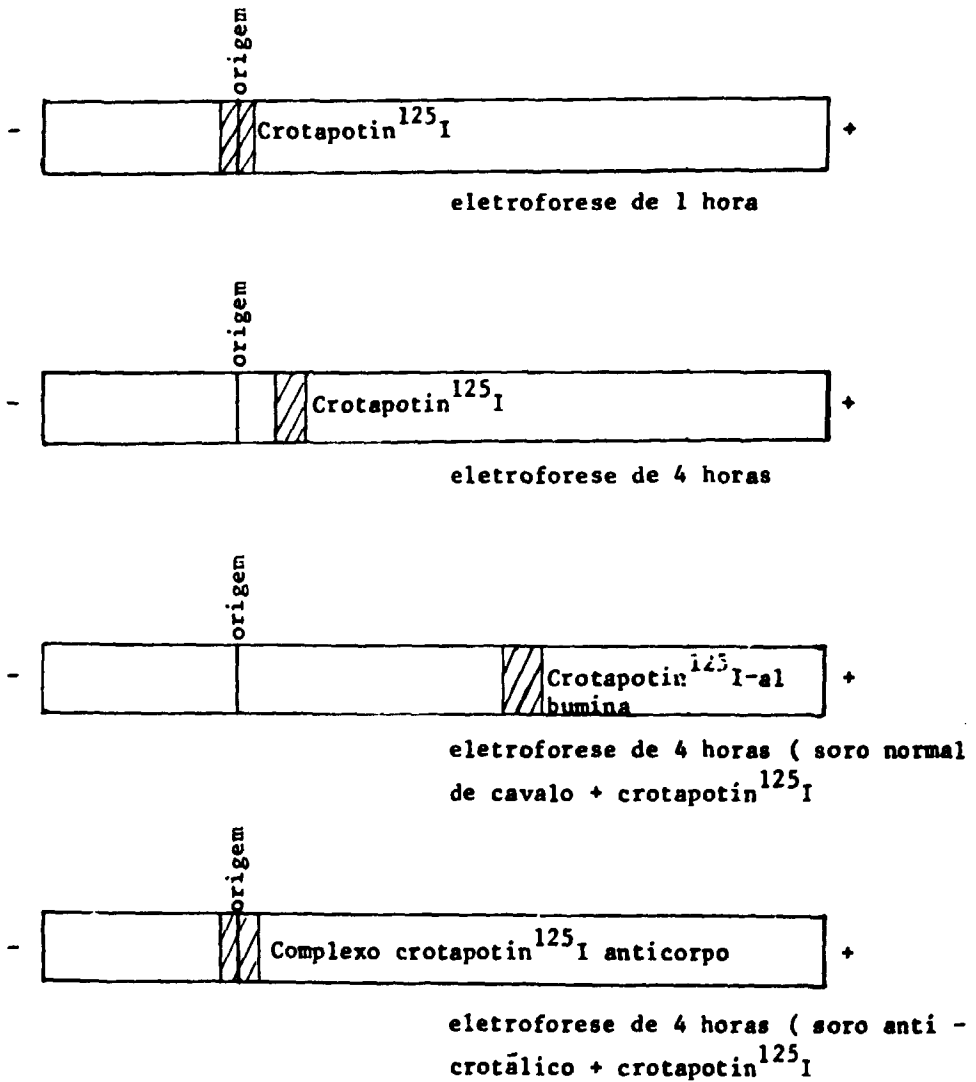


Figura 13 - Prova da Formação do Complexo Crotopotin-Anticrotálico
 Eletroforeses foram Desenvolvidas em Tampão Fosfato de Sódio pH 7,0, f.i. 0,25, Utilizando Tiras de Papel Whatman nº 1, 2,5 cm X 33 cm. Após Secagem, as Fitas Foram Coradas e Contadas para Localização das Proteínas

Tabela III

Esquema das Reações de Precipitina

tubos nº	antígeno µg(1mg/ml)	tampão fosfato µl	anticorpo µl
1	—	800	200
2	50	750	200
3	75	725	200
4	100	700	200
5	150	650	200
6	200	600	200
7	300	500	200
8	400	400	200
9	600	200	200
10	600	400	—

As reações, segundo o esquema, foram levadas a efeito por 1 hora a 37°C e mais 24 horas a 4°C, centrifugados a 2000 rpm por 10 minutos, os precipitados lavados 3 vezes em tampão fosfato pH 7,0, 0,1M, 4°C, dissolvidos em 1 ml de NaOH 0,1N e determinados a 280 nm.

está pura, isenta de ^{125}I Na e outras impurezas apresentando migração de 1 cm da origem, em 4 horas de eletroforese nas condições efetuadas. A crotapotin ^{125}I incubada com soro normal de cavalo se liga à albumina, ao passo que na presença de soro imune o complexo crotapotin ^{125}I - anticorpo permanece na linha de semeadura após corrida eletroforética de 4 horas.

A Figura 14 representa reações de interação antígeno-anticorpo realizadas por imunodifusão em placas de agarose usando soro anticrotálico do Instituto Butantan. Nota-se a diferença na linha de precipitação de crotoquina e fosfolipase A. A não formação de precipitado crotapotin-soro anticrotálico é também evidenciada. A linha coincidente de crotoquina com a linha formada na interação 1 crotapotin: 1 fosfolipase A vem reforçar os dados obtidos na reação de precipitação, fazendo supor que crotoquina é realmente formada por 1 mol de crotapotin e 1 mol de fosfolipase A.

D – Interação de Crotapotin, Fosfolipase A e Crotoquina com Soros Específicos

A Figura 15 representa reação imunológica de soros específicos anticrotapotin, antifosfolipase A e anticrotoquina com antígenos correspondentes. As curvas são do tipo "coelho" apresentando todas elas as máximas quando se juntam 0,2 mg de antígeno com 0,2 ml de soro específico correspondente.

Os resultados da Figura 16 mostram que, embora os soros tenham sido preparados especificamente, se processam reações cruzadas mostrando a possibilidade da existência de determinantes antigênicos semelhantes ou comuns entre crotapotin e fosfolipase A.

A Figura 17 mostra curvas de precipitação obtidas na interação do soro anticrotoquina com fosfolipase A e com crotapotin (17a). Mostra, também, reações do mesmo soro primeiramente com quantidades crescentes de fosfolipase A ou crotapotin às quais numa segunda etapa foi adicionado mais antígeno (crotapotin ou fosfolipase A) aos sobrenadantes da primeira reação (Figura 17b). Observa-se que o soro anticrotoquina reage com crotapotin e com fosfolipase A. O soro anticrototínico absorvido com crotapotin continua reagindo com fosfolipase A; o mesmo soro absorvido com fosfolipase A ainda reage com crotapotin.

A determinação qualitativa em placas de imunodifusão das interações acima referidas se acha exposta na Figura 18, demonstrando a formação de linhas de precipitação de cada antígeno com seu soro específico e também a existência de reações cruzadas.

E – Interação Crotapotin – Crotamina

A Figura 19 representa a curva de reação quantitativa de crotapotin com seu soro específico e curvas das reações de interação de crotapotin com crotamina. A comparação entre as curvas mostra que a interação possível de crotapotin-crotamina deve ser 1 mol:1 mol e não deve mascarar os determinantes antigênicos de crotapotin no processo de ligação dessas duas proteínas. A Figura A3 também mostra a reação imunológica, em placas de agarose, da interação crotamina-crotapotin contra soro anticrotapotin observando que crotamina não reage com o soro, e, tanto o produto de interação de 1 mol de crotapotin: 1 mol de crotamina como 1 mol de crotapotin: 2 moles de crotamina dão a mesma linha de precipitação, semelhante à de crotapotin-soro anticrotapotin (Apêndice).

F – Carbamilação dos εAmino Grupo das Lisinas de Crotapotin e Fosfolipase A. Interações

A Figura 20 representa curva espectrofotométrica da absorção de crotapotin e fosfolipase A tratadas com cianato, não apresentando alterações dos espectros em relação a proteínas normais.

O resultado da análise de lisinas no analisador Beckman, Tabela IV, após carbamilação de crotapotin e fosfolipase A, indica uma diminuição de um resíduo de lisina na crotapotin e dois resíduos na fosfolipase A em relação às proteínas normais.

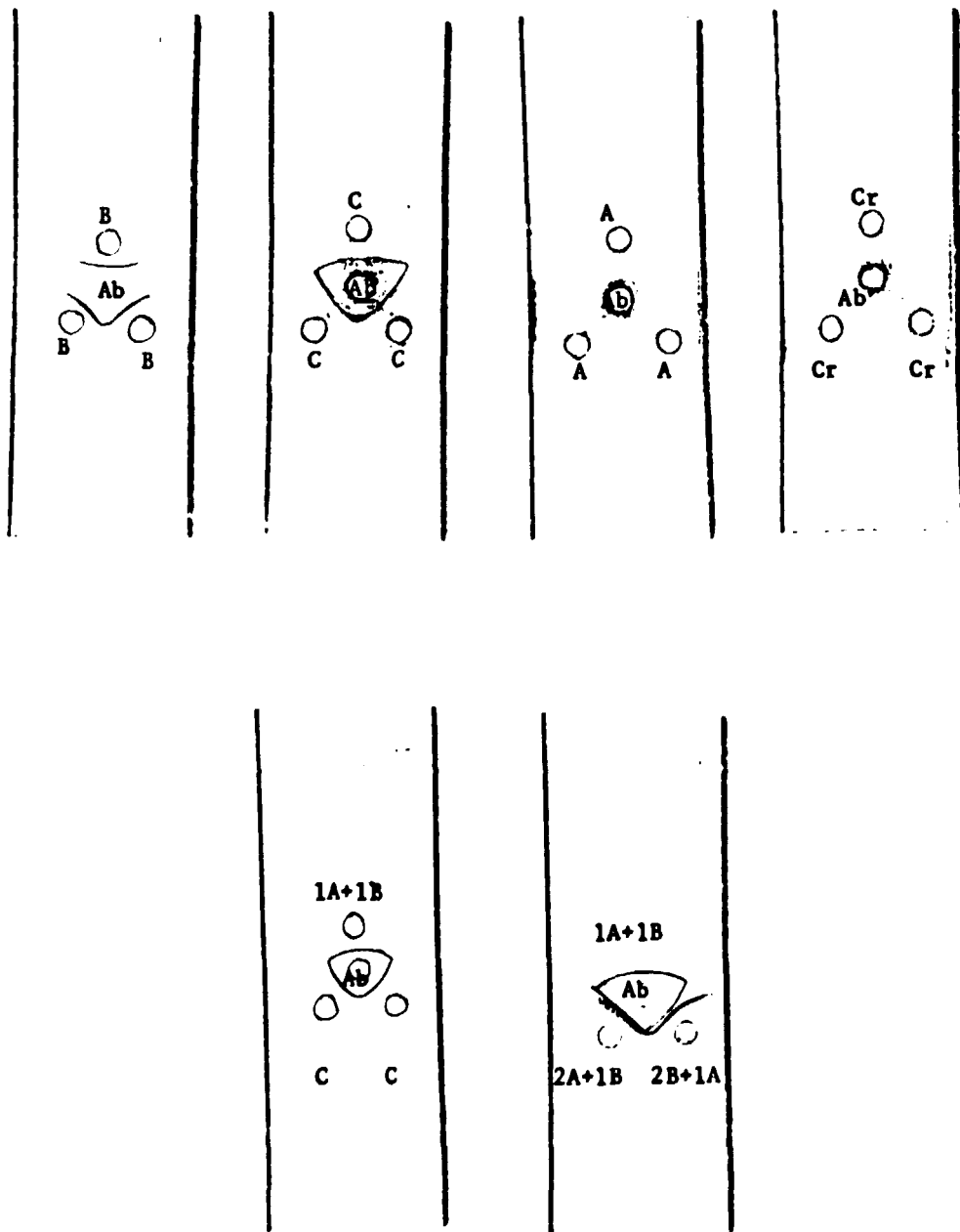


Figura 14 - Imunodifusão Dupla Radial em Agarose a 2% Usando Lâminas de Microscópio. Material Utilizado: Crotapotin (A), Fosfolipase A (B), Crotoxina (C), Crotamina (Cr), Soro Anticrotálico (Ab). Após Difusão por 24 horas a Temperatura Ambiente, as Lâminas foram Secadas e Coradas com Negro de Amido

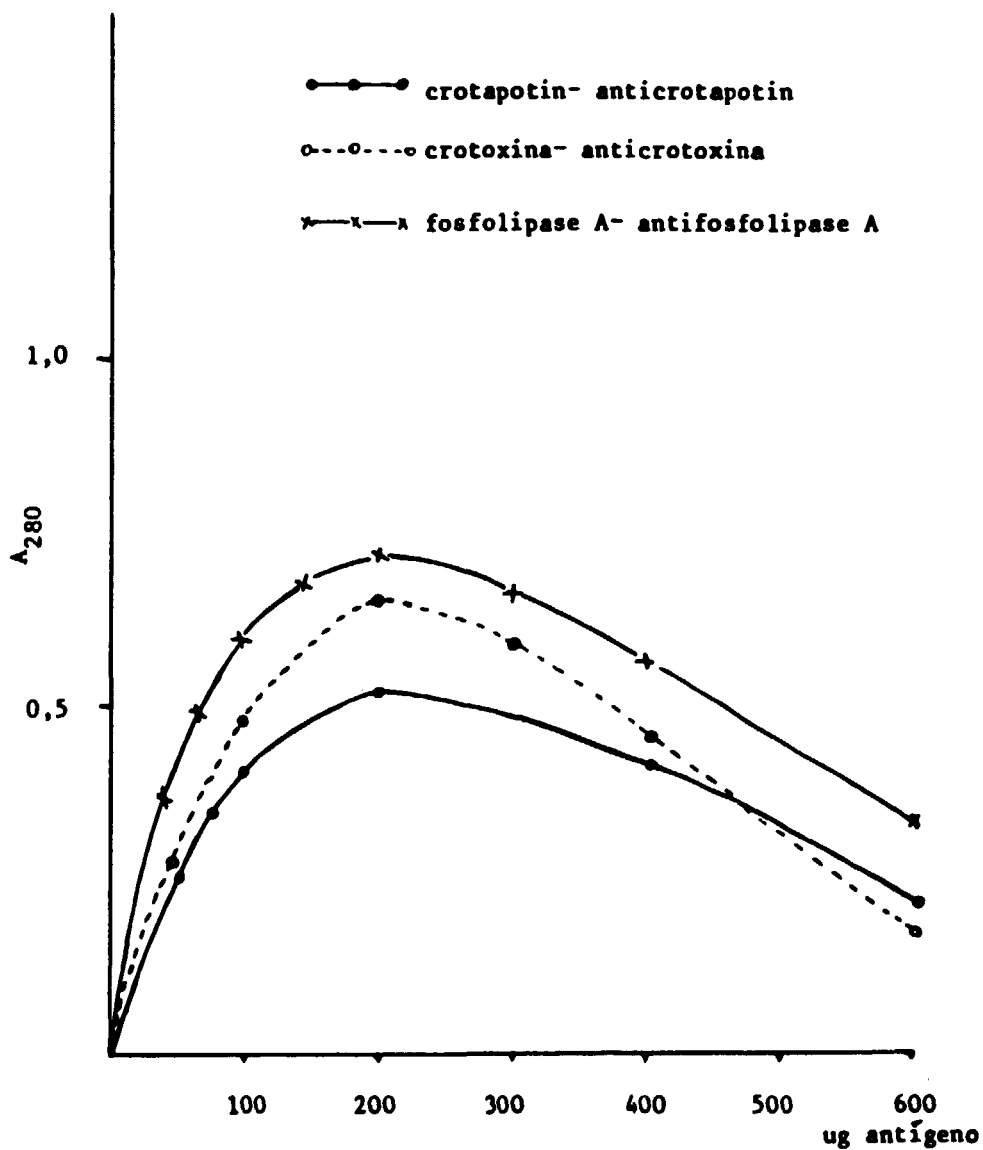


Figura 15 - Curvas de Precipitina. Crotopotina, Fosfolipase A e Crotoxina foram Incubadas com Soros Específicos Produzidos em Coelhos. As Reações foram Realizadas em Tampão Fosfato pH 7,0, 0,1M, Incubadas a 37°C por 1 h e a 0°C por 24 h. Os Precipitados Lavados foram Quantificados Espectrofotometricamente

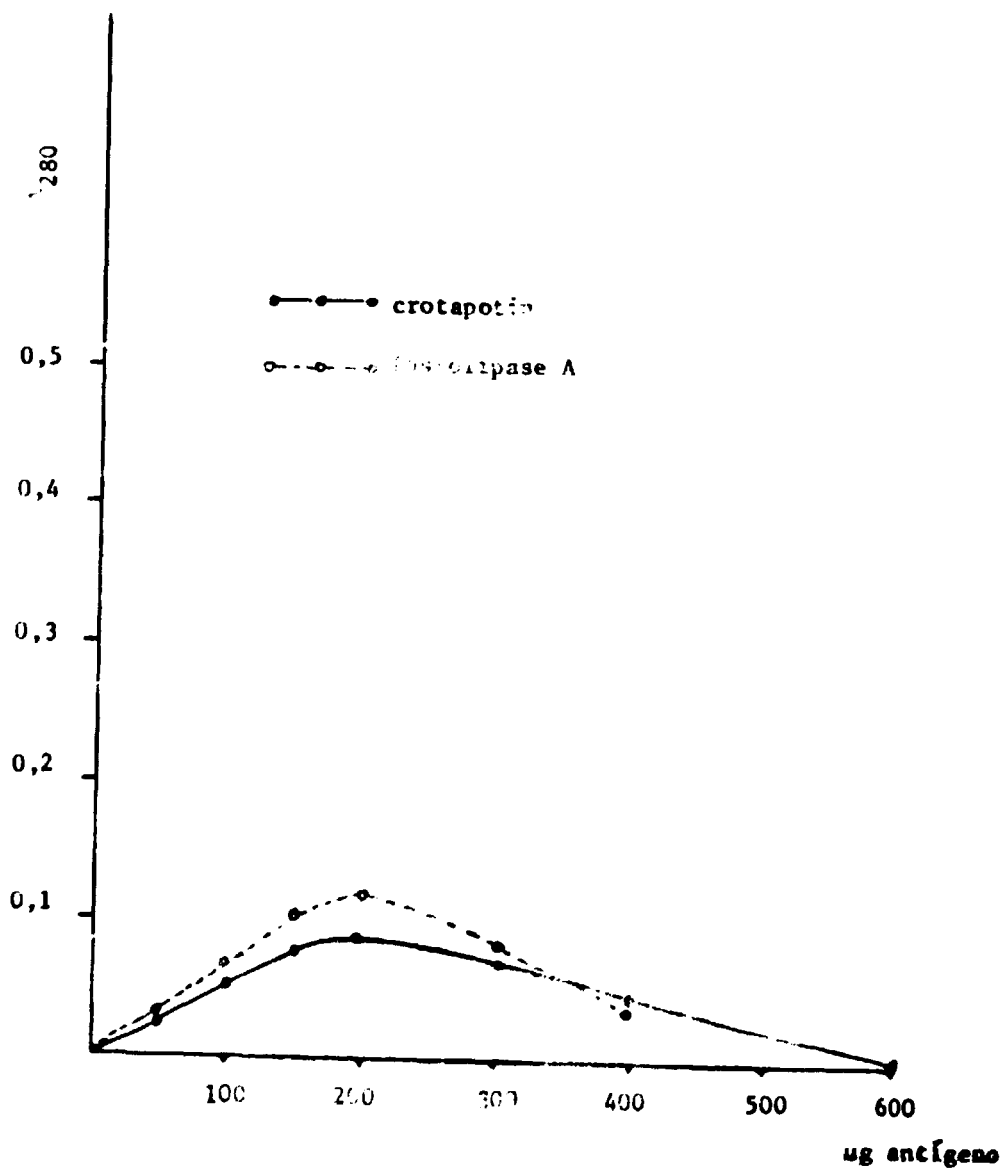


Figura 16 - Reação Cruzada

A Crotapotin foi incubada com 0,2 ml de Soro Antifosfolipase A e a Fosfolipase A foi incubada com 0,2 ml de Soro Anticrotapotin, Durante 1 h a 37°C e mais 24 horas a 4°C . Os Precipitados, Após Lavagem, foram Determinados Espectrofotometricamente

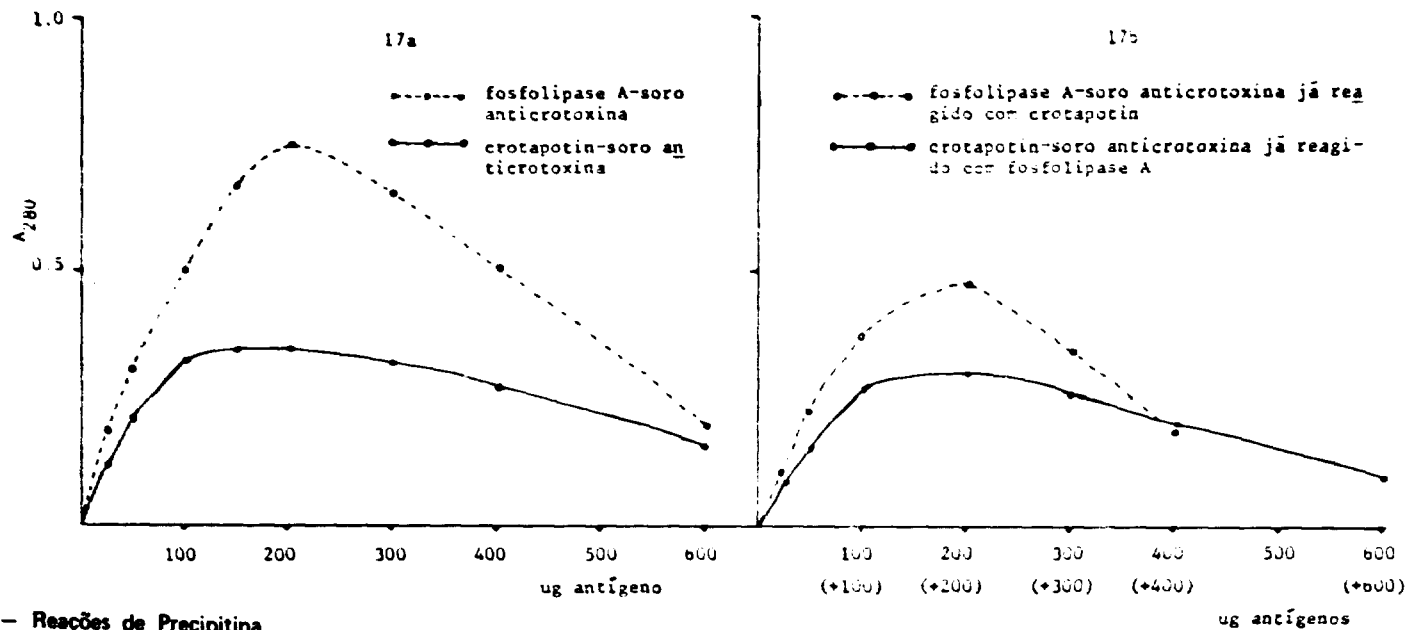


Figura 17 – Reações de Precipitina

17a – Crotapotin e Fosfolipase A com 0,2 ml de Soro Anticrotóxina foram Reagidas em Tampão pH 7,0, 0,1M, por 1 hora a 37°C e mais 24 horas a 4°C.

17b – 1a Reação Crotapotin ou Fosfolipase A com 0,2 ml de Soro Anticrotóxina, nas Mesmas Condições de 17a. A 2a Reação aos Sobrenadantes da 1a Reação Juntou-se Fosfolipase A ou Crotapotin, Incubando 1 h a 37°C e 24 h a 4°C. Os Precipitados foram Quantificados Espectrofotometricamente

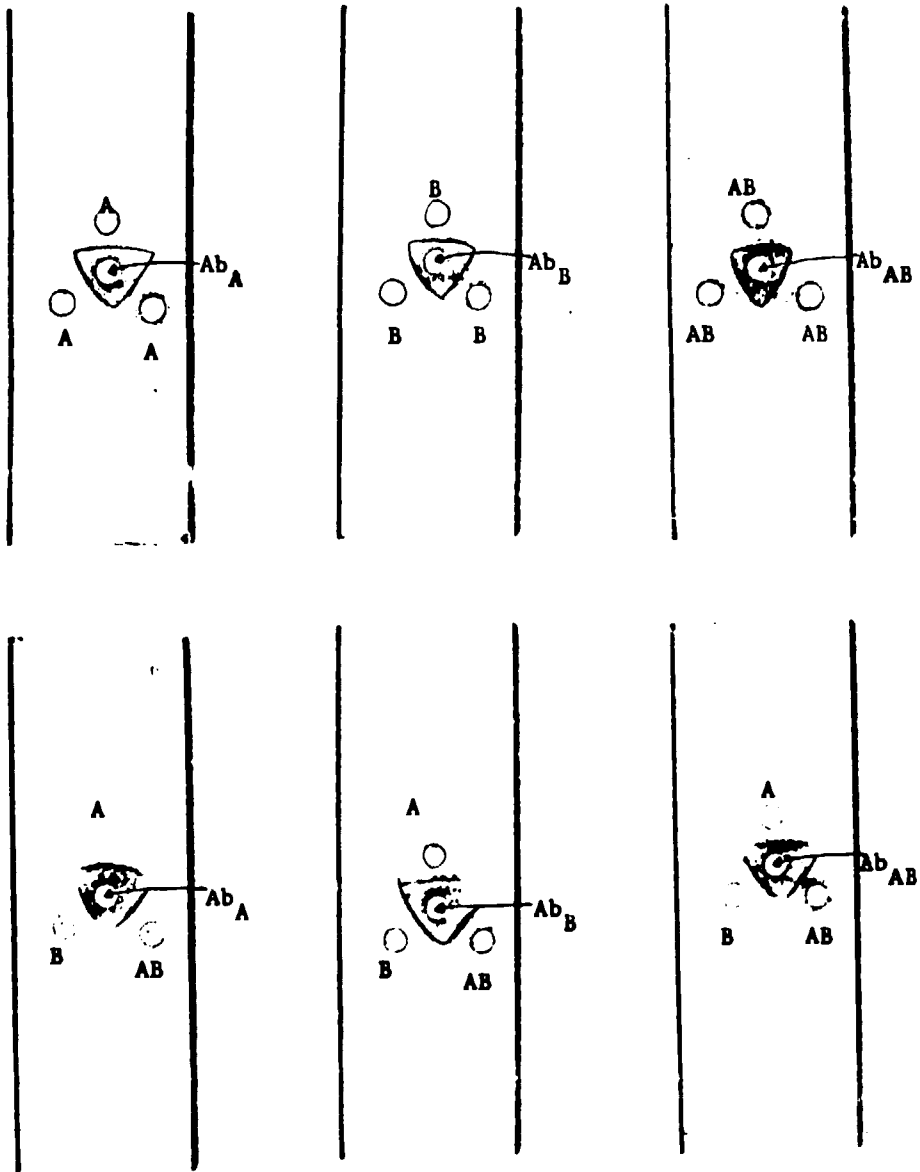


Figura 18 -- Imunodifusão Dupla Radial -- em Placas de Agarose a 2% em Tampão Fosfato pH 7.0, 0,1M.: Crotoxina (AB), Crotopotín (A), Fosfolipase A (B), Soro Anticrotoxina (Ab_{AB}) Soro Anticrotopotín (Ab_A) e Soro Antifosfolipase (Ab_B). As lâminas, após Lavagem e Secagem, Foram Coradas com Negro de Amido

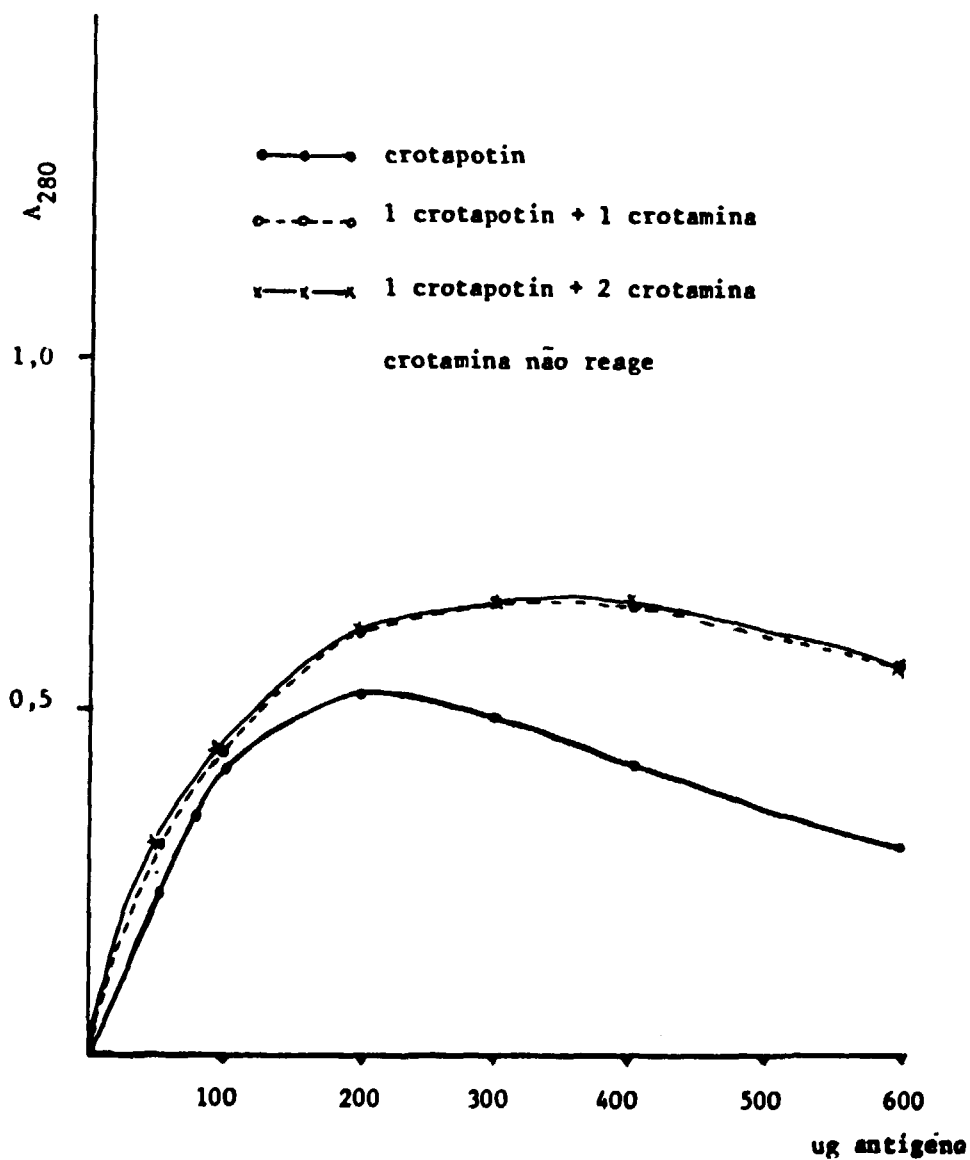


Figura 19 - Curvas de Imunoprecipitação. Reação dos Produtos de Interação Crotapotin-Crotamina Contra Soro Anticrotapotin. As Amostras foram Incubadas em Tampão Fosfato pH 7,0, 0,1M, por 1 h a 37°C e mais 24 h a 0°C. Os Precipitados foram Determinados Espectrofotometricamente

Tabela IV

Determinação de Lisinas em Crotopotin e Fosfolipase A Carbamiladas

proteínas	nº de resíduos de lisinas*
crotopotin	2
crotopotin carbamilada	1
fosfolipase A	9
fosfolipase A carbamilada	7

* os resultados são médias de três determinações

A determinação foi realizada em analisador de aminoácidos, coluna básica, após hidrólise ácida de 10 horas em meio HCl 6N.

A Tabela V expressa os dados obtidos na imunoprecipitação da crotapotin carbamilada com soro anticrotapotin e imunoprecipitação do produto de interação de crotapotin carbamilada com fosfolipase A. Nota-se a influência da carbamilação na reação de crotapotin com soro específico, determinando acentuada queda de precipitação. Percebe-se ainda que o resultado da interação de crotapotin carbamilada com fosfolipase A comporta-se diferentemente da crotoxina normal.

No caso da fosfolipase A, apenas duas lisinas foram modificadas com oito horas de carbamilação, sem possibilidade de prolongar o tempo de reação, pois, ocorre precipitação da enzima. Como os resultados dos ensaios enzimáticos e imunológicos da enzima carbamilada não se mostraram diferentes dos da fosfolipase A normal, as conclusões permanecem indefinidas.

G – Bloqueio de Argininas de Crotapotin e Fosfolipase A. Interações

A Figura 21 ilustra a atividade enzimática da fosfolipase A em função do tempo de reação com fenilglicoxal em diferentes pH mostrando uma nítida queda de atividade a pH 8 em 5 minutos de reação, e, inativação total a 10 minutos. A pH 6, mesmo 5 horas de reação não afeta a atividade enzimática da proteína.

A Tabela VI representa a porcentagem de argininas dosadas com reativo de Sakaguchi em função do tempo e pH de reação, permitindo-se calcular as argininas de fosfolipase A bloqueadas com fenilglicoxal, e, observa-se que a pH 8 com 5 horas de reação, o bloqueio de argininas é de mais de 90%, ao passo que a pH 6, mesmo 5 horas de reação causa bloqueio de menos de 40%.

A Figura 22 mostra exatamente essas curvas de dosagem de grupo guanidino das argininas da enzima em diferentes tempos e pH de reação.

A Figura 23 representa curvas de absorção apresentadas por crotapotin e fosfolipase A quando tratadas com fenilglicoxal, em vários pH, mostrando nítida modificação do espectro das duas proteínas e enfatiza a importância do pH para modificar proteínas com fenilglicoxal.

A imunoprecipitação quantitativa da fosfolipase A tratada com fenilglicoxal está representada na Tabela VII. A pH 6, até 5 horas de reação com fenilglicoxal, não modifica a precipitabilidade da proteína com soro específico, mas a pH 7 e 8 há alteração da imunorreatividade. Conforme os resultados constata-se a importância das argininas na atividade enzimática e imunológica da fosfolipase A.

A Tabela VIII mostra os resultados da imunoprecipitação da crotapotin bloqueada com fenilglicoxal em diferentes pH, não havendo modificação quer trate a proteína a pH 6, pH 7 ou pH 8.

H – Tirosinas na Interação Crotapotin-Fosfolipase A

Pela iodação da crotoxina com $^{131}\text{I}\text{Na}$, utilizando cloramina T, obteve-se crotoxina ^{131}I cuja reatividade com soro específico manteve inalterada quando comparada a crotoxina "fria". A Figura 24 mostra a curva de purificação da crotoxina ^{131}I através da coluna de Sephadex G-25, e, a curva de separação da crotoxina ^{131}I em crotapotin ^{131}I e fosfolipase ^{131}I por meio de resina de troca iônica DEAE Sephadex A-25.

O cálculo da radioatividade específica por mol de tirosina para crotapotin e para fosfolipase A, conforme resultados expressos na Tabela IX, demonstra que há sempre maior acessibilidade das tirosinas da fosfolipase A do que da crotapotin (na crotoxina) para a iodação.

Pelos resultados da Tabela X evidencia-se que a imunorreatividade da crotapotin e fosfolipase A não é alterada com a introdução de iodo nas moléculas de tirosina, o que é verificado também nas placas de imunodifusão (Figura A5).

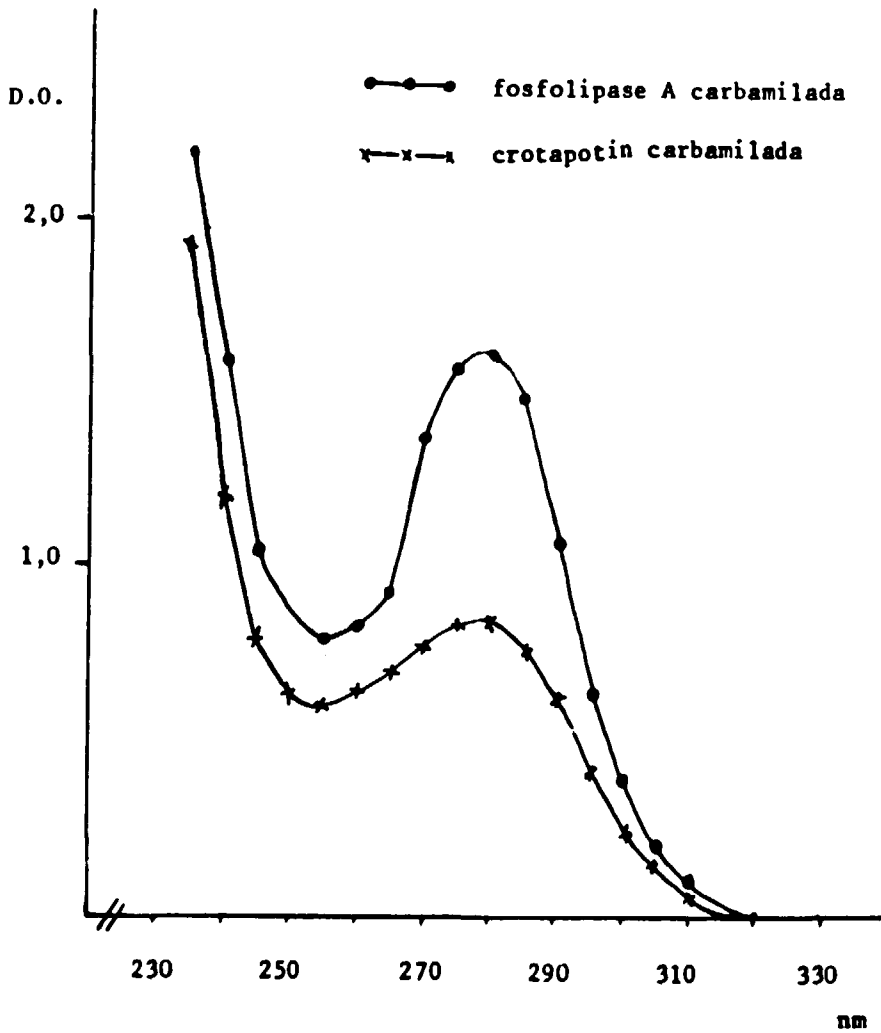


Figura 20 - Espectros de Absorção.

Fosfolipase A e Crotopotin foram Carbamiladas por 11 horas em pH 7,9, Utilizando Cianeto de Potássio em Tampão Fosfato

Tabela V

Imunoprecipitação das Proteínas Carbamiladas

µg de proteínas	D.O. a 280 nm			
	crotapotin		crotapotin + fosfolipase A	
	s/ carbamilar	carbamilada	crotap. s/ carbam.	crotap. carbamilada
0	0	0	0	0
100	0,415	0,238	0,480	0,350
200	0,520	0,320	0,650	0,445
300	0,490	0,290	0,595	0,500
400	0,425	0,245	0,455	0,470

Reações de crotapotin carbamilada ou sem carbamilar, com 0,2 ml de soro anticrotapotin ; reações de crotapotin (carbamilada ou não) e crotapotin (carbamilada ou não) + fosfolipase A com 0,2 ml de soro anticrotoxina, – foram realizadas em meio tampão fosfato pH 7,0, 0,1M, incubando 1 h a 37°C e 24 h a 4°C. Os precipitados foram determinados a 280 nm.

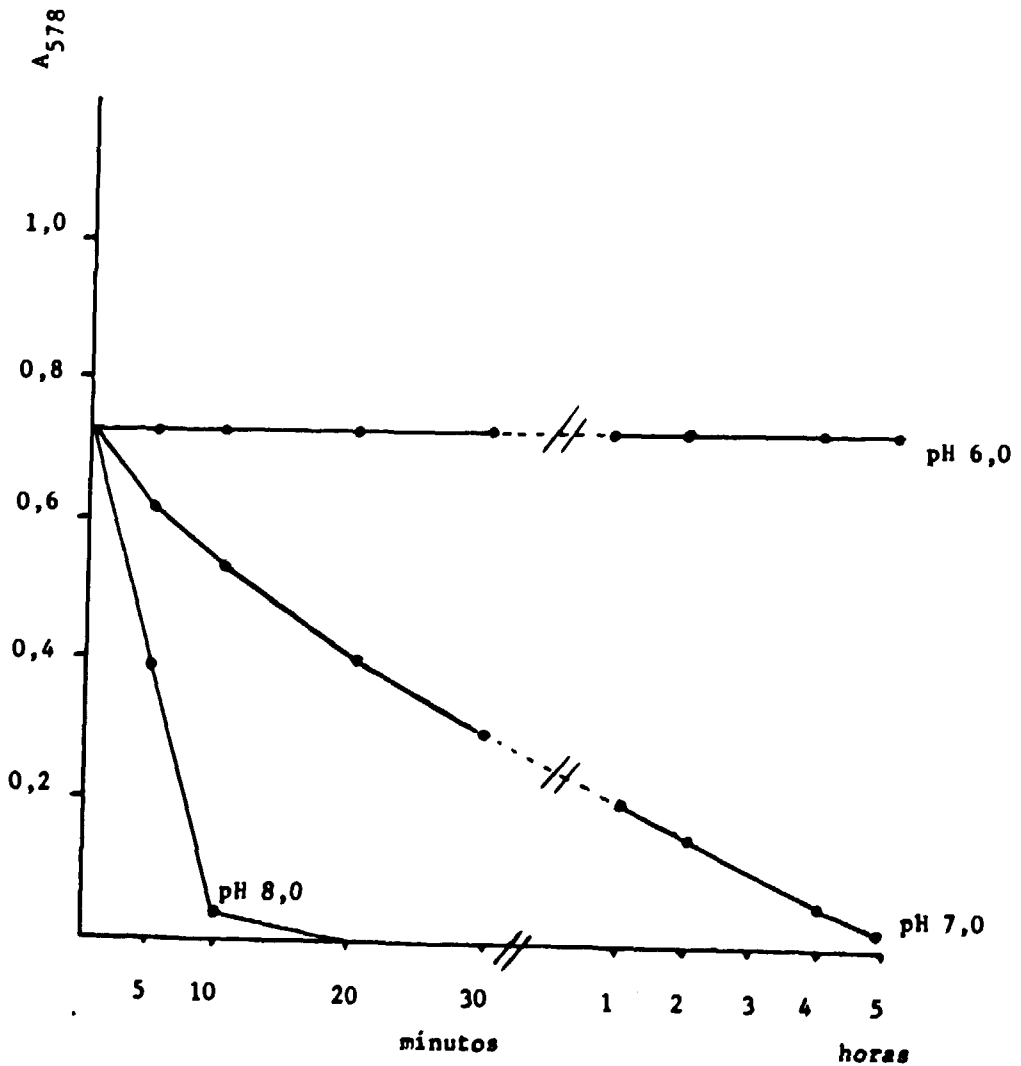


Figura 21 - Curvas de Inativação da Fosfolipase A, com Fenilgloxal em Função de Tempo e pH de Reação foi Determinada Incubando 50 μ l de Fosfolipase A, Tratada com Fenilgloxal, com Gema de Ovo a 37°C por 1 hora, Adicionando a Seguir 4,9 ml de Hemácias a 0,8%. Após Reação de 50 minutos a 37°C e Centrifugação, a Lise das Hemácias foi Determinada Espectrofotometricamente

Tabela VI

Dosagem de Argininas em Fosfolipase A Tratada com Fenilgloxal

tempo de reação	pH 8,0		pH 7,0		pH 6,0	
	D.O. _{520nm}	% Arg	D.O. _{520nm}	% Arg	D.O. _{520nm}	% Arg
0 min	0,088	80,38	0,105	96,89	0,126	100
5 min	0,084	77,68	0,101	93,30	0,126	100
10 min	0,082	75,11	0,098	89,71	0,125	100
20 min	0,076	71,70	0,098	89,71	0,120	100
30 min	0,068	62,20	0,094	86,12	0,110	100
1 hora	0,064	58,61	0,092	84,92	0,096	88,51
2 horas	0,055	43,88	0,078	69,18	0,090	84,08
5 horas	0,014	6,08	0,042	38,75	0,070	62,10

Grupos guanidinos livres, de argininas da fosfolipase A tratadas com fenilgloxal em diferentes pH e tempos de reação, foram dosados com reativo de Sakaguchi

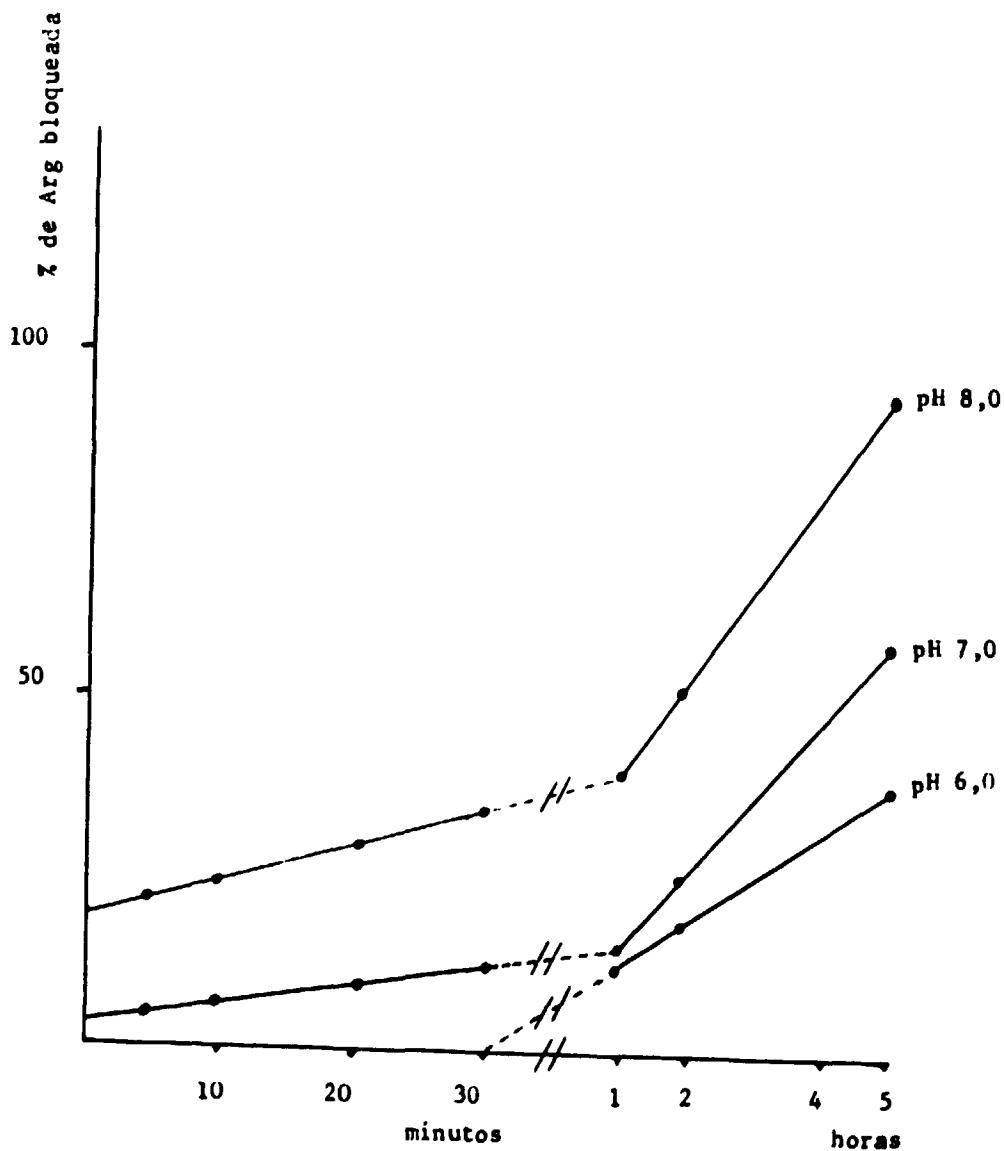


Figura 22 – Curva de Bloqueio de Argininas da Fosfolipase A com Fenilgloxal. Os Grupos Guanidinos Livres, Após o Bloqueio, foram Dosados com Reativo de Sakaguchi e foram Determinadas Porcentagens de Argininas Bloqueadas em Função do Tempo de Reação em Diferentes pH

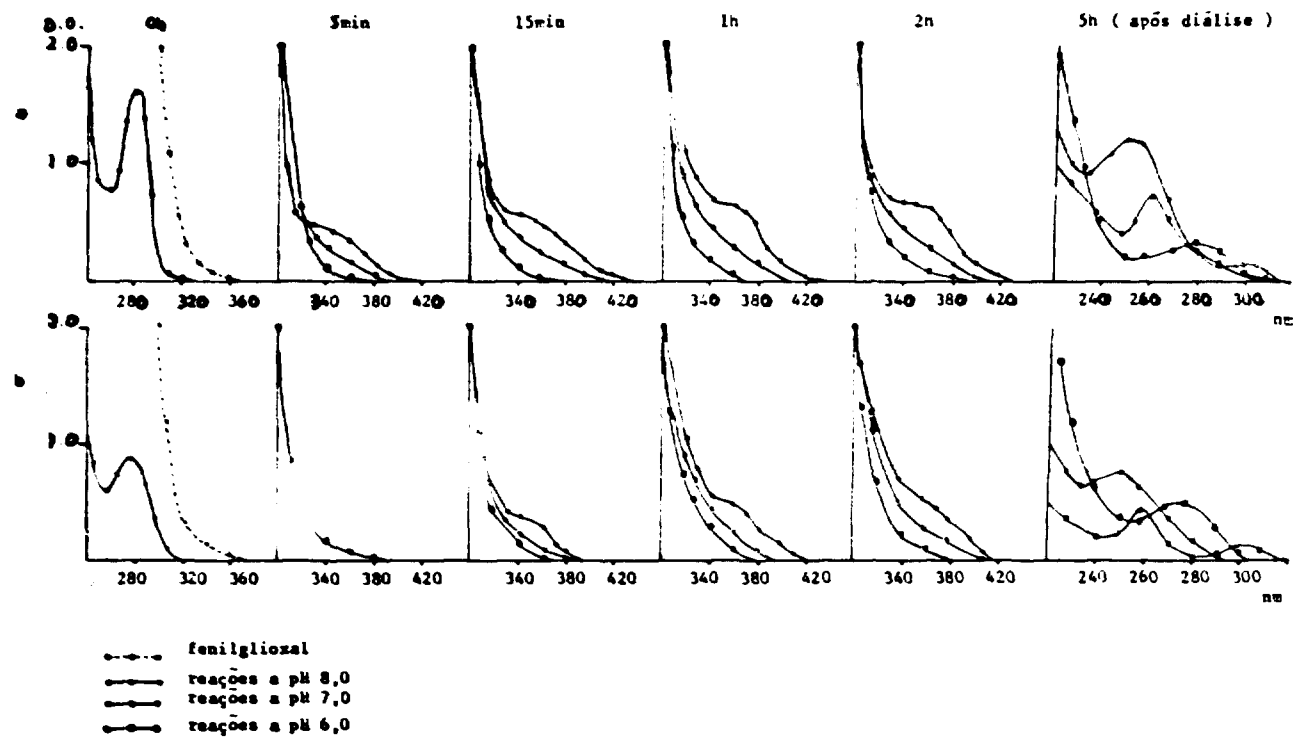


Figura 23 — Espectros de Absorção de Fosfolipase A e Crotopotin Tratadas com Fenilgloxal. Fosfolipase A (a) e Crotopotin (b) foram Reagidas com Fenilgloxal a pH 6,0, pH 7,0 e pH 8,0 e a 0, 5, 15 min e a 1, 2, 5 horas de Reação, foram Determinados Espectros de Absorção das Amostras.

Tabela VII

Imunoprecipitação de Fosfolipase A Tratada com Fenilgloxal

µg proteína	D.O. _{280nm}			
	fosfolipase A	fosfolipase A + fenilgloxal		
		pH 6	pH 7	pH 8
0	0	0	0	0
100	0,600	0,590	0,315	0
200	0,715	0,710	0,400	0,280
300	0,660	0,670	0,335	0,080
400	0,565	0,500	0,280	0

Reação de fosfolipase A, tratada com fenilgloxal durante 5 horas, foi realizada com tampão fosfato pH 7,0, 0,1M. O tempo de incubação foi de 1 hora a 37°C e mais 24 horas a 4°C. Os precipitados foram determinados espectrofotometricamente, após lavagens e dissolução em 1 ml de NaOH, 0,1N.

Tabela VIII

Imunoprecipitação da Crotopotin Tratada com Fenilgloxal

µg proteína	D.O. _{280nm}			
	crotopotin	crotopotin + fenilgloxal		
		pH 6	pH 7	pH 8
0	0	0	0	0
100	0,410	0,400	0,415	0,395
200	0,520	0,520	0,515	0,520
300	0,490	0,480	0,480	0,495
400	0,420	0,420	0,425	0,410

Reações de crotopotin tratada com fenilgloxal durante 5 horas, foram realizadas com 0,2 ml de soro anticrotopotin em meio tampão fosfato pH 7,0, 0,1M. A incubação foi de 1 hora a 37°C e 24 h a 4°C. Os precipitados foram determinados espectrofotometricamente.

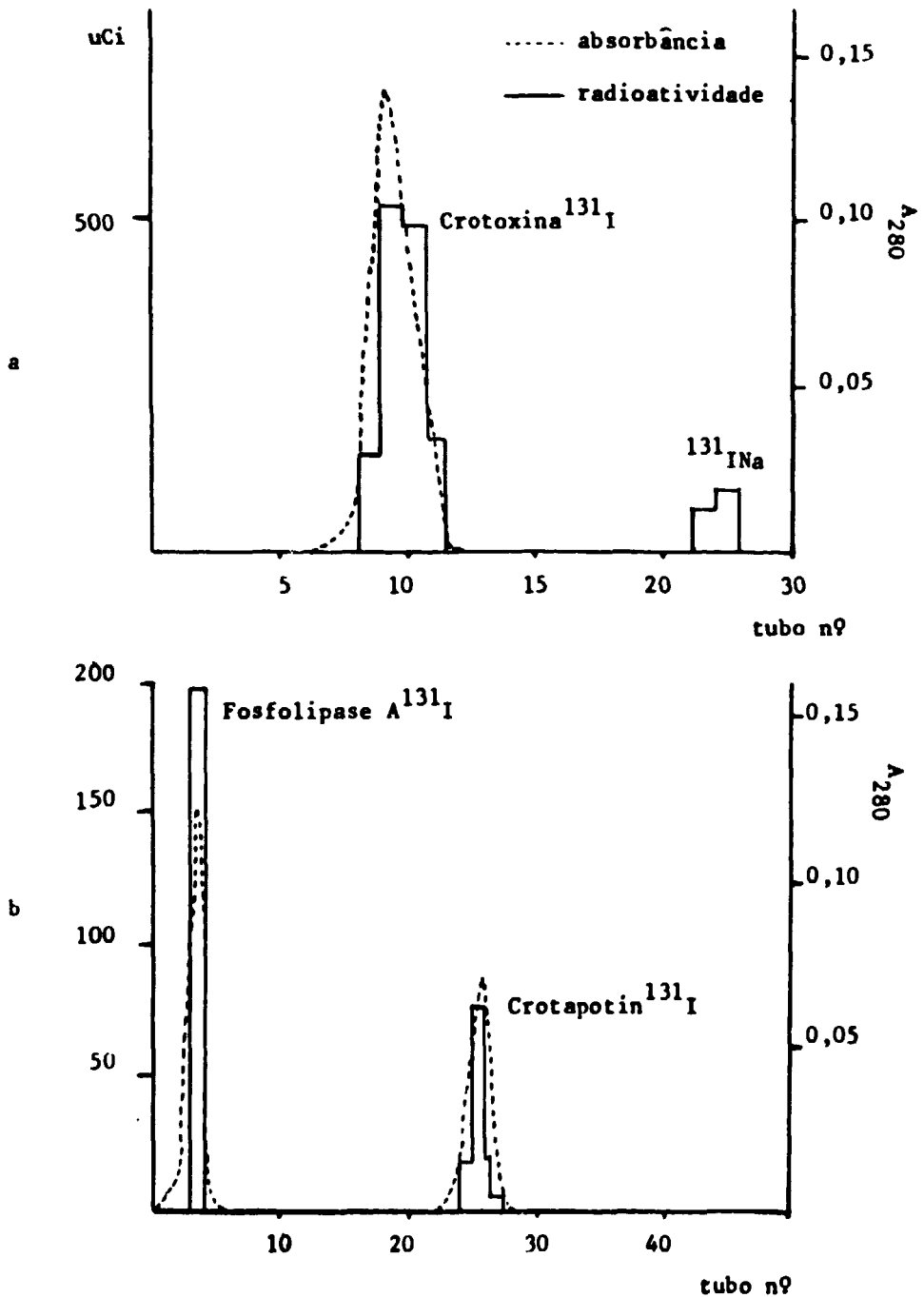


Figura 24 - Curvas de Purificação de Crotoxina ^{131}I e Sua Separação em Fosfolipase ^{131}I e Crotopotin ^{131}I .

a - 10 mg de Crotoxina Radioiodada foram Passados por Sephadex G-75, Coluna de 0,9 cm x 30 cm, e Eluídos com Tampão Fosfato, pH 7,0, 0,1M.

b - A Crotoxina de a. foi Passada por Sephadex DEAE A-25 e Eluída com Tampão Formiato e NaCl

Tabela IX

Determinação de Radioatividade/Tyr de Fosfolipase ¹³¹I e Crotapotin ¹³¹I, Após Irradiação de Crotoxina

proteínas	ensaio	radioatividade	radioatividade	Tyr	radioatividade	eficiência marcação
	nº	total µCi/proteína	específica µCi/µmol proteína	µg/ml	específica µCi/µmol Tyr	Tyr fosf A/Tyr crotap
crotoxina	1	380	320	4,7	5,6	—
	2	720	415	4,1	7,9	—
	3	1370	723	3,8	9,9	—
fosfolipase	1	225	246	1,4	8,0	2,5
	2	370	281	3,2	11,2	2,5
	3	520	468	6,5	14,1	2,5
crotapotin	1	87	78	1,6	3,2	—
	2	150	94	2,0	4,6	—
	3	210	113	2,1	5,8	—

A crotoxina foi separada em seus componentes protéicos, após iodação, em fosfolipase ¹³¹I e crotapotin ¹³¹I. Foram determinadas radioatividades específicas em µ mol de Tyr pelo processo colorimétrico de Lowry⁽⁴⁰⁾, tendo sido realizada a determinação radioativa em medidor de dose Mediac.

Tabela X

Imunoprecipitação da Crotapotin ¹³¹I e Fosfolipase ¹³¹I

µg antígeno	D.O. _{280nm}			
	0,2 ml soro anticrotapotin		0,2 ml soro antifosfolipase A	
	crotapotin	crotapotin ¹³¹ I	fosfolipase A	fosfolipase A ¹³¹ I
0	0	0	0	0
100	0,410	0,415	0,600	0,605
200	0,520	0,520	0,715	0,730
300	0,490	0,485	0,660	0,660
400	0,420	0,430	0,565	0,540

As reações foram realizadas utilizando soros específicos para crotapotin e fosfolipase A, em meio tampão fosfato pH 7,0, 0,1M, com incubação de 1 hora a 37°C e 24 horas a 4°C. Os precipitados foram determinados a 280 nm.

I – Crotapotin e Fosfolipase A Irradiadas com ^{60}Co

As proteínas irradiadas com doses de 20, 50, 100, 200 e 500 (esta dose é válida somente para crotapotin) K rad apresentam curvas de absorção na ultravioleta, representadas na Figura 25, onde já a 100 krad se observa uma modificação nos espectros, provavelmente devido a alteração em triptofano e tirosina.

A Tabela XI representa dados imunológicos do material irradiado, revelando que a doses de irradiação empregadas não há modificação da atividade antigênica nem de crotapotin, nem de fosfolipase A.

Com 500K rad, há precipitação total da fosfolipase A pois, o sobrenadante não acusa absorção a 280 nm.

A Figura 26 representa a atividade enzimática da fosfolipase A irradiada sob diferentes doses, demonstrando que a queda da atividade depende da dose empregada, assim a 200 K rad, a atividade enzimática é reduzida de cerca de 25% nas condições estudadas.

4 – DISCUSSÃO

A – Purificação das Proteínas. Interações

Empregando processo de purificação em Sephadex, obtivemos frações protéicas cromatograficamente isentas de impurezas, Figura 1 a 5, que foram utilizadas para desenvolvimento deste trabalho. Os passos da separação foram seguidos por ensaios biológicos em camundongos para melhor discernir os picos que iam sendo separados. Assim, esses testes qualitativos estão em concordância com GONÇALVES⁽²¹⁾ para crotamina e MUSSATCHÉ et alii⁽⁴⁶⁾, HENDON et al.⁽³¹⁾, RUBSAMEN et alii⁽⁵⁹⁾ para crotoxina. Embora o processo de purificação utilizado não envolva método clássico de cristalização da crotoxina^(50,64) e apresente algumas modificações no fracionamento da crotoxina em subunidades crotapotin e fosfolipase A^(28,29,30,31), as proteínas por nós preparadas apresentam todas as exigências necessárias de um material puro, comprovadas por ensaios expressos em Tabelas I e II e Figuras 6, 7, 8.

A Tabela III, representação esquemática das reações de precipitina de acordo com K ABAT e MAYER⁽³⁶⁾, indica o procedimento adotado para determinar as curvas de precipitação. Na Figura 9 nota-se a não formação de precipitado entre crotapotin e soro anticrotálico do Instituto Butantan. Nos gráficos da precipitação quantitativa de fosfolipase A e crotoxina, pode-se observar nítidas zonas de excesso tanto de antígeno como de anticorpo e as curvas são do tipo "cavalo"⁽⁷⁾, como no caso do veneno bruto de cascavel. O deslocamento da curva de fosfolipase A, no ponto máximo de precipitação, em relação à da crotoxina, denota a participação da crotapotin na reação com o soro anticrotálico, mas não deixa margem a dúvidas quanto à maior participação da fosfolipase A na atividade imunológica da crotoxina.

Os dados apresentados para peso molecular de crotoxina e proporção real de interação quantitativa crotapotin:fosfolipase A são contraditórios^(10,11,12,31,35). Daí, tentou-se sanar as dúvidas por meio de reações imunológicas. Assim, a Figura 10 representa curvas de imunoprecipitação entre soro anticrotálico e interações crotapotin e fosfolipase A. A curva correspondente a interação 2 crotapotin + 1 fosfolipase A apresenta o máximo de precipitação deslocado para concentrações maiores de antígeno. Este tipo de curva ocorre quando o anticorpo é mal adaptado, ou seja: o antígeno (no caso 2 crotapotin + 1 fosfolipase A) não corresponde ao soro anticrotálico. A curva representante da região 1 crotapotin + 2 fosfolipase A também se apresenta com características de curva com anticorpo mal adaptado. Nesses

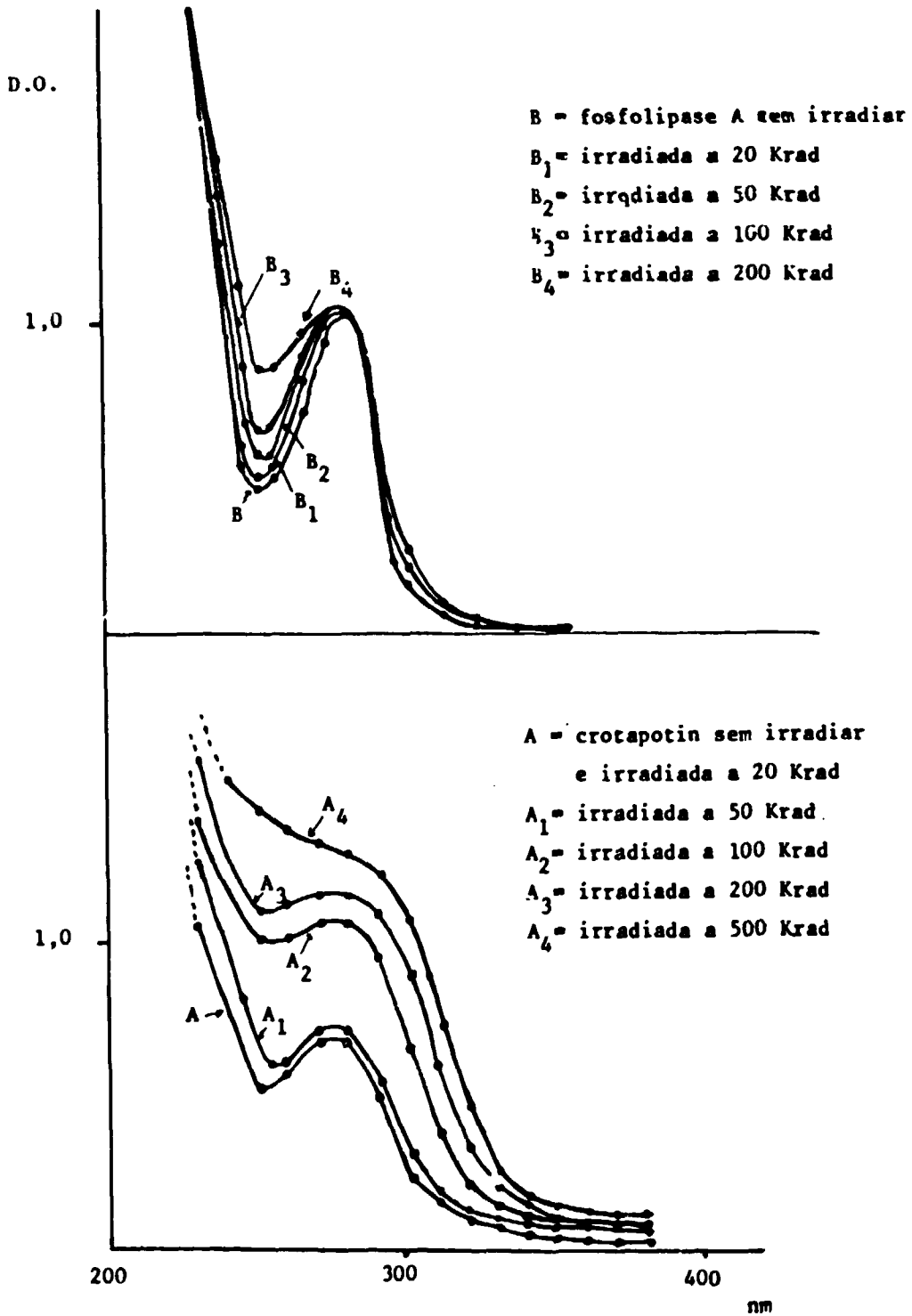


Figura 25 - Espectros de Absorção de Crotopotin e Fosfolipase A Irradiadas. As Amostras, em Solução Aquosa, 1mg/ml, foram Irradiadas com ⁶⁰Co

Tabela XI**Imunoprecipitação de Crotapotin e Fosfolipase A Irradiadas**

D.O. 280nm											
μ g	crotapotin						fosfolipase A				
antígeno	S/ irradiad	20 K rad	50 K rad	100 K rad	200 K rad	500 K rad	S/ irradiad	20 K rad	50 K rad	100 K rad	200 K rad
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
100	0,415	0,400	0,410	0,415	0,415	0,405	0,600	0,600	0,590	0,595	0,595
200	0,520	0,530	0,525	0,510	0,515	0,520	0,815	0,800	0,805	0,815	0,820
300	0,490	0,480	0,490	0,480	0,500	0,480	0,660	0,665	0,665	0,660	0,660
400	0,425	0,430	0,425	0,520	0,520	0,530	0,568	0,570	0,575	0,550	0,570

As reações foram realizadas usando 0,2 ml de soro anticrotapotin para crotapotin e 0,2 ml de soro antifosfolipase A para fosfolipase A, em meio tampão fosfato pH 7,0, 0,1M com incubação de 1 h a 37°C e mais 24 h a 4°C. Os precipitados foram determinados espectrofotometricamente.

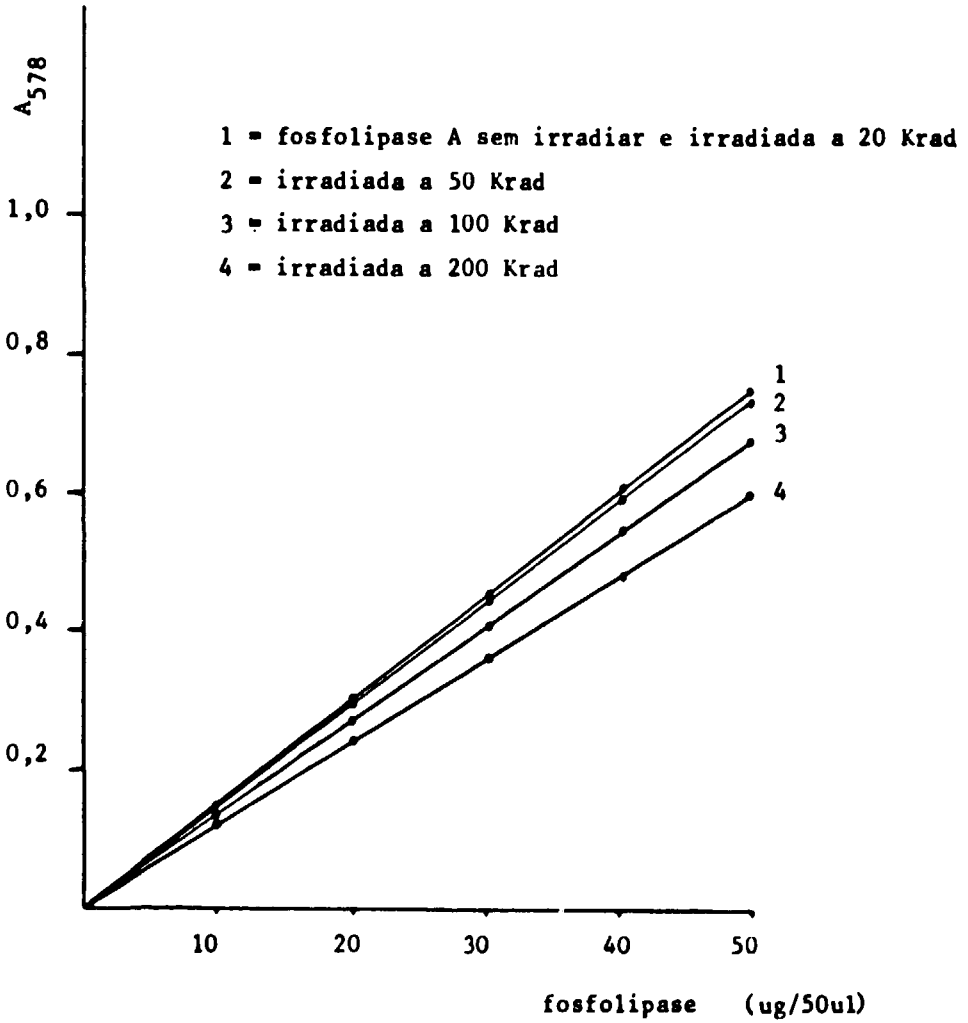


Figura 26 - Atividade Enzimática de Fosfolipase A Irradiada.

50 μ l do Material foram Incubados com 50 μ l de Gema de Ovo a 37°C por 1 hora, Adicionando a Seguir 4,9 ml de Hemácias a 0,6% e Incubados por mais 50 minutos a 37°C. Após Centrifugação, os Sobrenadantes foram Lidos a 578 nm

casos de interação 2 crotapotin + 1 fosfolipase A e interação 1 crotapotin + 2 fosfolipase A, resta sempre ou crotapotin ou fosfolipase A que podem competir na reação com o anticorpo quantitativamente fixo nas reações. Análise da Figura 10 sugere que a interação proteína-proteína para formar crotoxina seja na proporção de 1 mol de crotapotin para 1 mol de fosfolipase A, estando em concordância com os resultados de interação obtidos por cromatografia em colunas de Sephadex e determinação da DL_{50} em camundongos⁽⁵⁸⁾.

Quando se absorve o soro anticrotálico do Butantan com quantidades crescentes de crotapotin, sem obtenção de precipitados, e junta-se quantidades iguais ou crescentes de fosfolipase A observa-se a participação decisiva da crotapotin na reação antígeno-anticorpo, como se vê nas Figuras 11 e 12. Quando o soro anticrotálico é absorvido com fosfolipase A e ao sobrenadante da reação junta-se crotapotin, esta etapa do processo não acusa formação de precipitado, e quando o soro é absorvido primeiro por crotapotin, a curva de fosfolipase A não é quase alterada.

Os resultados expressos na Figura 13, onde se utilizou crotapotin ^{125}I , confirmam a participação da crotapotin na atividade imunológica da crotoxina. Quando se incubou o soro anticrotálico com crotapotin radioativa, seguido de branco onde se incubou igualmente o soro normal de cavalo com a mesma crotapotin radioiodada, e depois fez-se eletroforeses, demonstra que: não há iodo radioativo livre na proteína radioativa, conforme a corrida de 1 hora; quando crotapotin ^{125}I é incubada com soro normal de cavalo, ela se liga a albumina e não a gamaglobulina; a incubação da crotapotin ^{125}I com soro anticrotálico denota a formação de complexo antígeno anticorpo permanecendo na origem da sementeira; a crotapotin ^{125}I sozinha migra dando Rf diferente de quando complexada com anticorpo ou carregada por albumina.

Tanto crotapotin, fosfolipase A, como crotoxina (1 fosfolipase A + 1 crotapotin) mostram eficiência na produção de anticorpos em coelhos, conforme Figura 15, embora crotapotin seja uma proteína ácida.

As reações cruzadas observadas na Figura 16 fazem supor a existência de determinantes antigênicos comuns ou semelhantes na fosfolipase A e crotapotin. A hipótese da existência de determinantes "comprometidos" tanto de crotapotin como de fosfolipase A no processo de interação para formar crotoxina fica evidenciada pelos resultados da Figura 15 e Figura 17, porque, a soma dos precipitados da reação crotapotin-anticrotoxina com precipitados da reação fosfolipase A - anticrotoxina é significativamente maior do que o precipitado obtido na reação crotoxina-soro anticrotoxina.

Durante o processo de purificação das frações do veneno de cascavel, vinha se notando uma contaminação freqüente na crotamina por crotapotin. Interações realizadas em coluna de filtração em gel de Sephadex entre crotapotin e crotamina confirmaram a existência do complexo entre as duas proteínas⁽⁵⁸⁾. A determinação da DL_{50} da mistura 1:1, crotapotin + crotamina, aumenta de 4 vezes a potência da crotamina⁽⁴⁸⁾. Para sanar dúvidas e esclarecer a formação de complexo crotapotin-crotamina lançou-se mão de reações imunológicas. A utilização do soro específico anticrotapotin demonstra que a proporção molar de união das duas proteínas deve ser 1:1, e que essa interação não deve mascarar determinantes antigênicos de crotapotin. Esse resultado pode ser analisado na Figura 19, pois que as curvas de precipitação para 1:1 e 1:2 (crotapotin:crotamina) são coincidentes.

B - Carbamilação de Crotapotin e Fosfolipase A - Interações

A homocitrulina, resultante da carbamilação de ϵ -amino grupo das lisinas, é altamente estável em meio ácido e resiste a aquecimento e é determinada em analisador de aminoácidos⁽⁶⁸⁾. ϵ -carbamililina, segundo o mesmo autor, decompõe linearmente durante 48 horas de uma hidrólise ácida dando, em 22 horas, uma transformação de 24% de homocitrulina em lisina. No nosso caso, realizou-se uma hidrólise ácida de 10 horas e somente foi determinado o número de resíduos de lisina que não foi transformado em homocitrulina. Pelos nossos ensaios baseados no trabalho de NAKAGAWA et alii⁽⁴⁷⁾ e STARK et alii⁽⁶⁸⁾, observou-se uma diminuição de 2 lisinas em fosfolipase A e uma lisina na crotapotin após carbamilação de 8 horas.

Segundo STARK^(65,66) e STARK et alii⁽⁶⁸⁾, o cianato pode ligar rapidamente a grupos carboxílicos a pH 5, mas entre pH 7 e 8 não se processa a reação; reagir com cisteína, mas pelo doseamento de grupos sulfidrílicos livres verificou-se a inexistência de -SH acessíveis tanto em crotapotin como em fosfolipase A. Portanto a possibilidade da interferência de cianato em grupos carboxílicos e cisteína é afastada. No caso em questão, não foram utilizados nem uréia nem cloreto de guanidina⁽⁶⁷⁾ para desenrolar as moléculas protéicas para se conseguir uma carbamilação total inclusive dos -NH₂ terminais, justificando assim a baixa quantidade de lisinas modificadas. Não foi necessário determinar hidantoinas formadas pela ciclização de amino terminais⁽⁶⁶⁾ nas proteínas estudadas, porque hidantoinas se formam em pH ácido.

A literatura cita algumas modificações efetuadas no sentido de estudar a importância de lisinas na toxicidade e antigenicidade de algumas toxinas ofídicas. Assim, TU et alii⁽⁷⁵⁾ modificaram as lisinas das toxinas a e b de *Laticauda semifaciata* com o-metilouréia, bloqueando 3 ε-amino grupos em a e 4 ou 5 ε-amino grupos em b, concluindo que as lisinas não são essenciais para a toxicidade. CHANG et alii^(13,14), em 1971, trabalharam com cobrotoxina de *Naja naja atra*, KARLSON et alii⁽³⁷⁾ e COOPER et al⁽¹⁸⁾ com *Naja naja siamensis* e concluíram que a modificação de lisinas não acarreta perda de atividade tóxica. YANG⁽⁸⁰⁾ modificou amino grupos livres da cobrotoxina com fluoresceína e verificou um decréscimo da toxicidade sem afetar a antigenicidade, o que fez sugerir que os sítios antigênicos da cobrotoxina são diferentes dos sítios de atividade tóxica. VIJ OEN et alii⁽⁷⁶⁾ tratou a fosfolipase A do veneno de *Bitis gabonica* com piridoxal 5'-fosfato observando queda da atividade enzimática. HENDON et al⁽³²⁾, por metilação de crototoxina, crotapotin e fosfolipase A, bloqueando respectivamente 6, 1 e 6 ε-amino grupo de lisinas, estudaram a queda da letalidade destas proteínas modificadas, em camundongos.

A carbamilação de crotapotin não leva à modificação do espectro de absorção em ultravioleta quando comparado à proteína nativa. Quanto à imunoprecipitabilidade, a crotapotin carbamilada indica apresentar pelo menos uma lisina comprometida no processo imunológico de reação antígeno-anticorpo. Um crotapotin carbamilada + 1 fosfolipase A formam crototoxina 'carbamilada' também com reatividade diferente da crototoxina quando testada frente ao soro anticrototoxina, indicando que provavelmente a lisina carbamilada comprometida na imunorreatividade da crotapotin, fica "livre" ao interagir com a fosfolipase A.

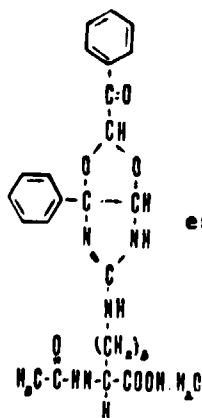
O processo de carbamilação da fosfolipase A, durante 8 horas de reação, leva a bloqueio de somente 2 ε-amino grupos e como não causa alteração de atividade enzimática nem antigênica e considerando o não conhecimento da seqüência completa de aminoácidos da enzima referida, não se pode afirmar da importância dos seus ε-amino grupos de lisinas nas interações estudadas.

C – Modificação de Argininas da Crotapotin e Fosfolipase A. Interações

Modificação química seletiva dos resíduos de arginina na proteína sob condições brandas é desejável para uma série numerosa de propósitos, essencialmente se se ligar à definição de sítios ativos de enzimas, determinantes antigênicos de proteínas e demais atividades biológicas^(45,72). Daí, a utilização do reagente fenilgloxal para estudar resíduos de arginina nas moléculas de crotapotin e fosfolipase A.

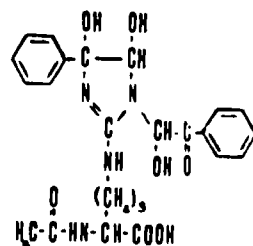
Fenilgloxal ao reagir com grupo guanidino da arginina dá origem a um derivado que contém duas moléculas de fenilgloxal por grupo guanidino, suficientemente estável a pH ácido. Mas, a pH neutro ou alcalino, o composto se decompõe lentamente e até 80% da arginina original pode ser regenerado pela incubação do derivado na presença de excesso do reagente por 48 horas, 37°C, pH 7,0.

A instabilidade de difenilgloxal-arginina na proteína, dá lugar a uma limitação para identificar e separar os resíduos modificados, porém a reação de Sakaguchi demonstrou o bloqueio do grupo guanidino das argininas a pH 8,0 nas moléculas de fosfolipase A (Tabela VI).



estrutura I

(fórmula mais provável)



estrutura II

Estruturas Alternativas para di(fenilgloxal)acetilarginina⁽⁷²⁾

Considerando a rápida reação de arginina com fenilgloxal⁽⁷²⁾ entre pH 8,0 a 9,0, e baseado na inativação de ribonuclease⁽⁷²⁾ com mesmo reagente, obtivemos uma inativação total da fosfolipase A em 10 minutos de reação a pH 8,0, não se obtendo nenhuma modificação na atividade enzimática a pH 6,0 (Figura 21).

Histidina, cisteína, triptofano, asparagina, glutamina, glicina e lisina reagem com fenilgloxal aproximadamente 10% em 24 horas de reação nos valores de pH compreendidos entre 5,5 e 9,0⁽⁷⁴⁾. O reagente pode também combinar com ϵ -amino grupos de lisinas porém muito lentamente, ocorrendo o mesmo com alfa amino livres⁽⁷²⁾, portanto não foram levadas em consideração possíveis modificações sofridas por outros aminoácidos que não a arginina.

TU et alii⁽⁷⁵⁾ trataram as toxinas a e b de *Laticauda semifaciata* com 1,2-ciclohexanediona sem obter modificação na toxicidade. O mesmo reagente foi utilizado por PATHY e SMITH⁽⁵⁴⁾ estabilizando o complexo na presença de borato a pH 9,0.

Outra toxina modificada com fenilgloxal foi a cobrotoxina cujos autores YANG et alii⁽⁸¹⁾ determinaram a inativação da toxina em função do pH e tempo de reação, observando que embora inative totalmente a toxicidade, a antigenicidade sofre somente um decréscimo na precipitação quantitativa com o aumento do número de argininas bloqueadas, não atingindo, porém, uma inativação total da reação antígeno-anticorpo.

A pH 8,0, reação de Sakaguchi positiva, houve baixa modificação de argininas da fosfolipase A por fenilgloxal (Tabela VI), não obtendo alteração alguma de atividade enzimática ou imunológica nas proteínas estudadas (Tabela VII e Figura 21).

As argininas parecem não interferir na atividade imunológica de crotapotin, como demonstram os resultados da Tabela VIII. Porém, as argininas da fosfolipase A estão envolvidas na atividade enzimática e imunológica da proteína devendo, provavelmente, participar dos determinantes antigênicos e do sítio ativo enzimático.

D – Tirosinas na Interação Crotapotin-Fosfolipase A

As tirosinas de toxinas ofídicas foram estudadas por CHANG et alii⁽¹³⁾ e CHICHEPORTICHE et alii⁽¹⁷⁾ que trabalhando com cobrotoxina *Naja naja atra*, bloquearam por nitração as Tyr 25 e Tyr 35, e concluíram que Tyr 35 não interfere na atividade biológica e que Tyr 25 é essencial para manter a conformação da toxina bem como a atividade biológica da mesma. HENDON e FRAENKEL-CONRAT⁽³²⁾ verificaram que a iodação da crotoxina não causa alteração da toxicidade.

Considerando as nossas condições de iodação da crotoxina, utilizando ¹³¹INa, pode-se estabelecer que: as tirosinas da crotapotin, duas, e da fosfolipase A nove, não estão igualmente expostas para a "marcação" pois a eficiência de iodação foi aproximadamente 2,5 vezes maior em resíduos de tirosina da fosfolipase A do que da crotapotin; deve haver tirosinas envolvidas no processo da formação de crotoxina e, quando se iodou, não se obteve relação 1 quando considerada a atividade específica de crotapotin relativa à atividade específica de fosfolipase A (em $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$ de tirosina); se as tirosinas de crotoxina estivessem todas igualmente receptíveis a iodação, a relação de atividades específicas de crotapotin para fosfolipase A deveria ser 1:4,5 correspondendo a duas tirosinas da proteína ácida e a nove tirosinas da básica ao invés de 1.290 $\mu\text{Ci}/\mu\text{mol}$ de crotapotin 14.463 $\mu\text{Ci}/\mu\text{mol}$ de fosfolipase A, que significa ± 11 . Os dados sugerem ainda a existência de tirosinas expostas na superfície de crotoxina, iodáveis, que não interferem na atividade antigênica de crotapotin e fosfolipase A e, existem tirosinas não "marcáveis" com ¹³¹INa que parecem estar envolvidas na interação proteína-proteína para formar crotoxina.

E – Irradiação de Crotapotin e Fosfolipase A

Recentemente, tem recebido atenção especial a possibilidade de atenuação das toxinas por irradiação gama, para emprego na preparação de anti-toxinas^(39,40,61,63,70) e sempre que possível é feita uma correlação entre inativação da proteína e sua mudança estrutural^(4,42,63), pois o problema chave da química de radiação das proteínas é justamente a correlação entre as mudanças conformacionais e a queda da atividade biológica. A queda desta atividade tem sido atribuída a alterações químicas de alguns aminoácidos, como os do centro ativo de enzimas à quebra de pontes -S-S-. O efeito da radiação ionizante a baixas doses, em solução, é inicialmente denaturar a proteína resultando no rompimento das pontes de hidrogênio originais e formação de outras ligações. A proteína pode precipitar, como no caso da albumina, mas isto não significa que houve perda total de atividade^(71,78).

O estudo das propriedades imunológicas realizado em muitos experimentos demonstra que a irradiação leva a um decréscimo da antigenicidade, assim a ovoalbumina irradiada a seco retém somente 37% da atividade original com dose de 65 Mrad, ao passo que irradiada em solução a 1% retém 37% da atividade à dose de 24 Mrad⁽⁴²⁾.

Em nossas experiências, uma dose gradativa de 20 a 500 Krad em solução de 1 mg crotapotin/ml, que tem 6 pontes de enxofre, não leva a alteração da imunorreatividade embora demonstre uma mudança da absorção em ultravioleta. A fosfolipase A, com 6 pontes de enxofre, a uma dose de 500K rad precipita totalmente, talvez atribuído a formação de polímeros⁽¹¹⁾. A mesma enzima submetida a uma mesma dose gradativa de radiação demonstra uma pequena queda na atividade enzimática a 100 e 200K rad embora não haja modificação da atividade antigênica.

A literatura cita trabalhos com irradiação de toxinas ofídicas^(39,42,70) não purificadas devidamente, por exemplo em condições naturais, as quais representam uma mistura complexa de proteínas e outros compostos que, quando submetidas a irradiação, faz-se necessário considerar a possível existência de proteção mútua dos componentes presentes na amostra. Uma seletiva modificação do efeito da radiação sobre vários constituintes dos venenos de cobras pode ser obtida pela escolha de compostos a adicionar, levando em conta que muitos experimentos mostram que a radiação pode provocar desenrolamento das moléculas de proteínas, tornando-as mais sensíveis a fatores químicos e facilitando o preparo de toxóides e vacinas nos casos onde são impossíveis de serem obtidos por outros métodos.

No caso da crotapotin e fosfolipase A faz necessário a irradiação a seco porque a 500K rad ocorre precipitação da fosfolipase A, apesar de numa dose relativamente baixa de radiação, já se notar modificação da estrutura e atividade biológica sem alterar a antigenicidade.

5 – CONCLUSÕES

- 1) A crotapotin é imunologicamente ativa, formando complexo solúvel com soro anticrotálico comercial do Instituto Butantan, e quando purificada, a partir de crotoxina, é imunogênica para coelhos produzindo soros imunes.
- 2) A fosfolipase A da crotoxina, sem dúvida alguma, tem maior participação na atividade imunológica da toxina.
- 3) A interação 1 mol de crotapotin: 1 mol de fosfolipase A para formar crotoxina parece envolver mascaramento de alguns determinantes antigênicos de ambas proteínas.
- 4) Crotapotin interage com crotamina e, na proporção exata de potenciação de crotamina por crotapotin, (1:1), os determinantes antigênicos da crotapotin não estão envolvidos.
- 5) Um epsilon amino grupo da lisina da crotapotin está envolvido no processo imunológico da mesma.
- 6) As argininas de crotapotin não estão nos determinantes antigênicos; argininas da fosfolipase A participam da atividade antigênica e biológica da mesma.
- 7) A crotapotin tem pelo menos uma tirosina "livre" na superfície quando está ligada com fosfolipase A formando crotoxina; a fosfolipase A apresenta tirosinas mais iodáveis do que crotapotin, sendo a eficiência de marcação das tirosinas da enzima com $^{125}\text{I Na}$, 2,5 vezes maior do que as tirosinas da crotapotin; crotoxina apresenta tirosinas não expostas à 'marcação', provavelmente envolvidas no processo de interação crotapotin-fosfolipase A.
- 8) Fosfolipase A em solução aquosa a pH 7,0 precipita com dose de irradiação gama de 500 Krad, e, apresenta uma correlação entre perda de atividade enzimática e aumento da dose de radiação. Crotapotin não altera sua antigenicidade com irradiação gama até 500 Krad.

APÊNDICE

As figuras das lâminas de imunodifusão efetuadas para acompanhar as reações de imunoprecipitação se acham expostas neste apêndice.

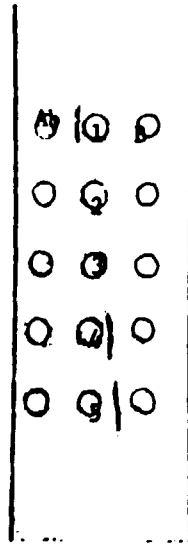


Figura A1 - Imunodifusão dos Sobrenadantes das Reações de Imunoprecipitação de Fostolipase A (B) com Soro Anticrotálico do Instituto Butantan. Os Sobrenadantes Testados foram os da Primeira Centrifugação Após a Reação das Amostras. 1, 2, 3, 4, 5 são Respectivamente Sobrenadantes das Reações de 600, 400, 300, 200 e 100 μ g de Fostolipase A com 0,2 ml de Soro Imune.

As Difusões foram Efetuadas em Agarose a 2%, Tampão Fosfato pH 7,0, 0,1M. Após Lavagem e Secagem, as Lâminas foram Coradas com Negro de Amido

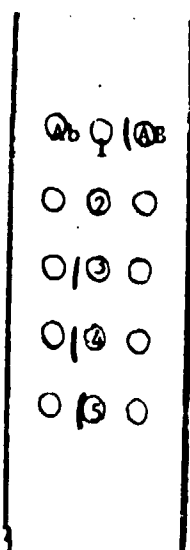


Figura A2 - Imunodifusão dos Sobrenadantes das Reações de Imunoprecipitação das Interações Crotapotin (A): Fosfolipase A (B) = AB., com Soro Anticrototílico do Instituto Butantan (Ab). 1, 2, 3, 4, 5 Representam Respectivamente os Sobrenadantes das Reações de 100, 200, 300, 400 e 600 μ g de AB com 0,2 ml de Soro Imune.

As Difusões foram Efetuadas em Agarose 2%, Tampão Fosfato pH 7,0, 0,1M. Após Lavagem e Secagem, Coloração com Negro de Amido, a Lâmina Representa: 1 - 100, 2 - 200, 3 - 300, 4 - 400, 5 - 600 μ g de Interação Crotapotin-Fosfolipase A

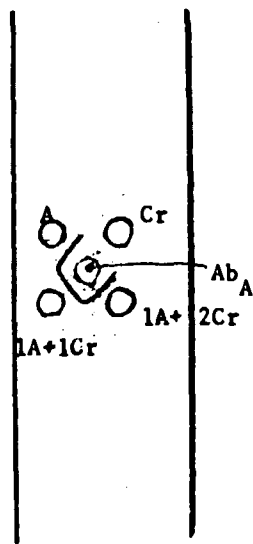


Figura A3 - Imunodifusão de Crotopotín (A), Crotamina (Cr) e Suas Interações $1A + 1Cr$, $1A + 2Cr$, Contra Soro Anticrotapotín. As Difusões foram Efetuadas em Agarose 2%, Tampão Fosfato pH 7,0, 0,1M. Após Lavagem e Secagem, as Lâminas foram Coradas com Negro de Amido

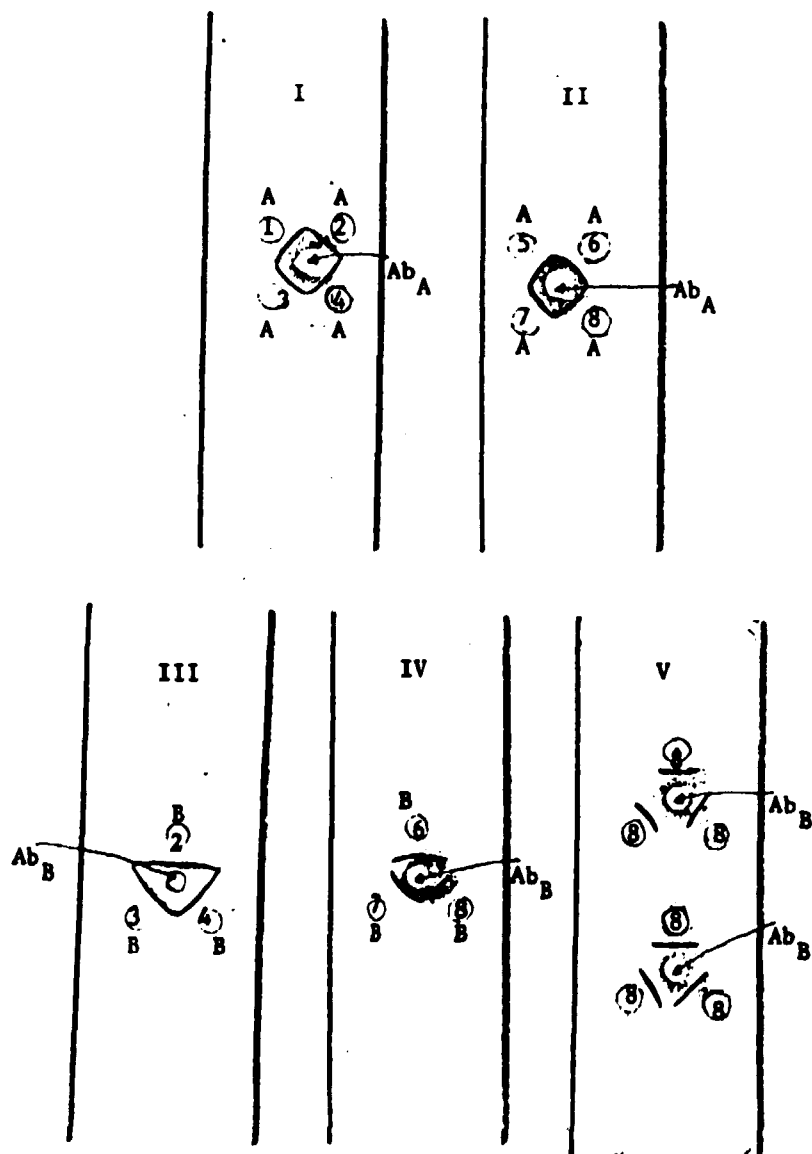


Figura A4 - Imunoprecipitação de Amostras da Reação de Crotapotin (A) e Fosfolipase A (B) com Fenilglojal Contra Soros Específicos Anticrotapotin (Ab_A) e Antifosfolipase A (Ab_B) 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 Correspondem Respectivamente a 5, 10, 20, 30 minutos e 1, 2, 4 e 8 horas de Reação com Fenilglojal. A Lâmina V Representa Reações de Fosfolipase a pH 8, com Fenilglojal

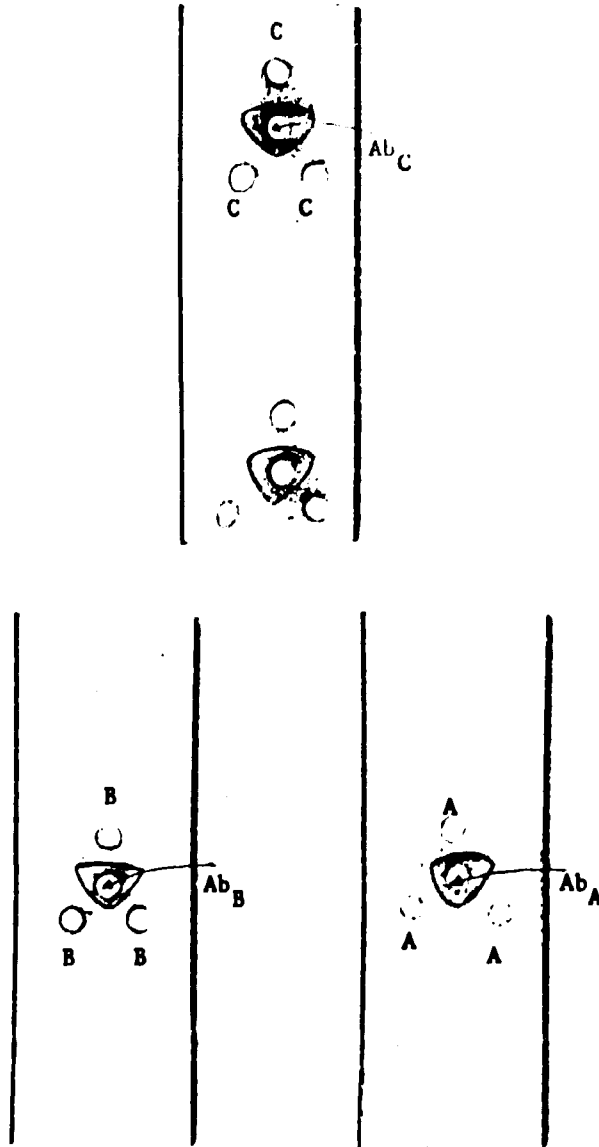


Figura A5 - Imunodifusão de Crotoxina ^{131}I (C) Contra Soro Anticrotoxina (Ab_C), Fosfolipase A ^{131}I (B) Contra Soro Antifosfolipase A (Ab_B) e Crotopotín ^{131}I (A) Contra Soro Anticrotopotín (Ab_A). Após Difusão em Agarose a 2%, as Lâminas foram Coradas com Negro de Amido

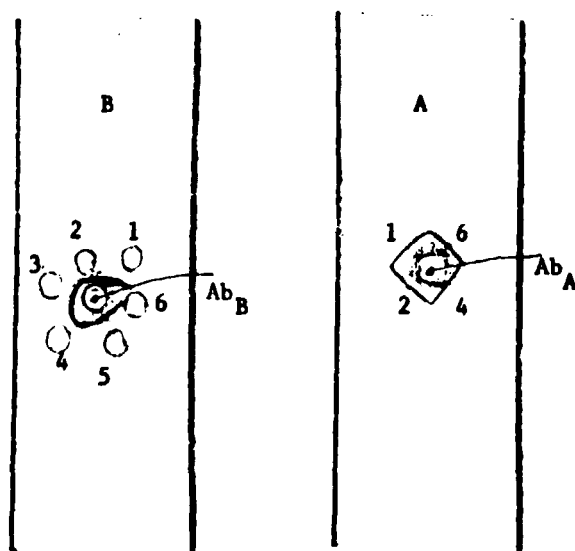


Figura A6 – Imunodifusão – de Fosfolipase A (B) e Crotapotin (A) Irradiadas Contra Soro Antifosfolipase A (Ab_B) e Soro Anticrotapotin (Ab_A).
 1, 2, 3, 4, 5, 6 Correspondem Respectivamente a; Sem irradiar, Irradiadas a 20, 50, 100, 200 e 500 Krad
 Após Difusão, em Agarose a 2%, as Lâminas foram Coradas com Negro de Amido

ABSTRACT

Crotamine and crotoxin with the subunits - phospholipase A and crotapotin - were obtained by purification from *Crotalus durissus terrificus* venom.

Interaction studies of the subunits using crotalic antiserum produced in Butantan Institute, indicated that: crotoxin is formed of crotapotin and phospholipase A with the molar ratio of 1 to 1; using crotapotin labelled with 125 -iodine it was shown the presence of a soluble complex with the same antiserum.

Immunological precipitin reactions were carried out with rabbit specific sera produced against crotapotin, phospholipase A and crotoxin (crotapotin + phospholipase A). Crotapotin showed to be antigenic; crotapotin and phospholipase A presented similar antigenic determinants; crotoxin antiserum reacted with the single components crotapotin or phospholipase A; when crotapotin and phospholipase are mixed to form synthetic crotoxin some antigenic determinants were masked in the process of interaction.

Crotamine, a strongly basic protein, interacted with crotapotin 1:1, without hidden antigenic determinants once the maximum of precipitation was obtained with the proper antiserum for crotapotin.

Carbamylation of lysines residues of crotapotin produced a decrease of the immunological activity suggesting that, at least, 1 lysine is a part of the antigenic site of crotapotin; carbamylation of two lysines of phospholipase A did not modify the enzymatic and immunological activities of the enzyme.

Arginine residues of crotapotin and phospholipase A were blocked by reaction of guanidinium groups with phenylglyoxal at different pH values. Enzymatical activity of phospholipase A appeared to be dependent of pH and reaction time. Arginines of crotapotin did not appear to be important in the immunological property.

Crotoxin :adiiodinated with Na^{131}I and their separation through DEAE Sephadex A-25 in crotapotin ^{131}I and phospholipase A ^{131}I showed that the tyrosines of phospholipase A are more susceptible to labelling than crotapotin.

Gamma irradiation of aqueous solutions of crotapotin and phospholipase A produced modifications in the ultraviolet spectra. A decrease of the enzymatic activity occurred as a function of radiation dosis. Immunological activities of crotapotin and phospholipase A were not altered.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

1. ATASSI, M. Z. & CHING, L. L. Enzymic and immunochemical properties of lysozyme. *Biochem. biophys. Acta*, 404:464-74, 1975.
2. ATASSI, M. Z. & CHING, L. L. Enzymic and immunochemical properties of lysozyme. *Immunochemistry*, 13:7-14, 1976.
3. ATASSI, M. Z.; HABEEB, A. F. S. A.; ANDO, K. Enzymic and immunochemical properties of lysozyme. VII - Location of all the antigenic reactive regions. A new approach to study immunochemistry of tight proteins. *Biochem. biophys. Acta*, 303:203-9, 1973.
4. BERZRUKOVA, A. G. & OSTASHEUSKY, I. Y. A. Gamma irradiated chymotripsin-like proteins. II. Connections between inactivation and structural changes. *Int. J. Radiat. Biol.*, 31(4):349-54, 1977.

(*) As referências bibliográficas relativas a documentos localizados pelo I.E. foram revistas e enquadradas na NB-88 de ABNT.

5. BIER, O. G. Estudo quantitativo da reação de floculação entre o antiveneno crotálico e a fração do veneno de cascavel purificada neotrópica (*Crotalus t. terrificus*). *Mems Inst. Butantan*, 20:31-8, 1947.
6. BIER, O. G. Estudo quantitativo da reação de floculação entre o veneno e o antiveneno. *Mems Inst. Butantan*, 18:27-32, 1945.
7. BIER, O. G.; MOTA, I.; SILVA, W. D. da; MONTEIRO VAZ, N. *Imunologia básica e aplicada*. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1972.
8. BRAZIL, O. V. & FRANCESCHI, J. P. *Pesquisas farmacológicas sobre neurotoxinas da peçonha da cascavel sulamericana*. São Paulo, Fac. Ciências Médicas, | s.d. |.
9. BREITHAUPT, H. Enzymatic characteristics of crotalus phospholipase A₂ and the crotoxim complex. *Toxicon*, 14:221-33, 1976.
10. BREITHAUPT, H. & HABERMANN, E. Biochemistry and pharmacology of phospholipase a from *Crotalus terrificus* venom as influenced by crotopotin. *Toxicon*, 10:525-6, 1972.
11. BREITHAUPT, H.; OMORI-SATO, I.; LANG, J. Isolation and characterization of three phospholipase. A from the crotoxin complex. *Biochem. biophys. Acta*, 403:355-62, 1975.
12. BREITHAUPT, H.; RUBSAMEN, K.; HABERMANN, E. Biochemistry and pharmacology of the crotoxin complex. *Eur. J. Biochem.*, 49:333-45, 1974.
13. CHANG, C. C.; YANG, C. C.; HAMAGUCHI, K.; NAKAI, K.; HAYASHI, K. Studies on the status of tyrosil residues in cobrotoxin. *Biochem. biophys. Acta*, 236:164-73, 1971.
14. CHANG, C. C.; YANG, C. C.; NAKAI, K.; HAYASHI, K. Studies on the status of free amino and carboxyl groups in cobrotoxin. *Biochem. biophys. Acta*, 251:334-44, 1971.
15. CHEYMOL, J.; GONÇALVES, J. M.; BOWILLET, F.; ROCH-ARVEILLER, M. Action neuromusculaire comparée de la crotamine et du venin de *Crotalus durissus terrificus* var. *crotaminicus*. I. Sur préparations neuromusculaires in situ. *Toxicon*, 9(3):279-86, 1971.
16. CHEYMOL, J.; GONÇALVES, J. M.; BOWILLET, F.; ROCH-ARVEILLER, M. Action neuromusculaire comparée de la crotamine et du venin de *Crotalus durissus terrificus* var. *crotaminicus*. II. Sur préparations isolées. *Toxicon*, 9(3):287-9, 1971.
17. CHICHEPORTICHE, R.; ROCHAT, C.; SAMPRER, F.; LAZDRINSKI, M. apud NEUROTOXINS of animal venoms: snakes. *A. Rev. Biochem.*, 12:235-58, 1973.
18. COOPER, D. & REICH, E. Neurotoxin from venom of the cobra *Naja naja siamensis*. Purification and radioactive labelling. *J. Biol. Chem.*, 247:3008-13, 1972.
19. ELLMAN, G. L. Tissue sulphhydryl groups. *Archs Biochem. Biophys.*, 82:70-7, 1959.
20. FRAENKEL-CONRAT, H. & SINGER, B. Fractionation and composition of crotoxin. *Archs Biochem. Biophys.*, 60:64-73, 1956.
21. GONÇALVES, J. M. *Estudos sobre crotamina*. Ribeirão Preto, 1961. (Tese de doutoramento).
22. GONÇALVES, J. M. Purification and properties of crotamine. In: BUCLEY, E. E. & PORGES, N., eds. *Venoms*. Washington, D. C., A. A. A. S., 1956. p.261.

23. GONÇALVES, J. M. & DEUTSCH, H. F. Ultracentrifugal and zone electrophoresis studies of some crotalidae venoms. *Archs Biochem. Biophys.*, 60(2):402-11, 1956.
24. GONÇALVES, J. M. & GIGLIO, J. R. Amino acid composition and terminal group analysis of crotamine. In: PROCEEDINGS 6th int. congress Biochemistry, New York, 1964, v.2. | s.n.t. |. p.170.
25. GONÇALVES, J. M. & VIEIRA, L. G. Estudos sobre veneno de serpentes brasileiras. I. Análise eletroforética. *Anais Acad. bras. Cienc.*, 22:141, 1950.
26. GREENWOOD, F. C.; HUNTER, W. M.; GLOVER, J. S. The preparation of 131 labelled human growth hormone of high specific radioactivity. *Biochem. J.*, 89:114-23, 1963.
27. HABERMANN, E. Biochemie, pharmacologie und toxikologie der inhaltsstoffe von hymenopterengiften. *Rev. Physiol. Biochem. exp. Pharmacol.*, 60:220-325, 1968 apud *Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmak.*, 270:274-88, 1971.
28. HABERMANN, E. Gewinnung und eigenschaften von crotactin, phospholipase A, crotamin und toxin. III. Aus dem gift der brasilianischen Klapperschlange. *Biochem. Z.*, 329:405-19, 1957.
29. HABERMANN, E. & RUSAMEN, K. *Biochemical and pharmacological analysis of the so-called crotoxin. Toxin of animals and plant origin.* London, Vries/Kochva, 1971. p.333-41.
30. HABERMANN, E.; WALSCH, P.; BREITHAUPT, H. Biochemistry and pharmacology of the crotoxin complex. II. Possible interrelationships of phospholipase, cro'tapotin and their combination. *Naunyn-Schmiederbergs Arch. Pharmak.*, 273:313-30, 1972.
31. HENDON, R. A. & FRAENKEL-CONRAT, H. Biological roles of two components of crotoxin. *Proc. nat. Acad. Sci.*, 68(7):1560-3, 1971.
32. HENDON, R. A. & FRAENKEL-CONRAT, H. The role of complex formation in the neurotoxicity of crotoxin components A and B. *Toxicon*, 14:283-9, 1976.
33. HUNTER, W. M. The preparation of radioiodinated proteins of high activity, their reaction with antibody in vitro: the radioimmunoassay. In: WEIR, D. M., ed. *Handbook of experimental immunology.* Oxford, Blackwel Sci., 1967. p.608-54.
34. IZUMI, Y. New Sakaguchi reaction. II. *Analyt. Biochem.*, 12:1-7, 1965.
35. JENG, T. W. & FRAENKEL-CONRAT, H. Activation of crotoxin B by volvatoxin A₂. *Biochem. biophys. Res. Commun.*, 70:1324-9, 1976.
36. KABAT, E. A. & MAYER, M. M. *Experimental immunochemistry.* 2. ed. Springfield, Ill., Charles C. Thomas, | s.d. |.
37. KARLSSOM, E.; EAKER, D.; PONTERIUS, G. Modification of amino group in Naja naja neurotoxins and the preparation of radioactive derivatives. *Biochem. biophys. Acta.* 257:235-48, 1972.
38. KOKETSU, J. & ATASSI, M. Z. Immunochemistry of sperm-wale myoglobin. Accurate delineation of the single region in sequence 1-55 by immunochemical studies of synthetic peptides. Some conclusions concerning antigenic structures of proteins. *Immunochemistry*, 11:1-8, 1974.
39. LAUHATIRANANDA, P.; GANTHAVORN, S.; HAYODOM, V. Radiation effects on cobra venom.

- In: INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY. *Radiation sensitivity of toxins and animal poisons: proceedings of a panel on ... held in Bangkok, 19-22 May, 1969*. Vienna, 1970. p.107-12. (Panel proceedings series).
40. LAURE, C. J. Die Primärstruktur des Crotamines. *Hoppe-Seuler's Z. Physiol. Chem.*, 356:213-5, 1975.
 41. LEBEZ, D. Labelling of snake venoms with radioactive isotopes. In: INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY. *Radiation sensitivity of toxins and animal poisons: proceedings of a panel on ... held in Bangkok, 19-22 May, 1969*. Vienna, 1970. p.75-86. (Panel proceedings series).
 42. LEONE, C. A. In: LEONE, C. A., ed. *The effects of ionizing radiation on immune response*. New York, N. Y., Gordon and Breach, 1962. p.115 apud INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY. *Radiation sensitivity of toxins and animal poisons: proceedings of a panel on ... held in Bangkok, 19-22 May 1969*. Vienna, 1970. p.3. (Panel proceedings series).
 43. LOMBA, M. G. *Estudos sobre a distribuição e excreção da crotoxina ¹³¹I em cães*. Campinas, 1969. (Tese de doutoramento).
 44. LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. biol. Chem.*, 193:265-75, 1951.
 45. MARCUS, F.; SCHUSTER, S. M.; LARDY, H. Essential arginyl residues in mitochondrial adenosine triphosphatase. *J. biol. Chem.*, 251(6):1775-80, 1976.
 46. MOUSSATCHÉ, H.; CONÇALVES, J. M.; VIEIRA, G. D.; HASSON, A. Pharmacological actions of two proteins from Brazilian rattle-snake venom. Venoms. In: AMERICA Association from the advancement of science. Washington, D. C., 1 s.ed., 1956. p.275-9.
 47. NAKAGAWA, Y.; CAPETILLO, S.; JINGENSONS, B. Effects of chemical modifications of lysine residues on the conformation of human immunoglobulin G. *J. biol. Chem.*, 247:5703-8, 1972.
 48. NAKAZONE, A. T.; ROGERO, J. R.; GONÇALVES, J. M. Potenciação da crotoxina pela interação com crotopotín. In: 6º ENCONTRO anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica, Caxambú, 20 a 23 abril, 1977. (Res., nº 79).
 49. NERKAR, D. P.; GOVEKAR, L. G.; KUNTA, U. S.; SREENIVASAN, A. Radioactive of *S. typhimurium* cells. *Int. J. Radiat. Biol.*, 31(4):335-40, 1977.
 50. NEUMANN, W. P. & HABERMANN, E. Über crotoactin, das Haupttoxin des Giftes der brasilianischen Klapperschlange (*Crotalus terrificus terrificus*). *Biochem. Z.*, 327:170-85, 1955.
 51. OMORI-SATO, T.; LANG, J.; BREITHAUPT, H.; HABERMANN, E. Partial amino acid sequence of the basic crotalus phospholipase A. *Toxicol.*, 13:69-71, 1975.
 52. OUCHTERLONY, O. Diffusion in gel methods for immunological analysis. *Progr. Allergy*, 5:1-78, 1958.
 53. OUCHTERLONY, O. Immunodiffusion and immunoelectrophoresis. In: WEIR, D. M., ed. *Handbook of experimental immunology*. Oxford, Blackwell Sci., 1967.
 54. PATHY, L. & SMITH, E. L. Reversible modification of arginine residues. Application to sequence studies by restriction of tryptic hydrolysis to lysine residues. *J. biol. Chem.*, 250:557-64, 1975.
 55. PERLSTEIN, M. T. & ATASSI, M. Z. Immunochemistry of sperm whale myoglobin: conclusions relating to antigenic structures of proteins. *Immunochemistry*, 11:63-70, 1974.

56. PUJIK, W. C.; VERHEIJ, H. M.; DE HAAS, G. The primary structure of phospholipase A₂ from porcine pancreas. A reinvestigation. *Biochem. biophys. Acta*, 492:254-9, 1977.
57. REED, L. J. & MUENCH, H. A simple method of estimating fifty percent endpoints. *Amer. J. Hyg.*, 27:493, 1938.
58. ROGERO, J. R.; NAKAZONE, A. K.; GONÇALVES, J. M. Interação de crotopotín com fosfolipase A e crotamina. In: IIª REUNIÓN regional de la Asociación de Sociedades Americanas de Bioquímica (PAABS), Córdoba, Argentina, 2 a 4 de novembro de 1977.
59. RÜBSAMEN, K.; BREITHAUPT, H.; HABERMANN, E. Biochemistry and pharmacology of crotoxin complex. *Naunyn-Schmiedberg's Arch. exp. Path. Pharmacol.*, 270:274-88, 1971.
60. SAKAGUCHI, S. A new method for colorimetric determination of arginine. *J. Biochem.*, 37(2):231-6, 1950.
61. SAKAGUCHI, G. Radiosensitivities of "Cl. botulinum" type-E toxins. In: INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY. *Radiation sensitivity of toxins and animal poisons: proceedings of a panel on... held in Bangkok, 19-22 May, 1969*. Vienna, 1970. p.31-40. (Panel proceedings series).
62. SIMIZU, K. Ação do ácido β-bromopirúvico sobre aldolase da frutose 1,6 d'fosfato de músculo estriado de coelho. São Paulo, 1972. (Tese de doutoramento).
63. SKALKA, M. & ANTONI, F. Effect of radiation on the biological properties of proteins. In: INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY. *Radiation sensitivity of toxins and animal poisons: proceedings of a panel on... held in Bangkok, 19-22 May, 1969*. Vienna, 1970. p.1-11. (Panel proceedings series).
64. SLOTTA, C. H. & FRAENKEL-CONRAT, H. L. Purificação e cristalização do veneno de cobra cascavel. *Mems Inst. Butantan*, 12:505-13, 1938-1939.
65. STARK, G. R. Modification of proteins with cyanate. *Meth. Enzymol.*, 11:590-4, 1967.
66. STARK, G. R. Reactions of cyanate with functional groups of proteins. III. Reactions with amino and carboxyl groups. *Biochemistry*, 4(6):1030-6, 1965.
67. STARK, G. R. Recent developments in chemical modification and sequential degradation of proteins. *Adv. Protein Chem.*, 24:261-309, 1970.
68. STARK, G. R.; STEIN, W. H.; MOORE, S. Reaction of the cyanate present in aqueous urea with amino acids and proteins. *J. Biol. Chem.*, 235(1):3177-81, 1960.
69. SUGAVARA, S. Importância do grupo α-amino terminal da bradicinina e cininas relacionadas sobre o aumento da permeabilidade capilar. São Paulo, 1977. (Tese de doutoramento).
70. SUNDARAM, K.; SUNDARESAN, P.; PHONDKE, G. P. Effect of ⁶⁰Co gamma irradiation on antigen-antibody systems. In: INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY. *Radiation sensitivity of toxins and animal poisons: proceedings of a panel on... held in Bangkok, 19-22 May, 1969*. Vienna, 1970. p.13-8. (Panel proceedings series).
71. SWALLOW, A. J. *Radiation chemistry of organic compounds*. New York, N. Y., Pergamon, 1960. p.210.
72. TAKAHASHI, K. The reaction of phenylglyoxal with arginine residues in proteins. *J. Biol. Chem.*, 243(23):6171-9, 1968.

73. TOMLINSON, G. & VISWANATHA, T. Determination of the arginine content of protein by the Sakaguchi procedure. *An. Biochem.*, 60:15-24, 1974.
74. TU, A. T. Neurotoxins of animal venom: snakes. *A. Rev. Biochem.*, 42:235-58, 1973.
75. TU, A. T.; HONG, B.; SOLIE, T. N. Characterization and chemical modifications of toxins isolated from the venom of snake, *Laticauda semifasciata*, from Philipines. *Biochemistry*, 10:1295-304, 1971.
76. VILJOEN, C.; VISSER, L.; BOTFS, D. P. Histidine and lysine residues and the activity of phospholipase A₂ from the venora of *Bitis gabonica*. *Biochem. biophys. Acta*, 483:107-20, 1977.
77. VOGUEL, A. I. *Química analítica cualitativa*. 4. ed. Buenos Aires, Kapeluz, 1959. p.269-70.
78. WINSTEAD, J. A. The role of sulphhydryl groups in radiation sensitivity and chemical protection in enzymes. *Radiat. Res.*, 30:832-40, 1967.
79. YANG, C. C. Structure-activity relationships and immunochemical studies on cobrotoxin. In: INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY. *Radiation sensitivity of toxins and animal poisons: proceedings of a panel on... held in Bangkok, 19-22 May, 1969*. Vienna, 1970. p.63-74. (Panel proceedings series).
80. YANG, C. C. & WEI, H. C. Studies on fluorescent cobrotoxin. *Biochem. biophys. Acta*, 147:600-2, 1967.
81. YANG, C. C.; CHANG, C. C.; LIOU, I. F. Studies on the status of arginine residues in cobrotoxin. *Biochem. biophys. Acta*, 365:1-14, 1974.



INSTITUTO DE ENERGIA ATÔMICA
Caixa Postal, 11049 – Pinheiros
CEP 05508
01000 – São Paulo – SP

Telefone: 211-6011
Endereço Telegráfico – IEATOMICA
Telex – 011-23592 IENA BR