



**TOXINAS DO VENENO DE CROTALUS DURISSUS TERRIFICUS.
INTERAÇÃO PROTEÍNA – PROTEÍNA E CINÉTICA DE
TROCA ISOTÓPICA HIDROGÊNIO – TRÍCIO**

José Roberto Rogero

**DISSERTAÇÃO E TESE - IEA 119
IEA - DT - 119**

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

**TOXINAS DO VENENO DE CROTALUS DURISSUS TERRIFICUS.
INTERAÇÃO PROTEÍNA – PROTEÍNA E CINÉTICA DE
TROCA ISOTÓPICA HIDROGÊNIO – TRÍCIO**

José Roberto Rogero

**Tese para obtenção do Título de “Doutor em Ciências” –
Área de Bioquímica – Orientador: Prof. Dr. José Moura
Gonçalves. Apresentada e defendida em 25 de agosto
de 1978, no Instituto de Química da Universidade de
São Paulo**

**INSTITUTO DE ENERGIA ATÔMICA
SÃO PAULO – BRASIL**

Série DISSERTAÇÃO E TESE IEA

INIS Categories and Descriptors

C45

Snakes

Venoms

Toxins

Proteins

← **Interactions**

Hydrogen

Tritium

Isotopic exchange

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

SUMÁRIO

	Página
I – INTRODUÇÃO E PROPÓSITOS	1
II – MATERIAIS E MÉTODOS	3
II.1 – Purificação de Crotamina, Crotapotin e Fosfolipase A	3
II.2 – Eletroforese em Gel de Poliacrilamida	4
II.2.1 – Eletroforese de Crotapotin	4
II.2.2 – Eletroforese de Crotamina e Fosfolipase A	5
II.3 – Análise de Aminoácidos	5
II.3.1 – Análise do Padrão de Aminoácidos	5
II.3.2 – Análise das Proteínas	5
II.4 – Medida da Atividade Enzimática da Fosfolipase A	5
II.5 – Determinação da Presença de Fatores Coagulantes	6
II.6 – Dosagens das Proteínas	6
II.7 – Curvas de Absorbância das Proteínas	6
II.8 – Determinação de Grupos SH Livres	7
II.9 – Marcação de Crotapotin com ¹²⁵ I	7
II.9.1 – Controle Eletroforético do Pico de Crotapotin ¹²⁵ I	7
II.10 – Determinação da DL ₅₀ das Proteínas	7
II.11 – Medida da Velocidade de Troca Hidrogênio-Trítio	8
II.11.1 – Medida do "Exchange Out" da Crotamina	9
II.11.2 – Medida do "Exchange Out" da Fosfolipase A	10
II.11.3 – Medida do "Exchange Out" da Crotapotin	10
II.11.4 – Medida do "Exchange Out" da Crotoxina	10
II.11.5 – Medida da Radioatividade	11
II.11.6 – Cálculo da Eficiência de Contagem	11
II.11.7 – Cálculo do Número de Hidrogênios Teoricamente Trocáveis	11
II.11.8 – Ajustes aos Dados Obtidos pela Troca Isotópica Hidrogênio-Trítio	12
II.12 – Interação das Proteínas	12
II.12.1 – Medida da Área dos Picos	12
II.12.2 – Interação entre Fosfolipase A e Crotapotin	13
II.12.3 – Cromatografia de Crotoxina	13
II.12.4 – Interação entre Fosfolipase A e Crotapotin Contendo Crotapotin- ¹²⁵ I como Traçador	13
II.12.5 – Interação entre Crotamina e Crotapotin	13
II.12.6 – Interação entre Crotamina e Crotapotin Contendo Crotapotin- ¹²⁵ I como Traçador	13

	Página
III – RESULTADOS	14
III.1 – Purificação de Crotamina, Crotopotin e Fosfolipase A	14
III.2 – Eletroforese em Gel de Poliacrilamida	20
III.3 – Presença de Fatores Coagulantes	20
III.4 – Dosagens das Proteínas	20
III.5 – Análise de Aminoácidos	20
III.6 – Absorção das Proteínas no UV	20
III.7 – Medida da Atividade Enzimática da Fosfolipase A	20
III.8 – Determinação de Grupos SH Livres	24
III.9 – Interação entre Fosfolipase A e Crotopotin	24
III.10 – Interação entre Crotopotin e Crotamina	24
III.11 – Interação entre Fosfolipase A e Crotamina com Crotopotin Contendo Crotopotin- ¹²⁵ I como Traçador	24
III.12 – Determinação da DL ₅₀	30
III.13 – Medida da Velocidade de Troca Hidrogênio-Trítio	30
III.13.1 – Troca H/T da Fosfolipase A	32
III.13.2 – Troca H/T da Crotopotin	32
III.13.3 – Troca H/T da Crotoxina	37
III.13.4 – Troca H/T da Crotamina	37
III.14 – Medida de Radioatividade	37
 IV – DISCUSSÃO	 42
 V – CONCLUSÕES	 48
 APÊNDICE 1	 50
 APÊNDICE 2	 71
 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	 78

TOXINAS DO VENENO DE CROTALUS DURISSUS TERRIFICUS. INTERAÇÃO PROTEÍNA – PROTEÍNA E CINÉTICA DE TROCA ISOTÓPICA HIDROGÊNIO – TRÍCIO

José Roberto Rogero

RESUMO

A Fosfolipase A, Crotapotin e Crotamina foram purificadas a partir do veneno de *Crotalus durissus terrificus*. Mediante análise de aminoácidos das proteínas ficou estabelecido um peso molecular 13400 para Fosfolipase A, 8300 para Crotapotin e 4880 para Crotamina. Crotapotin interage com Fosfolipase A ($DL_{50} = 0,55$ mg/Kg peso) dando um complexo estável durante a filtração em gel Sephadex G 75 fino, quando a proporção molar de interação é 1:1. O complexo formado é cerca de 10 vezes mais tóxico do que a Fosfolipase A sozinha, quando injetado i.p. em camundongos ($DL_{50} = 0,05$ mg/Kg peso). Estes fatos levam a supor que a Crotoxina, toxina neurotóxica cristalizável do veneno de *Crotalus d. terrificus*, resulta da interação Crotapotin-Fosfolipase A na proporção molar 1:1. A Crotapotin interage com Crotamina ($DL_{50} = 0,2$ mg/Kg peso), formando um complexo dissociável durante a filtração em gel Sephadex G 75 fino. Quando o complexo formado "in vitro" na proporção molar de 1:1 é injetado em camundongos apresenta uma toxicidade cerca de 4 vezes maior do que a Crotamina sozinha ($DL_{50} = 0,2$ mg/Kg peso). O estudo da cinética de troca isotópica H/T foi feito em Fosfolipase A, Crotapotin, Crotamina e Crotoxina, utilizando o método de filtração em colunas de Sephadex G 25 "coarse". O melhor ajuste dos dados experimentais de troca H/T de Fosfolipase A apresenta uma equação que é composta de duas exponenciais, caracterizando duas classes de hidrogênios. Mostra também que a Fosfolipase A tem 68% dos hidrogênios teoricamente trocáveis, muito rápidos e, não apresenta hidrogênios com velocidades de troca próxima daqueles envolvidos em alfa-hélice. A Crotapotin pela mesma análise não apresenta hidrogênios envolvidos em alfa-hélice e 83% dos teoricamente trocáveis, são rapidamente trocados com o solvente. A Crotamina pela medida da cinética de troca H/T, após um aquecimento inicial com 3H_2O a $70^\circ C$ por 2 horas, mostra que dos hidrogênios teoricamente trocáveis, 31% são lentos. Quando o aquecimento inicial é prolongado na mesma temperatura por 18 horas, os hidrogênios lentos diminuem para 11%. A aplicação da técnica de medida da cinética de troca H/T na Crotoxina, mostra o aparecimento de 26 hidrogênios que trocam com velocidades semelhantes àqueles envolvidos em alfa-hélice. Este fato sugere que possivelmente ocorreria uma mudança conformacional após a interação Fosfolipase A - Crotapotin, originando a Crotoxina.

I – INTRODUÇÃO E PROPÓSITOS

A Crotoxina, proteína neurotóxica do veneno *Crotalus durissus terrificus*, foi pela primeira vez isolada e cristalizada por Slotta e Fraenkel-Conrat⁽⁶⁰⁾, em 1938. Estudos por eletroforese com aparelho de Tiselius⁽⁶⁰⁾ e por ultracentrifugação⁽³⁷⁾, mostraram ser a Crotoxina uma proteína homogênea de peso molecular aproximadamente 30000.

Durante algum tempo a Crotoxina permaneceu como uma proteína homogênea e cristalizável apesar de apresentar além da neurotoxicidade, atividade fosfolipásica⁽⁴¹⁾.

Em 1956, Neumann e Habermann⁽⁶⁸⁾ procurando retirar da Crotoxina a atividade fosfolipásica, identificaram uma nova proteína que continha a mesma ação tóxica da Crotoxina, porém

com uma atividade fosfolipásica menor. A esta nova proteína eles denominaram Crotactina. Entretanto esta nova toxina não pode ser purificada e isolada em quantidade que possibilitasse sua caracterização mais detalhada^(39,40).

A primeira evidência definitiva da existência na Crotovina de duas proteínas diferentes, apareceu com o tratamento da proteína pelo fluordinitrobenzeno, que em função da solubilidade em água possibilitou o isolamento de duas dinitrofenil-proteínas que se diferenciavam em muito nas suas composições de aminoácidos⁽²⁹⁾.

Após um longo período onde se temos trabalhos realizados por Vital Brasil et alii^(43,81,82,83) sobre a farmacologia da Crotovina, dois grupos de pesquisadores liderados por Hendon e Fraenkel-Conrat⁽⁴⁷⁾ e Rubsamen et alii⁽⁷⁸⁾ publicam no mesmo ano de 1971, o fracionamento da Crotovina em coluna de troca iônica, isolando e caracterizando duas proteínas diferentes.

Estas proteínas se diferenciavam em primeiro lugar pela composição de aminoácidos, uma extremamente ácida e outra extremamente básica e, pela toxicidade, que mostrava que a proteína ácida não era tóxica e a proteína básica tinha toxicidade baixa. A proteína ácida potenciava a básica e por isso foi chamada Crotapotin. A proteína básica foi identificada como sendo uma Fosfolipase A (EC 3.1.1.4.). As duas proteínas se recombinavam dando origem à Crotovina.

As características das subunidades da Crotovina e a interação entre elas, têm merecido uma série de publicações nos últimos anos^(5,42,48,49,70).

A Crotamina, proteína tóxica de uma variedade de veneno de *Crotalus d. terrificus*, foi isolada e caracterizada por eletroforese por Gonçalves e Vieira⁽³⁶⁾, em 1950.

A Crotamina anteriormente, purificada por Amberlite IRC 50⁽³²⁾ e SP Sephadex C 25⁽⁵⁹⁾, estudada quanto ao seu peso molecular^(33,34) e quanto a sua ação farmacológica^(10,31,32), teve sua seqüência de aminoácidos determinada recentemente mostrando um peso molecular de 4880⁽⁵⁸⁾.

É uma proteína muito básica de pI: 10,3⁽³²⁾ que apresenta, quase sempre, na purificação do veneno global por filtração em gel Sephadex G 75 uma contaminação com uma fração ácida revelada por Cheymol et alii⁽¹⁰⁾ após cromatografia em troca iônica com Carboximetil Sephadex C 25.

Os propósitos deste trabalho foram em primeiro lugar pela técnica de filtração em gel, definir nas toxinas purificadas as estequiometrias das interações Crotapotin-Fosfolipase A e Crotapotin-Crotamina, bem como, a toxicidade dos complexos formados; em segundo lugar aplicando a técnica de troca isotópica hidrogênio-trício, estudar as possíveis mudanças conformacionais que ocorreriam pela interação entre as proteínas citadas.

A técnica de filtração em gel para determinar constantes de associação de proteínas, interações proteínas-peptídeos, etc. tem sido muito usada com base no trabalho de Hummel e Dreyer⁽⁵⁰⁾ com o chamado "método do poço"^(1,28,56).

No nosso caso a intenção primordial foi a de tentar isolar o complexo formado e daí determinar as proporções molares de interações. As participações da Crotapotin nos complexos com a Fosfolipase A e com Crotamina, foi melhor visualizada com o uso de Crotapotin marcada com ¹²⁵I, como traçador.

O estudo do comportamento estrutural de uma proteína em solução pela técnica de troca isotópica hidrogênio-deutério, foi feito pela primeira vez na Insulina por Linderstrom-Lang⁽⁶¹⁾, em 1955.

Vários trabalhos se seguiram, utilizando sempre o mesmo método inicial, aplicando-o em proteínas como Ribonuclease⁽⁵¹⁾ e a Lisozima^(52,53). Destes trabalhos foi possível destacar que

peptídeos simples ou polipeptídeos com conformação ao acaso em solução aquosa, trocavam seus hidrogênios lábeis (aqueles ligados a O, N, S) com o solvente, em poucos minutos. Por outro lado, uma proteína nativa troca os hidrogênios peptídicos com uma velocidade consideravelmente mais baixa. Estes hidrogênios da proteína que trocavam com o solvente com velocidades muito baixas, foram inicialmente definidos como participantes das pontes de hidrogênio de uma alfa hélice. Mais tarde porém, com o uso da técnica de RX para esclarecer as estruturas conformacionais de algumas proteínas, verificou-se que não havia concordância entre as porcentagens de alfa hélice e as porcentagens de hidrogênios lentos obtidos pela troca H/D ou H/T.

A técnica original de Linderstrom-Lang que envolvia uma série muito grande de operações, tais como, liofilização, aquecimento a 60°C, congelamento, etc. foi elegantemente modificada por Englander⁽²⁰⁾, em 1963.

O autor passou a utilizar trítio e a retirar o excesso do isótopo por filtração rápida em pequenas colunas de gel Sephadex G 25 "coarse". Pela quantidade de trítio carregada pela proteína, podia-se calcular o número de hidrogênios que foram trocados.

A técnica desenvolvida por Englander passou a ser muito utilizada no estudo da conformação de muitos compostos, tais como polipeptídeos^(24,30,69,84), proteínas^(7,14,15,88), ácidos nucleicos⁽⁷³⁾ e hormônios de crescimento⁽⁹⁾. As colunas de gel Sephadex foram algumas vezes substituídas por uma microdiálise rápida, com resultados muito semelhantes⁽²¹⁾.

No nosso trabalho aplicamos a técnica de medida da velocidade de troca isotópica hidrogênio-trítio, com a utilização de colunas de gel Sephadex G 25 "coarse".

A técnica foi inicialmente empregada às proteínas isoladas, para nos dar uma idéia da conformação destas em solução e, em seguida foi usada no estudo das possíveis mudanças conformacionais que ocorreriam pela interação Fosfolipase A-Crotapotin.

II – MATERIAIS E MÉTODOS

II.1 – Purificação de Crotamina, Crotapotin e Fosfolipase A

As proteínas usadas neste trabalho foram purificadas a partir do veneno bruto e seco de cascavel brasileira (*Crotalus durissus terrificus*).

Foram trabalhados dois tipos de venenos, sendo que só um deles denominado por Gonçalves em 1956⁽³²⁾ variedade *crotaminicus*, continha crotamina. Em ambos os casos a tecnologia de purificação foi a mesma, diferenciando-se apenas sobre qual proteína se desejava obter.

Os métodos utilizados para essa purificação foram os empregados em 1971, por Hendon e Fraenkel-Conrat⁽⁴⁷⁾ e Rubsamen et alii⁽⁷⁸⁾, com algumas modificações.

Cerca de 200 mg de veneno bruto seco, foram dissolvidos em 10 ml de ácido acético 0,1 M, separando sobrenadante por centrifugação a 10 000 rpm, e desprezando o precipitado. O sobrenadante foi submetido à filtração em uma coluna de 3 cm x 80 cm de gel Sephadex G 75 fino. Com um fluxo de 0,5 ml por minuto recolheu-se 10 ml por tubo de efluente num coletor de frações Gilson, acompanhando o perfil cromatográfico com um monitor de UV equipado com filtro para 280 nm e registrador.

A maior quantidade em massa e conseqüentemente, o maior pico de absorbância a 280 nm do perfil cromatográfico, pertence à Crototoxina.

Os tubos correspondentes ao pico de Crototoxina foram separados, juntados e liofilizados num

liofilizador Virtis, modelo 10-100. Quando o veneno contém Crotamina, aparece no perfil cromatográfico mais um pico logo após a Crotoxina, ocasionando uma separação mais difícil, quase sempre com contaminação cruzada, das duas proteínas.

A Crotoxina liofilizada foi algumas vezes recromatografada nas mesmas condições usadas para o veneno, sem porém mostrar melhoria no seu estado de pureza.

O segundo passo da purificação foi o fracionamento da Crotoxina em coluna de troca iônica, realizada a 4°C.

Cerca de 100 mg de Crotoxina foram dissolvidos em 5 ml de tampão ácido formico-formiato de amônio 0,05 M, pH 3,5. A esta mistura levemente turva, acrescentou-se algumas gotas de ácido fórmico diluído até obtenção de uma solução límpida.

A amostra assim trabalhada, foi colocada sobre uma coluna de 0,9 cm x 40 cm de SP Sephadex C 25, equilibrado com tampão formiato 0,05 M, pH 3,5. A eluição foi feita com volume total de 400 ml de um gradiente linear salino de 0 a 3 M de NaCl.

O perfil cromatográfico foi acompanhado através de um monitor UV Gilson equipado com registrador e, frações de 4 ml do efluente foram coletadas num coletor de frações também Gilson, com um fluxo de 0,2 ml/minuto.

Os picos correspondentes a Crotapotin, Fosfolipase A e Crotamina, foram recolhidos e separadamente dialisados contra água deionizada até reação negativa para cloreto com nitrato de prata.

Os sacos de diálise utilizados foram previamente tratados com uma mistura de anidrido acético-piridina, na proporção de 1:1, por 12 horas, para redução do diâmetro dos poros, afim de evitar perda de proteínas no processo de diálise.

A Crotamina e a Fosfolipase A foram recromatografadas várias vezes em SP Sephadex C 25 nas mesmas condições anteriores, até obter-se um pico único e homogêneo de cada proteína.

A Crotapotin foi recromatografada várias vezes em colunas de 0,9 cm x 30 cm de DEAE Sephadex A 25, equilibrado com tampão formiato 0,05 M, pH 3,5 e eluída com 300 ml de um gradiente linear salino de 0 a 3 M de NaCl, afim de se obter um pico único e homogêneo de Crotapotin.

As proteínas cromatograficamente puras foram dialisadas, liofilizadas e estocadas sob vácuo em dessecadores mantidos na geladeira.

11.2 – Eletroforese em Gel de Poliacrilamida

O processo empregado foi o descrito por Davis⁽¹²⁾ em 1964, usando-se equipamento específico da Canalco, modelo 120, com tubos de vidro de 0,4 cm por 7,5 cm.

11.2.1 – Eletroforese de Crotapotin

A eletroforese foi feita em tubos contendo gel de poliacrilamida a 7%. Em cada tubo colocou-se 50 µl de amostra na concentração de 2 mg de Crotapotin por ml de tampão Tris-glicina pH 9,5. A corrida foi efetuada utilizando-se o mesmo tampão nas cubas, o eletrodo colocado na posição normal (polo positivo na parte inferior) e uma corrente de 3 mA por tubo, durante uma hora.

Após a corrida o gel foi retirado dos tubos e colocado por 30 minutos em ácido tricloroacético

(TCA) a 12% para fixação da proteína. Em seguida, o gel foi lavado várias vezes com água e corado com Comassie Brilliant blue R 250. A descoloração foi feita com lavagens seguidas com uma mistura de metanol:ácido acético:H₂O na proporção em volume de 50:75:875.

Após a descoloração os géis foram fotografados.

II.2.2 – Eletroforese de Crotamina e Fosfolipase A

A eletroforese foi realizada em tubos contendo gel de poliacrilamida a 15%. O tampão utilizado foi o de beta-alanina – ácido acético, pH 4,3 e a concentração da amostra de 2 mg/ml do mesmo tampão. Efetuou-se a corrida com 3 mA por tubo, durante uma hora. Os géis foram fixados, corados e descorados como no item II.2.1.

II.3 – Análise de Aminoácidos

A composição de aminoácidos foi determinada nas proteínas que mostraram apenas uma banda na eletroforese em gel de poliacrilamida. Utilizou-se analisador de aminoácidos Beckman, modelo 120 C.

II.3.1 – Análise do Padrão de Aminoácidos

Uma solução estoque padronizada (Aminoacid Calibration Mixture-Beckman) serviu de padrão para determinar as constantes relativas às áreas correspondentes a cada aminoácido.

Amostras contendo 0,1 μ mol de cada aminoácido foram diluídas em tampão citrato 0,2 N, pH 2,2 e analisadas nas colunas contendo: resina PA 35 (Custom Resin type PA 35 – Beckman) eluídas com tampão citrato 0,35 M, pH 5,8 para os aminoácidos básicos; resina AA 15 (Custom Resin type AA 15 – Beckman) eluídas com tampão citrato 0,2 M, pH 3,28 e, em seguida com mesmo tampão com pH 4,25, para os aminoácidos neutros e ácidos.

II.3.2 – Análise das Proteínas

Dois miligramas das proteínas (Crotapotin, Fosfolipase A e Crotamina) foram dissolvidos em 1,0 ml de ácido clorídrico 6 N, em ampolas especiais que permitiram, após dissolução das proteínas, o seu fechamento sob vácuo. Em seguida, as amostras foram colocadas a 120°C por 10 h, 20 h e 24 h, para a hidrólise.

Após o tratamento as amostras foram lavadas três vezes com água bidestilada e secadas sob vácuo na presença de pentóxido de fósforo. Em seguida dissolvidas em 0,5 ml de tampão citrato e analisadas segundo procedimento usual.

II.4 – Medida da Atividade Enzimática da Fosfolipase A

O processo empregado foi o descrito por Habermann et al.⁽⁴¹⁾ onde uma suspensão de gema de ovo é utilizada como substrato. A Fosfolipase A age na lecitina presente na gema, dando a lisolectina que na presença de glóbulos vermelhos provoca hemólise, que é quantificada pela absorbância a 578 nm. Foi utilizado para as leituras de absorbância um espectrofotômetro Carl Zeiss, modelo PMQ II.

A curva padrão de hemólise foi obtida com a Fosfolipase A pura da seguinte maneira: 0, 5, 20, 30, 40, 50 μ g de Fosfolipase A por 50 μ l de solução fisiológica foram pipetados sobre 50 μ l de gema de

ovo fresca e, logo após agitação as amostras foram incubadas a 37°C por duas horas. Em seguida, 4 ml de suspensão de glóbulos vermelhos a 0,6% em solução fisiológica foram adicionadas aos tubos pré-incubados de Fosfolipase A de gema de ovo. Os glóbulos vermelhos utilizados foram obtidos de sangue de rato, lavados com solução fisiológica e separados por centrifugação repetindo-se essa operação por três vezes.

Os tubos contendo Fosfolipase A, gema de ovo e glóbulos vermelhos foram agitados e incubados a 37°C por 40 minutos. Logo a seguir as amostras foram centrifugadas a 1500 rpm por 10 minutos, e os sobrenadantes foram lidos a 578 nm.

Todos os outros testes de atividade enzimática de Fosfolipase A foram realizados usando-se solução contendo 1 mg de Fosfolipase A/ml solução fisiológica, calculando-se porcentagem de hemólise através da curva padrão.

II.5 – Determinação da Presença de Fatores Coagulantes

O veneno de *Crotalus d. terrificus* é muito rico em enzimas que tem a capacidade de coagular outras proteínas. A estas enzimas ou complexos enzimáticos proteolíticos denomina-se "coagulase" ou "fatores de coagulação".

Para certificar-se de que a Crotamina, Crotapotin e Fosfolipase A não apresentavam contaminação pela "coagulase", aplicou-se nas proteínas puras o teste descrito por Gonçalves⁽³²⁾ em 1956, que usa a coagulação do fibrinogênio: a 0, 100, 200, 500 µg de Fosfolipase A, Crotamina e Crotapotin, adicionou-se 1 ml de solução de fibrinogênio humano a 1 mg/ml de solução fisiológica. Usou-se como padrão positivo 100 µg de veneno bruto de cascavel.

As amostras foram incubadas a temperatura ambiente por 30 minutos e observadas quanto ao aparecimento do coágulo.

II.6 – Dosagem das Proteínas

A determinação do conteúdo protéico foi feito pelo método descrito por Lowry et alii⁽⁶²⁾ em 1951, usando-se soro albumina bovina para curva padrão.

O coeficiente de extinção molar foi determinado pela absorbância a 280 nm de soluções de 1 mg/ml, em cubas de quartzo com um cm de percurso óptico, no espectrofotômetro Carl Zeiss PMQ II.

II.7 – Curvas de Absorbâncias das Proteínas

As curvas de absorbâncias de Fosfolipase A, Crotamina e Crotapotin foram realizadas no espectrofotômetro Carl Zeiss, modelo PMQ II utilizando-se cubas de quartzo com 1 cm de percurso óptico. Para Fosfolipase A e Crotapotin, absorbância foi medida em tampão Tris 0,05 M, pH 8,06, na concentração de 1,35 mg/ml e 0,8 mg/ml respectivamente. Para a Crotamina, usou-se tampão fosfato 0,01 M, pH 7,3, na concentração de 1 mg/ml.

II.8 – Determinação de Grupos SH Livres

Para a constatação da existência de grupos SH livres nas proteínas, utilizou-se o método descrito por Ellman⁽¹⁹⁾ em 1959, que usa a cisteína como padrão e o reagente ácido 5,5'-ditio-bis-2-nitrobenzóico-Sigma.

Introduziu-se na técnica as modificações propostas por Simizu⁽⁷⁹⁾ em 1972, que seguem: a 0,5 ml da solução de proteínas contendo 0,1 mg, juntou-se 0,88 ml de tampão Tris 0,1 M, pH 8,0, 0,03 ml de solução de EDTA 0,1 M no mesmo tampão e 3,0 ml de água destilada para completar o volume. Em seguida, adicionou-se à mistura 0,02 ml do reativo de Ellman (20 mg de ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzóico em 5 ml de tampão Tris 0,1 M, pH 8,0).

Após 10 minutos fez-se a leitura de absorbância em 412 nm contra branco contendo somente Tris, EDTA, água e DTNB.

Para esclarecer a existência de grupos SH livres, porém "escondidos" e não acessíveis ao reagente, adicionou-se ao meio 0,06 ml de uréia 0,01 M, na tentativa de expor à reação os SH livres porventura existentes.

II.9 – Marcação de Crotopotín com ^{125}I

O método para marcação de proteína com ^{131}I , foi publicado por Greenwood et alii⁽³⁸⁾, em 1963.

A sequência das reações foi a seguinte: a 5 μg de Crotopotín dissolvidos em 0,5 ml de tampão fosfato 0,25 M, de pH 7,4, juntou-se um mCi de Na^{125}I contidos em aproximadamente 2 μl . A seguir, juntou-se 20 μl de uma solução (2,65 mg/ml de tampão fosfato) do oxidante cloramina T. Imediatamente após, juntou-se 20 μl de uma solução de metabissulfito de sódio (4,8 mg/ml de tampão fosfato), para parar a reação.

A proteína marcada foi então purificada por filtração em gel Sephadex G 50, empacotado numa coluna de 35 cm:1 cm, previamente equilibrado com o mesmo tampão utilizado para marcação e que serviu para eluir a coluna num fluxo de 1 ml/minuto.

Os tubos resultantes da eluição, contendo aproximadamente 1 ml cada um, foram contados no contador de radiação gama Tobor (Nuclear Chicago) para a identificação do pico de proteína radioativa.

II.9.1 – Controle Eletroforético do Pico de Crotopotín ^{125}I

Para controle da existência de iodeto livre ou de material radioativo degradado na amostra coletada, foi efetuada uma eletroforese da seguinte maneira; alíquotas das amostras foram colocadas em fitas (papel Whatman nº 1) de 2,5 cm:33 cm e submetidas a eletroforese por uma hora em tampão fosfato 0,25 M, pH 7,4, com 3 mA por fita. Utilizou-se NaI como carregador para localizar o ^{125}I livre porventura existente.

Após a eletroforese, as fitas foram reveladas com solução de acetato de chumbo a 10%. Em seguida, as fitas foram cortadas no sentido transversal, em pedaços de 1 cm e, contados no contador de radiação gama (Nuclear Chicago – série 1185).

Foram utilizados produtos marcados contendo no máximo 5% de iodo na forma de iodeto e com ausência de frações protéicas degradadas.

II.10 – Determinação da DL_{50} das Proteínas

A determinação da toxicidade da Crotopotín, Fosfolipase A e Crotamina foi feita pelo cálculo da dose letal 50% pelo método de Reed e Muench⁽⁷⁴⁾, em 1937.

A medida da DL_{50} foi realizada em camundongos suíços com peso aproximado de 25 g cada um, pela via intraperitoneal, utilizando 6 grupos de 6 camundongos cada, mais um grupo controle.

De cada proteína foram feitas as seguintes diluições: 1/1, 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, e 1/32, sendo a diluição inicial da proteína 1/1 de 500 μ g/ml de solução fisiológica.

As seis diluições acima foram injetadas num volume de 0,2 ml usando para cada diluição um grupo de 6 animais.

As mortes e sobrevividas foram anotadas 24 horas após as injeções. O cálculo foi feito da seguinte maneira:

X = % de mortalidade na diluição logo acima do valor que provocou 50% de morte ou mais.

Y = % de mortalidade na diluição logo abaixo do valor que provocou 50% de morte ou mais.

Z = diluição inferior ao valor que provocou 50% de morte.

d.p. = distância proporcional.

$\log 2$ = logaritmo decimal do fator de diluição, no nosso caso 2.

$$d.p. = \frac{50 - Y}{X - Y}$$

$$C = \log Z + (d.p. \times \log 2)$$

O antilog de C forneceu a diluição exata em que ocorreu 50% de morte, e, conseqüentemente a concentração em mg/Kg de peso.

Quando da medida da DL_{50} dos complexos Crotapotin-Fosfolipase A e Crotapotin-Crotamina, realizou-se sempre a mistura das proteínas mantendo a primeira diluição 500 μ g de proteína total, obtida pela soma das massas das duas proteínas misturadas, mas em proporções molares de 1:1. O cálculo da DL_{50} do complexo foi feito da mesma maneira descrita, porém deu-se maior importância à quantidade de proteína tóxica injetada (Crotamina ou Fosfolipase A), comparando-se o resultado obtido, com o encontrado pela injeção da proteína tóxica sozinha.

II.11 – Medida da Velocidade de Troca Isotópica Hidrogênio-Trício

A medida da velocidade de troca do trício incorporado à proteína com o solvente, "exchange out", foi realizada usando-se a técnica descrita por Englander⁽²⁰⁾, em 1963. A técnica foi aplicada à Crotamina, Fosfolipase A, Crotapotin e Crotoxina cristalizada 3 vezes e gentilmente fornecida pela equipe do professor Oswaldo Vital Brasil da UNICAMP-SP.

A técnica publicada por Englander consta dos seguintes passos: inicialmente a proteína é incubada em determinadas condições de pH e temperatura na presença de água triciada numa concentração aproximada de 10^8 cpm/ml (contagens por minuto), a seguir o excesso de trício é retirado pela filtração rápida em coluna de gel Sephadex G 25 grosso de 3 cm:8 cm, empacotada e equilibrada

com o tampão escolhido. Os tubos que contém a proteína triciada são recolhidos e os seus volumes juntados; a partir deste instante inicia-se a contagem do tempo de "exchange out". Retira-se alíquotas de tempos em tempos e filtra-se em outra coluna nas mesmas condições anteriores. Após a eluição, nos tubos que contém o pico de proteína determina-se a absorbância a 280 nm e a quantidade de radioatividade; o cálculo do número de hidrogênios por mol de proteína que permaneceram não trocados, ou seja, cujo trício não passou para o solvente decorrido determinado tempo, é feito da seguinte maneira:

$$n^{\circ} \text{ Ha/mol} = \frac{C/A}{C_0} \times 111 \times \epsilon$$

onde:

Ha = hidrogênios aparentes

C = contagem da radioatividade em cpm/ml carregada pela proteína

C₀ = radioatividade inicial de incubação em cpm/ml

A = absorbância das amostras a 280 nm

111 = concentração de átomos de hidrogênio na água

ε = coeficiente de absorção molar

Na realidade, o número de hidrogênio por mol é calculado utilizando-se um valor médio das atividades específicas (C/A) dos tubos que compõem o pico da proteína. É possível obter na região de maior concentração de proteína, pelo menos 4 valores de C/A que variam entre si num máximo de 5% e, somente a média destes valores é que foi utilizada para calcular o n^o Ha/mol, no tempo escolhido.

II.11.1 – Medida do "Exchange-Out" em Crotamina

As colunas para separação do excesso de ³H₂O foram empacotadas com gel Sephadex G 25 grosso, previamente equilibrado com tampão formiato 0,1 M, pH 3,0. Contendo 3 cm x 8 cm de gel, as colunas foram mantidas à temperatura de 3°C por meio de um banho de circulação Savant e eluídas com o mesmo tampão mantido também a 3°C.

O fluxo das colunas foi sempre fixado em 1 ml/10 segundos e a troca dos tubos foi feita manualmente de 10 em 10 segundos.

Foram utilizadas duas experiências com Crotamina, variando apenas o tempo de incubação da proteína com água triciada.

Na primeira, 12 mg de Crotamina foram dissolvidos em 1 ml de tampão formiato 0,1 M, pH 3,0, e em seguida adicionou-se gotas de ³H₂O na concentração aproximada de 4 mCi/ml dando uma medida da radioatividade inicial de aproximadamente 10⁸ cpm/ml. Uma alíquota desta amostra foi retirada para determinação da radioatividade inicial. Em seguida a amostra foi incubada por 2 horas em banho termostático a 70°C. Após a incubação e resfriamento, a amostra foi colocada em banho de gelo.

Na segunda experiência, o procedimento foi o mesmo mudando-se apenas o tempo de incubação para 18 horas a 70°C.

Os passos seguintes foram: filtração na primeira coluna de G 25, reunião dos volumes dos tubos que contém o pico de proteína, iniciando-se o tempo de contagem de saída do trítio da proteína para o solvente; de tempos em tempos retirou-se 1 ml deste "pool" para filtração numa segunda coluna e, finalmente, calculou-se a atividade específica C/A de cada tubo, a seguir usada para obtenção do nº de H/mol de proteína.

O coeficiente de extinção molar usado foi de $11650 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$, calculado pela absorção a 280 nm de uma solução de 1 mg de Crotamina por ml de tampão formiato 0,1 M, pH 3,0, usando-se um peso molecular 4880⁽⁵⁸⁾.

II.11.2 – Medida do "Exchange-Out" em Fosfolipase A

Cerca de 16 mg de Fosfolipase A foram dissolvidos em 1 ml de tampão formiato 0,1 M, pH 3,0. Adicionou-se gotas de água triciada suficientes para dar uma radioatividade inicial próxima de 10^8 cpm/ml e, incubou-se a 70°C por 2 horas.

Os passos seguintes foram os mesmos descritos no item II.11.1, utilizando-se as mesmas condições para a filtração.

O valor do coeficiente extinção molar usado no cálculo do nº H/mol, foi calculado pela absorção a 280 nm de uma solução 1 mg de Fosfolipase A/ml de tampão formiato 0,1 M, pH 3,0. Este valor foi $22512 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$, baseado num peso molecular 13400 calculado por análise de aminoácidos.

II.11.3 – Medida do "Exchange-Out" em Crotapotin

Cerca de 20 mg de Crotapotin foram dissolvidos em 1 ml de tampão formiato, 0,1 M pH 3,0. Adicionou-se a seguir gotas de $^3\text{H}_2\text{O}$ para obter uma contagem de radioatividade final próxima de 10^8 cpm/ml. A amostra foi então colocada para incubar em banho de água mantido a 60°C por 2 horas.

As colunas para filtração, bem como, os demais detalhes de procedimento, foram estabelecidos nos itens anteriores.

O valor usado do coeficiente de extinção molar da Crotapotin foi $9074 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$, calculado da mesma maneira descrita nos itens anteriores, usando-se um peso molecular de 8300 calculado com base na análise de aminoácidos.

II.11.4 – Medida do "Exchange-Out" em Crotoxina

Cerca de 20 mg de Crotoxina foram dissolvidos em 1 ml de tampão formiato 0,1 M, pH 3,0, dando uma solução levemente turva, pois o valor do pH fica próximo do pI da Crotoxina: 4,7. Adicionou-se então gotas de ácido fórmico diluído para acertar o pH, tornando a solução límpida. Em seguida, colocou-se gotas de $^3\text{H}_2\text{O}$ para dar ao meio uma radioatividade de aproximadamente 10^8 cpm/ml. A incubação foi feita em banho a 70°C por 2 horas.

Os passos seguintes de filtração em gel, leitura de absorbância e medida de radioatividade, foram efetuados da maneira descrita nos itens anteriores.

O valor do coeficiente de extinção molar da Crotoxina foi de $30597 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ calculado do mesmo modo descrito, utilizando um valor para peso molecular de 21700, obtido pelas análises de aminoácidos de Fosfolipase A e Crotapotin, considerando a Crotoxina como no resultante da interação das duas proteínas, na proporção molar de 1:1.

II.11.5 – Medida da Radioatividade

Para todos os casos em que se necessitou medir a radioatividade do trício presente na proteína, utilizou-se o líquido de cintilação de Bray⁽²⁾ em 1960.

Este líquido de cintilação é composto dos seguintes reagentes:

Naftaleno	60 g
PPO	4 g
POPOP	0,2 g
Metanol	100 ml
Etilenoglicol	20 ml
Dioxano q.s.p.	1000 ml

Nesta formulação temos: como soluto primário fluorescente o PPO (2,5 difenil-oxazol), como soluto secundário fluorescente o POPOP { p-bis [2-(5-feniloxazolil)] benzeno } e o dioxano, etileno glicol, metanol e naftaleno como solventes.

Para medida da radioatividade foi utilizado um contador de cintilação Nuclear Chicago, modelo ISOCAP 300.

A radioatividade dos itens 11.1 a 11.4 foi medida da seguinte maneira: 5 µl da amostra incubada foram adicionados a 5 ml do líquido de cintilação, agitados e contados por 10 minutos.

Após a segunda filtração na coluna de gel Sephadex G 25, dos tubos que continham a proteína radioativa foram retirados 100 µl adicionados a 5 ml de líquido de cintilação, após a agitação, colocado para contar por 10 minutos.

II.11.6 – Cálculo da Eficiência de Contagem

Para o cálculo da eficiência de contagem, foram utilizados vários padrões fornecidos pela Nuclear Chicago que continham valores de "quenching" diferentes. Com os valores obtidos nas contagens destes padrões, estabeleceu-se a curva de eficiência do aparelho, usando o método de relação de canais. Assim, com os valores de contagens no canal A/ contagens no canal B em abcissa e a % de eficiência em ordenada, traçou-se uma curva de eficiência.

Quando da contagem das amostras, os valores da relação de canais A/B foram colocados na curva padrão e daí estabelecidas as eficiências de contagens, extrapolando-as para 100% de eficiência.

Tomou-se o cuidado, de tempos em tempos, de refazer a curva de eficiência padrão para verificar, as possíveis mudanças ocorridas nas condições de medida do cintilador líquido.

II.11.7 – Cálculo do Número de Hidrogênio Teoricamente Trocáveis

Os hidrogênios que teoricamente são trocáveis com o solvente a uma velocidade mensurável são aqueles ligados a oxigênio, enxofre e nitrogênio. Os hidrogênios ligados a carbono têm uma velocidade troca isotópica muito lenta e, não foram considerados no nosso trabalho.

O cálculo do número de hidrogênios que teoricamente são trocáveis pelo trício foi feito com base na análise de aminoácidos, levando-se em consideração os hidrogênios de cadeia lateral e os peptídicos.

Em todas as experiências de troca isotópica hidrogênio-trício foram usadas condições próprias de incubação, supondo-se que todos os hidrogênios teoricamente trocáveis foram substituídos pelo trício.

II.11.8 – Ajuste dos Dados Obtidos pela Troca Isotópica H/T

Os dados obtidos pela medida da velocidade de troca de trício pelo hidrogênio, colocados em gráfico contra os respectivos tempos, delineavam uma curva que aparentemente representa uma função exponencial. Segundo Hvidt e Nielsen⁽⁵⁴⁾, a curva que representa a velocidade de troca isotópica H/T, é a resultante de uma soma de exponenciais do tipo de decaimento radioativo. Considerando este fato, foi feito para os pontos obtidos neste trabalho um ajuste para obtenção da melhor curva que passa pelos pontos experimentais. Este ajuste de soma de exponenciais foi realizado com auxílio do computador IBM/370, modelo 155.

O programa utilizado foi desenvolvido pelo National Institute of Health, Laboratory of Theoretical Biology, por Mones Berman e Marjory F. Weiss em 1974. Este programa é denominado SAAM (Simulation Analyses and Modeling) e foi utilizado na versão nº 25.

Todas as análises e ajustes foram realizadas no Centro de Processamentos de Dados do Instituto de Energia Atômica.

II.12 – Interação das Proteínas

O estudo da interação entre as proteínas, Fosfolipase A + Crotapotin e Crotamina + Crotapotin, foi realizado com o intuito de definir as proporções molares de interação. Para tanto foi utilizada a cromatografia em coluna de gel Sephadex G 75 fino com a intenção de isolar os complexos formados. A coluna usada para este estudo foi sempre a mesma, com as seguintes características: coluna refrigerada da Pharmacia Uppsala de 100 cm x 0,9 cm, empacotada com Sephadex G 75 fino até altura de 80 cm, eluída com tampão formiato 0,1 M, pH 3,5 que previamente equilibrou o gel. O fluxo foi sempre mantido em 0,2 ml/minuto. Os efluentes passavam por um monitor de UV LKB, modelo Uvicord II 8300, sendo a absorbância evidenciada com auxílio de registrador gráfico e recolhidos em coletor de frações LKB, modelo Ultrorac 7000.

Nos efluentes recolhidos foi doseada, pelo método de Lowry, a concentração das proteínas, utilizada depois no cálculo da proporção molar de interação.

II.12.1 – Medida das Áreas dos Picos

Um outro método usado para o cálculo das proporções de interação foi o da medida das áreas dos picos obtidos pela absorção a 280 nm dos efluentes da coluna.

Mantendo-se sempre as mesmas condições de cromatografia, foi realizada, em primeiro lugar, a medida da área obtida por uma solução de concentração conhecida de Crotamina, Fosfolipase A e Crotapotin.

Nas experiências de interação utilizou-se excesso de uma proteína em relação à outra obtendo-se portanto um pico que correspondia ao da proteína que não participou do complexo. Pela comparação com os valores de áreas de quantidades de proteína conhecidas e, sabendo-se o total colocado na coluna,

pode-se calcular quanto de proteína participou do complexo e conseqüentemente quanto constituiu excesso.

As medidas das áreas foram efetuadas com um planímetro da KEU FEEL & ESSER Co. N. Y., modelo 4236 M.

II.12.2 – Interação entre Fosfolipase A e Crotopotín:

O estudo da interação que ocorre entre a Fosfolipase A e Crotopotín foi realizado como descrito nos itens II.12 e II.12.1. Foram realizadas uma série de experiências nas quais se procurou variar a concentração de proteínas na coluna, modificando o excesso de uma ou de outra. Uma das experiências foi: 2,6 mg de Fosfolipase A foram dissolvidos em 0,5 ml de tampão formiato 0,05 M, pH 3,5; 0,8 mg de Crotopotín foram dissolvidos em 0,5 ml de tampão formiato 0,05 M, pH 3,5; a coluna a 4°C de gel Sephadex G 75 fino, equilibrada e empacotada com o mesmo tampão, foi de 80 cm: 0,9 cm; as soluções de Crotopotín e Fosfolipase A foram juntadas e colocadas na coluna; a eluição foi feita com o tampão citado mantendo-se um fluxo de 0,2 ml por minuto.

Os efluentes foram coletados, doseados, e a área do pico de Fosfolipase A em excesso foi medida. Os doseamentos e os valores de área foram utilizados para a determinação da proporção molar de interação.

II.12.3 – Cromatografia de Crotoxina

Com o intuito de comparar o volume efluente obtido para o complexo Crotopotín-Fosfolipase A com o da Crotoxina, fez-se a seguinte experiência: 2 mg de Crotoxina cristalizada três vezes, dando uma só banda na eletroforese em gel de poliácridamida, foram dissolvidos em 1 ml de tampão formiato 0,05 M, pH 3,5 e colocados na mesma coluna descrita no item anterior. A eluição foi feita com o mesmo tampão e o fluxo mantido a 0,2 ml por minuto.

II.12.4 – Interação entre Fosfolipase A e Crotopotín Utilizando Crotopotín – ^{125}I como Traçador

Para confirmar a participação efetiva da Crotopotín na interação com Fosfolipase A, utilizou-se Crotopotín -- ^{125}I misturada à proteína fria, como traçador.

A experiência foi a seguinte: 1,5 mg de Fosfolipase A foram dissolvidos em 0,5 ml de tampão formiato 0,05 M, pH 3,5; 1,0 mg de Crotopotín dissolvidos em 0,5 ml do mesmo tampão e 60 μl de Crotopotín -- ^{125}I , foram juntados e a amostra resultante colocada na coluna de gel Sephadex nas mesmas condições anteriores.

As absorvâncias dos efluentes foram lidas a 280 nm e as radioatividades foram determinadas no contador gama.

II.12.5 – Interação entre Crotamina e Crotopotín

Para o estudo da interação entre estas duas proteínas utilizou-se a mesma tecnologia empregada nos itens II.12.1., II.12.2. e II.12.3.

A cromatografia foi feita em coluna de gel Sephadex G 75 de 80 cm: 0,9 cm, equilibrada e empacotada com tampão formiato 0,05 M, pH 3,5, que também serviu para eluir a coluna com um fluxo de 0,2 ml/minuto.

Foram realizadas várias experiências na tentativa de isolar o complexo formado e elucidar a proporção molar de interação.

II.12.6 – Interação entre Crotamina e Crotapotin Usando Crotapotin – ^{125}I como Traçador

Para demonstrar que realmente a Crotamina interage com Crotapotin, utilizou-se Crotapotin – ^{125}I como traçador.

As condições de cromatografia foram as mesmas descritas no item anterior. Uma das experiências realizadas foi a seguinte: 3,0 mg de Crotamina foram dissolvidos em 0,5 ml de tampão formiato 0,05 M pH 3,5; a 0,8 mg de Crotapotin dissolvidos em 0,5 ml do mesmo tampão, adicionou-se 20 μl de Crotapotin – ^{125}I ; as soluções foram juntadas e colocadas na coluna. A concentração e radioatividade dos efluentes foram determinadas.

III – RESULTADOS

III.1 – Purificação de Crotamina, Fosfolipase A e Crotapotin

As proteínas utilizadas neste trabalho foram isoladas e purificadas a partir do veneno bruto e seco de cascavel brasileira (*Crotalus d. terrificus*).

A individualização das proteínas no veneno foi feita pela filtração em Sephadex G 75 como mostra a Figura 1. Esta representa um perfil cromatográfico de amostra de veneno contendo crotamina e, onde os picos III e IV correspondem à Crotoxina e Crotamina respectivamente.

Procurou-se sempre reunir somente amostras dos tubos da região de maior concentração de cada pico, para se evitar contaminações cruzadas. As proteínas assim recolhidas foram liofilizadas e separadamente submetidas aos próximos passos de purificação.

A Figura 2 mostra os padrões de absorção a 280 nm obtidos pelo fracionamento da Crotoxina em coluna de gel SP Sephadex C 25. Nesta figura podem ser visualizados, pelo menos seis picos onde os I e VI correspondem respectivamente à Crotapotin e Fosfolipase A. Os picos II, III e IV são picos intermediários de proteínas não identificadas. Os picos que correspondem à Crotapotin e Fosfolipase A são recolhidos, dialisados contra água deionizada e liofilizados.

A Figura 3 mostra a recromatografia final da Fosfolipase A, após várias passagens em SP Sephadex C 25, evidenciando apenas um pico que foi considerado cromatograficamente homogêneo.

A Crotapotin como não se liga ao SP Sephadex, foi recromatografada várias vezes em DEAE Sephadex A 25, até que se obteve um pico único e homogêneo, o que é mostrado na Figura 4.

A Crotamina isolada na filtração do veneno em Sephadex G 75 foi também recromatografada em coluna de gel SP Sephadex C 25 e seu perfil cromatográfico está mostrado na Figura 5. Pela observação característica, após injeção, do efeito da Crotamina em camundongos, ou seja, paralização das patas posteriores, foi possível identificar no gráfico da Figura 5 os picos III, IV e V com atividade de Crotamina. O material do pico V, obtido com a cromatografia de várias amostras de Crotamina em SP Sephadex, foi recolhido, dialisado e liofilizado. A proteína foi seguidas vezes repassada no mesmo gel até obtenção de pico único e homogêneo, como está mostrado com traço cheio na Figure 5.

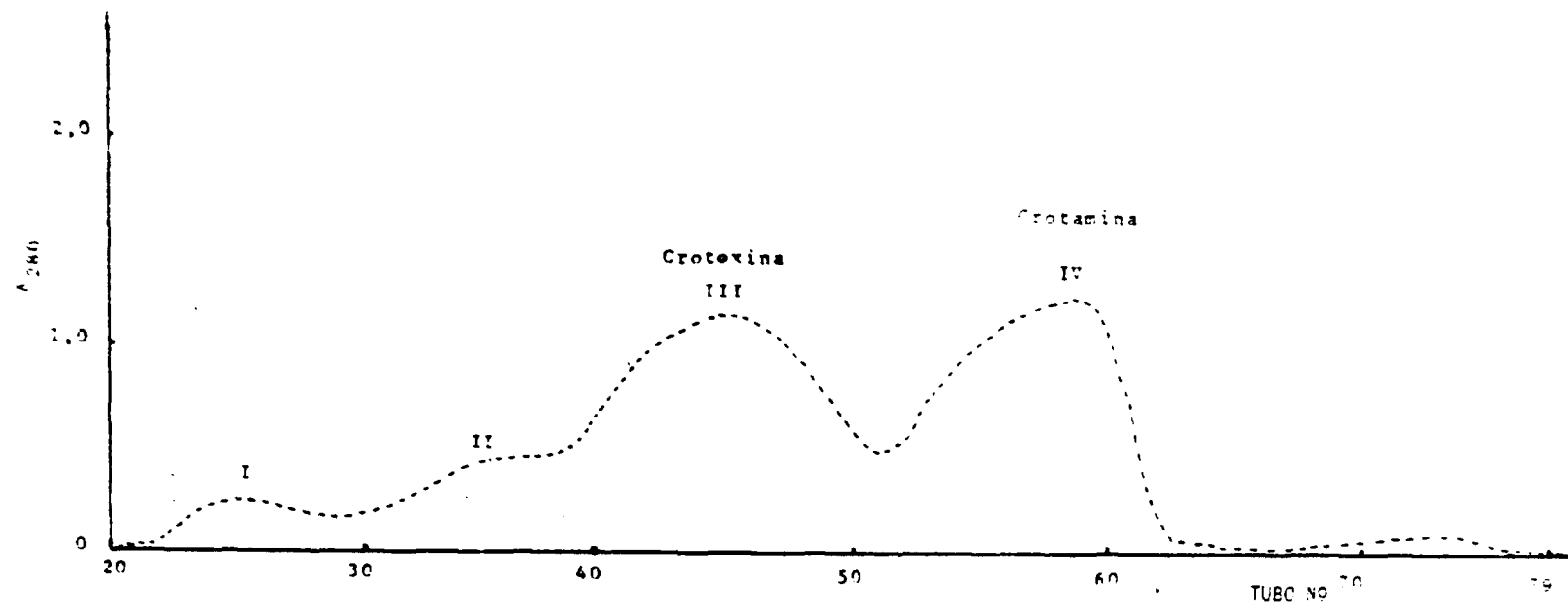


Figura 1 – Filtração do Veneno Global em Coluna de Gel Sephadex G 75. Perfil Cromatográfico da Filtração de 300 mg de Veneno Total/10 ml de Ácido Acético 0,1M. Fluxo de 0,5 ml/min com Recolhimento de 10 ml/tubo. Coluna de Gel Sephadex G 75 Fino, de 3 cm: 80 cm, Equilibrada e Eluída com Ácido Acético 0,1 M

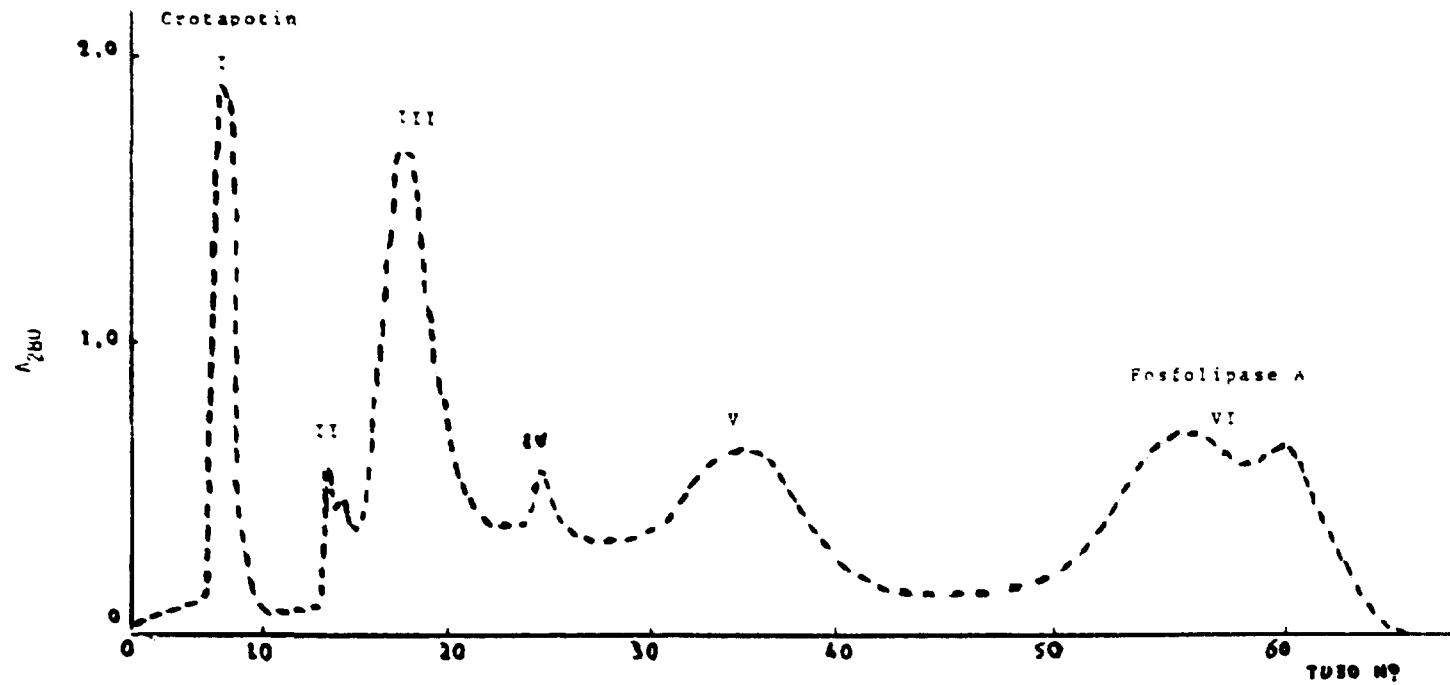


Figura 2 — Cromatografia de Crotoxina em SP Sephadex C 25. Perfil Cromatográfico Obtido pelo Fracionamento de 100 mg Crotoxina/5 ml de Tampão Formiato 0,05 M, pH 3,5 em SP Sephadex C 25, Equilibrado com Tampão Formiato 0,05 M, pH 3,5 e Eluído com Gradiente Linear Salino de 0 a 3 M de NaCl. Coluna de 0,9 cm: 40 cm, Fluxo de 0,2 ml/min com Recolhimento de 4 ml/tubo.

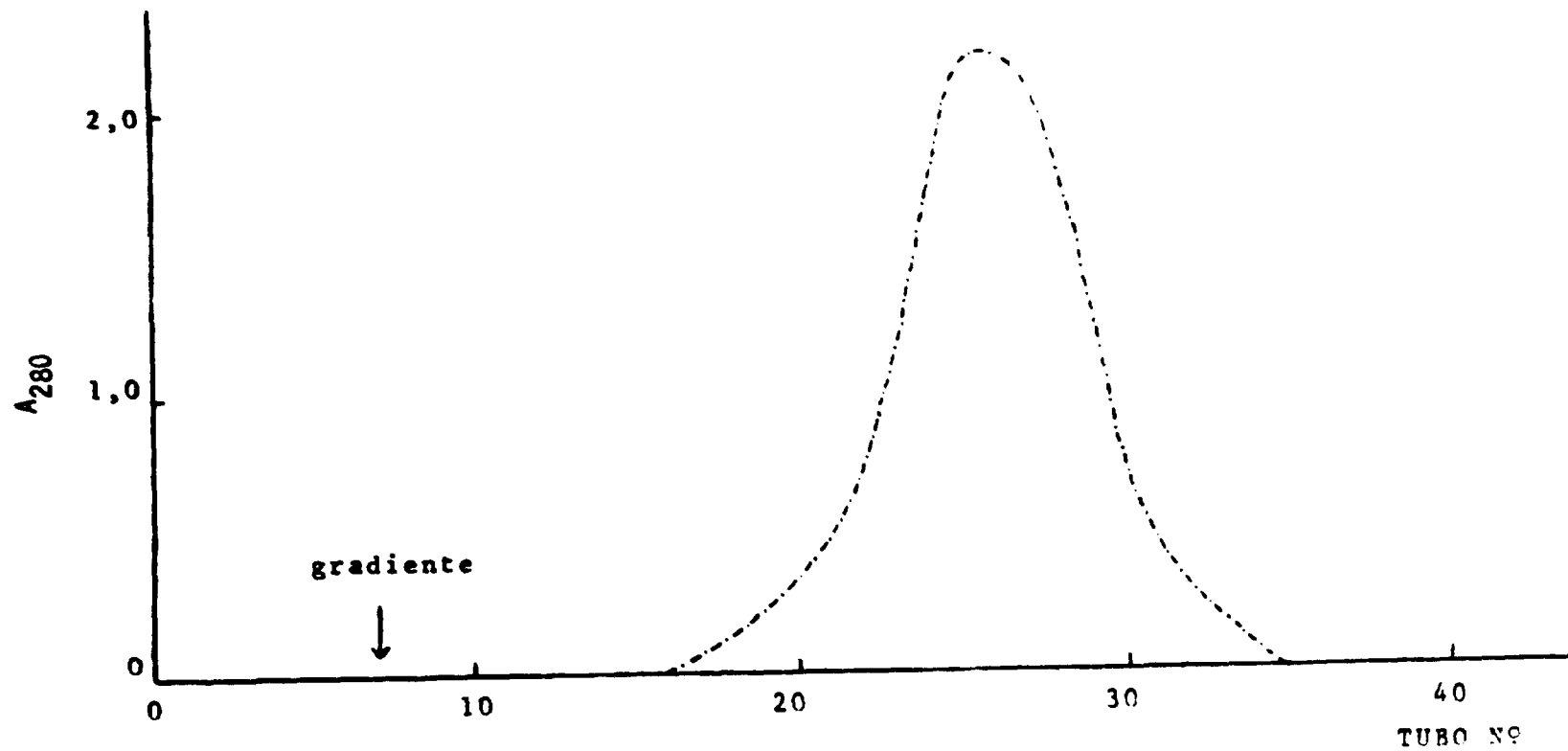


Figura 3 — Recromatografia de Fosfolipase A em SP Sephadex C 25. Recromatografia de 100 mg de Fosfolipase A/2 ml de Tampão Formiato 0,05 M, pH 3,5 em Coluna de SP Sephadex C 25 Equilibrado com Tampão Formiato 0,05 M, pH 3,5 e Eluído com Gradiente Linear Salino de 0 a 3 M de NaCl. Fluxo de 0,2 ml/min com Recolhimento de 4 ml/tubo. Coluna de 0,9 cm: 40 cm

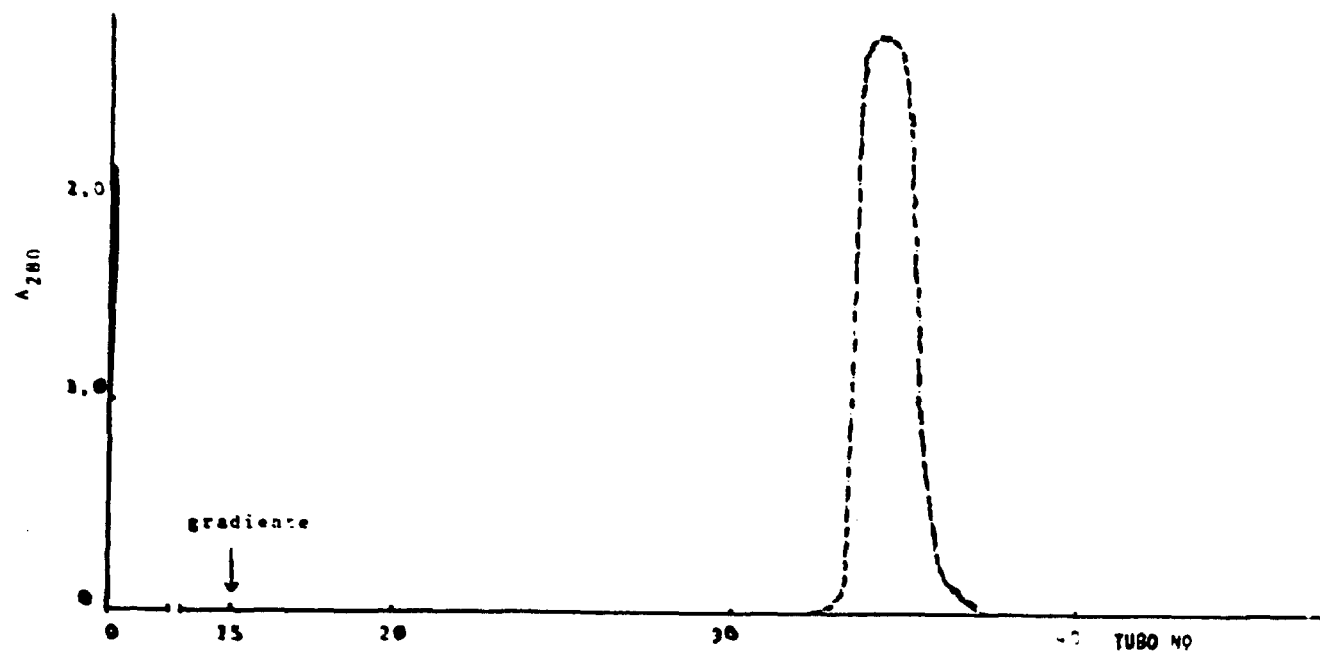


Figura 4 – Recromatografia de Crotapotin em DEAE Sephadex A 25. Coluna de DEAE Sephadex A 25, Equilibrada com Tampão Formiato 0,05 M, pH 3,5 e Eluído com um Gradiente Linear Salino de 0 a 3 M de NaCl. Fluxo de 0,2 ml/min com Recolhimento de 4 ml/tubo. Amostra Contendo 100 mg de Crotapotin/2 ml de Tampão Formiato 0,05 M, pH 3,5. Coluna de 0,9 cm: 30 cm

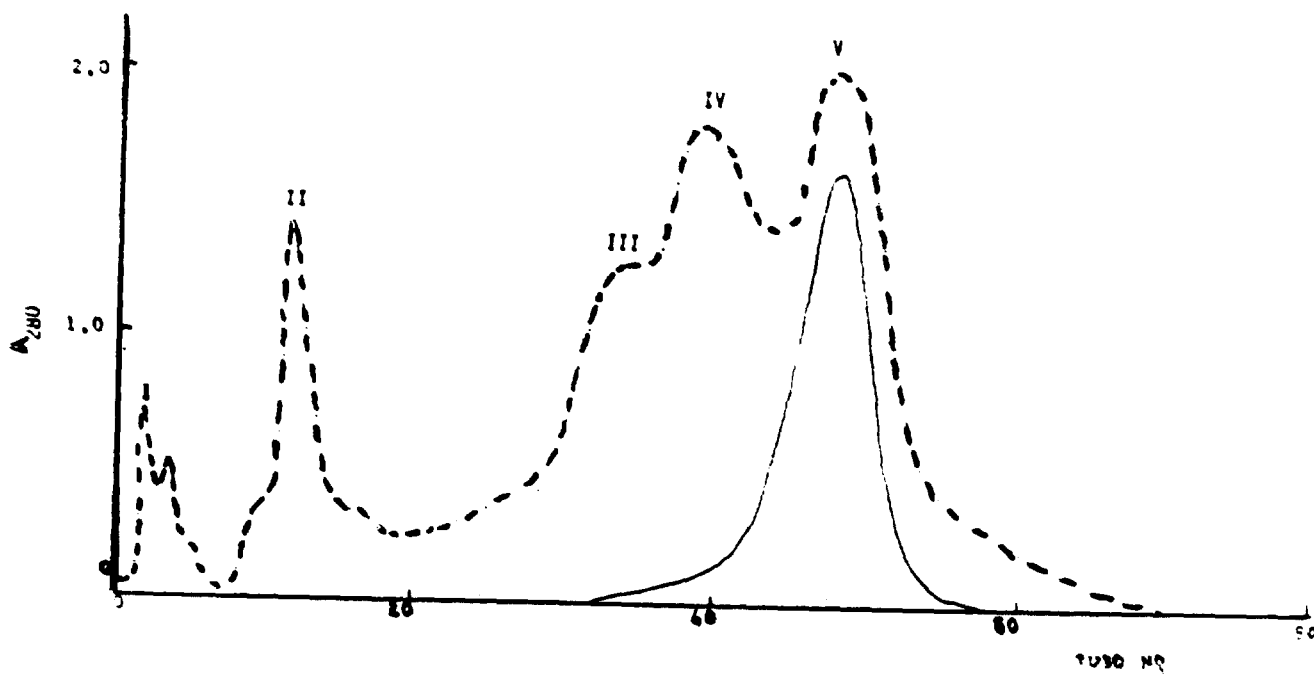


Figura 5 — Cromatografia de Crotamina em SP Sephadex C 25. Com Linha Tracejada Temos a Cromatografia de 200 mg de Crotamina/3 ml de Tampão Formiato 0,05 M, pH 3,5 e Eluída com um Gradiente Linear Salino de 0 a 3 de NaCl. Com Traço Cheio Temos a Recromatografia Final de 100 mg do Pico V/ml do Mesmo Tampão Após Várias Passagens. Os Picos III, IV e V têm Atividade de Crotamina

III.2 - Eletroforese em Gel de Poliacrilamida

Diante da possibilidade das proteínas cromatograficamente homogêneas não estarem realmente puras, foram realizadas eletroforeses em gel de poliacrilamida para verificar a pureza ao nível eletroforético. A Figura 6 mostra o aparecimento de uma única banda para Fosfolipase A, Crotamina e Crotapotin indicando proteínas eletroforéticamente puras.

III.3 - Presença de Fatores Coagulantes

Nas proteínas consideradas puras realizou-se o teste de coagulação do fibrinogênio descrito por Gonçalves⁽³²⁾, em 1956.

O teste revelou ausência completa de fatores coagulantes contaminando as proteínas. Como referência usou-se veneno bruto que apresenta alto poder de coagulação sobre o fibrinogênio.

III.4 - Dosagens das Proteínas

O doseamento das proteínas consideradas puras realizou-se pelo método convencional Lowry et al.⁽⁶²⁾ usando soro albumina bovina, Sigma, para se construir a curva padrão.

Todos os pontos da curva padrão bem como das amostras a serem doseadas, foram feitos em triplicata. Os resultados mostraram que após a liofilização as proteínas ainda continham cerca de 10 a 15% de água.

III.5 - Análise de Aminoácidos

A Tabela I mostra os dados obtidos pela análise de aminoácidos num analisador Beckman 120 C. Os resultados evidenciam que são desprezíveis as diferenças encontradas com a variação do tempo de hidrólise de 10 h, 20 h e 24 horas.

A soma dos valores médios para cada aminoácido, serviu para o cálculo do peso molecular das proteínas.

Para cada partida nova das proteínas purificadas, realizou-se uma série de análises de aminoácidos obtendo concordância com os dados mostrados na Tabela I.

Os pesos moleculares calculados com base na análise de aminoácidos foram os seguintes: 8300 para Crotapotin, 13400 para Fosfolipase A e 4880 para a Crotamina.

III.6 - Absorção das Proteínas no UV

As curvas de absorção no UV da Fosfolipase A, Crotapotin e Crotamina estão mostradas na Figura 7.

A Crotamina e a Fosfolipase A apresentam um máximo de absorção em 280 nm, enquanto que a Crotapotin tem um máximo em 278 nm. Estes máximos foram utilizados para o cálculo dos coeficientes de absorção molar das três proteínas, ou seja, $9047 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ para Crotapotin, $22512 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ para Fosfolipase A e $11650 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ para Crotamina.

III.7 - Medida da Atividade Enzimática da Fosfolipase A

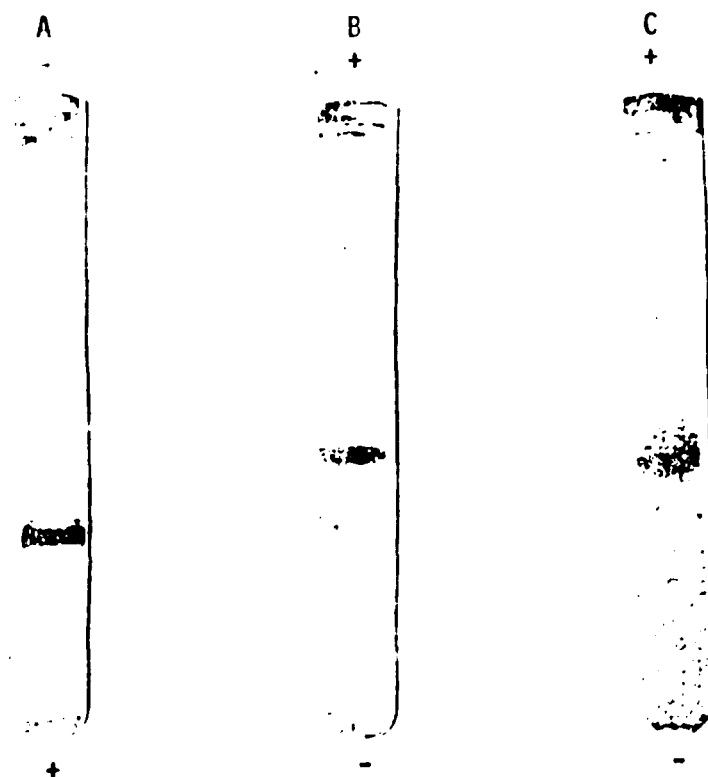


Figura 6 - Eletroforese em Gel de Poliacrilamida

- A** - Eletroforese de 50 μ l de Crotopotín (2 mg/ml) em Tampão TRIS-glicina pH 9,5. Corrida de 1,0 hora com 3 m A/tubo, Utilizando o Mesmo Tampão nas Cubas e Gel de Poliacrilamida a 7%.
- B** - Eletroforese de 50 μ l de Fosfolipase A (2 mg/ml) em Tampão Beta-alamina pH 3,4. Corrida de 1,0 hora com 3 m A/tubo, Utilizando o Mesmo Tampão nas Cubas e Gel de Poliacrilamida a 15%.
- C** - Eletroforese de 50 μ l de Crotamina (2 mg/ml) em Tampão Beta-alamina pH 4,3. Corrida de 1,0 hora com 3 m A/tubo, Utilizando o Mesmo Tampão nas Cubas e Gel de Poliacrilamida a 15%.
- Após as Corridas as Amostras Foram Fixadas com TCA a 12% por 30 minutos, Coradas com Comassie Brilliant Blue R 250 e Descoradas com uma Mistura de Metanol: Ácido Acético: H₂O

Tabela I

Análise de Aminoácidos de Fosfolipase A, Croctapotin e Croctamina*

a.a.	Fosfolipase A				Croctapotin				Croctamina			
	10 h	20 h	24 h	M	10 h	20 h	24 h	M	10 h	20 h	24 h	M
Lys	9,3	9,0	9,5	9,3	1,8	1,7	1,7	1,7	8,8	9,0	9,1	8,9
His	1,8	—	1,7	1,7	0,8	0,7	1,0	0,8	2,0	2,0	2,2	2,0
Arg	9,3	8,8	9,5	9,2	1,7	1,4	1,7	1,6	1,7	2,0	1,9	1,8
Asp	9,0	9,0	9,0	9,0	10,0	10,0	10,0	10,0	1,9	2,1	1,9	1,9
Thr	6,5	6,3	6,4	6,4	3,5	3,6	3,6	3,6	—	—	—	—
Ser	5,5	6,0	6,2	5,9	4,3	4,3	4,3	4,3	2,5	2,7	2,6	2,6
Glu	9,0	9,3	9,2	9,2	12,6	12,4	12,6	12,5	1,8	2,0	1,8	1,8
Pro	4,3	4,8	4,6	4,6	4,0	4,3	4,3	4,2	3,1	3,1	3,2	3,1
Gly	11,0	10,8	10,8	10,9	8,8	8,3	8,8	8,6	4,9	5,0	5,0	4,9
Ala	5,8	5,8	5,7	5,8	5,3	5,0	5,0	5,1	—	—	—	—
Cys	11,8	13,0	12,2	12,3	11,6	12,0	11,9	11,8	5,4	5,6	5,5	5,5
Val	2,0	1,8	1,9	1,9	0,6	0,5	0,5	0,5	—	—	—	—
Met	2,3	2,0	1,9	2,1	0,7	0,7	0,7	0,7	0,8	1,0	0,8	0,8
Ile	4,0	4,0	3,6	3,9	2,1	1,7	1,7	1,8	1,2	0,9	1,1	1,0
Leu	5,8	6,0	5,5	5,8	0,8	1,0	1,0	0,9	0,7	0,9	0,9	0,8
Tyr	9,5	10,0	9,4	9,6	1,7	2,4	2,4	2,2	0,8	0,9	0,7	0,8
Phe	6,5	5,8	5,4	5,9	2,5	2,1	2,1	2,2	1,7	2,0	1,9	1,8
Trp**	—	—	—	2,0	—	—	—	1,0	—	—	—	2,0

* A tabela mostra os valores obtidos nas análises de aminoácidos pela hidrólise das proteínas a 120°C, durante 10 h, 20 h e 24 horas num analisador de aminoácidos Beckman, modelo 120 C. Mostra também os valores médios (M) para cada aminoácido após as análises

** Dados obtidos espectrofotometricamente.

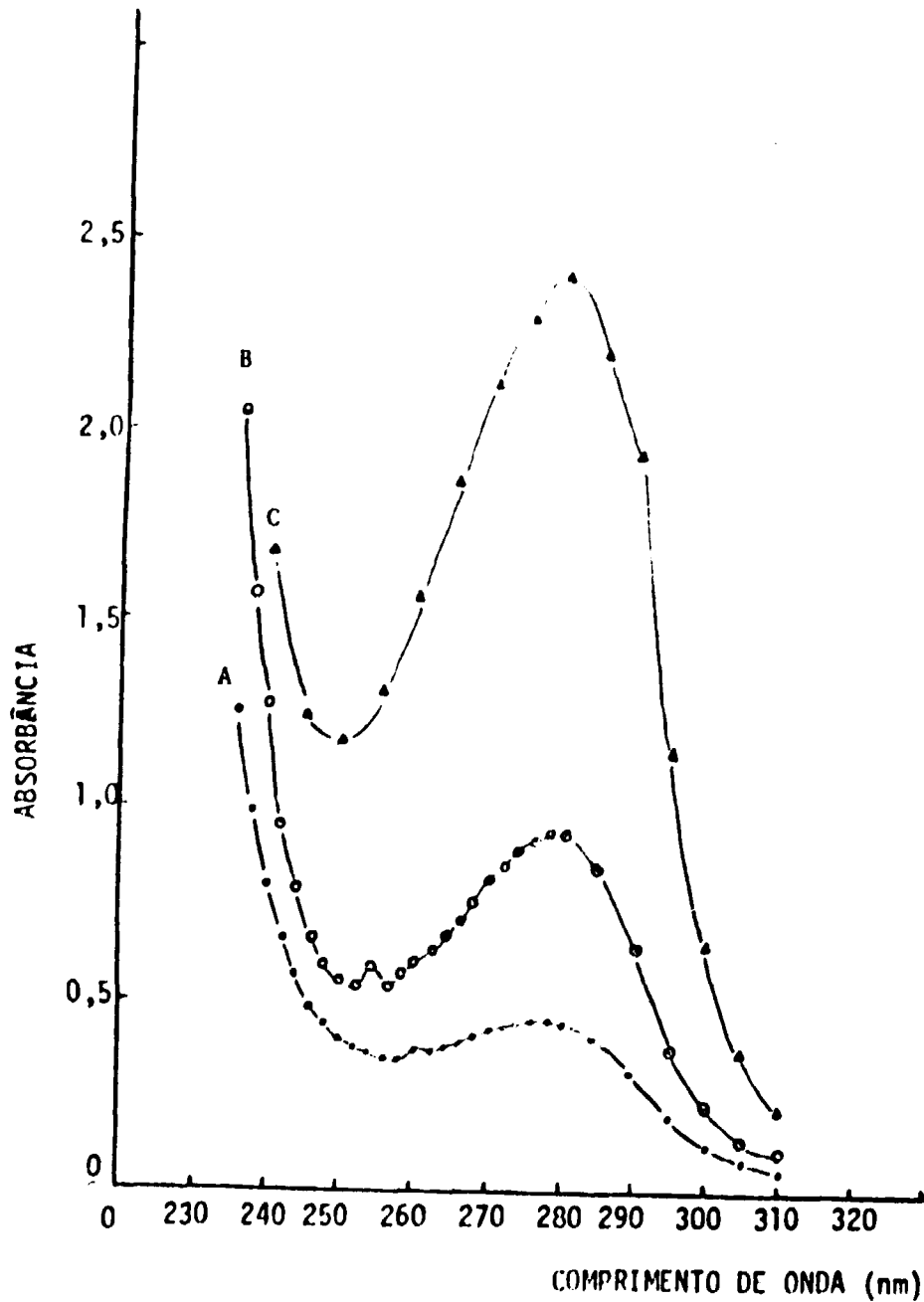


Figura 7 - Curvas de Absorbâncias de Crodamina (C), Fosfolipase A (B) e Crotopotín (A). Espectros de Absorção de Crotopotín (0,5 mg/ml de Tampão Tris 0,05 M, pH 8,06), Fosfolipase A (0,5 mg/ml de Tampão Tris 0,05 M, pH 8,06) e Crodamina (1 mg/ml de Tampão Fosfato 0,01 M, pH 7,3)

A Figura 8 mostra a curva padrão de atividade enzimática da Fosfolipase A pura, tendo como substrato uma suspensão de gema de ovo fresca. Em todas as experiências, tanto de purificação quanto de interação, em que se suspeitou da presença de Fosfolipase A, mediu-se a atividade enzimática pela mesma técnica, usando a curva padrão para comparação.

III.8 – Determinação de Grupos SH Livres

Foram realizados para Fosfolipase A, Crotamina e Crotapotin puras, os testes de presença de SH livres, utilizando o método colorimétrico de Ellman modificado por Simizu⁽⁷⁹⁾, que usa ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzóico, Sigma, como reagente e a cisteína como padrão.

Os resultados mostraram que mesmo em presença de uréia não aparecem SH livres, devendo estar todos comprometidos nas pontes S-S das cadeias polipeptídicas.

III.9 – Interação entre a Fosfolipase A e Crotapotin

O estudo da interação entre as proteínas foi realizado pela filtração em gel Sephadex G 75, mantendo-se sempre as mesmas condições de fluxo, temperatura, altura do gel, volume de amostras, volume recolhido por tubo, etc. variando apenas as concentrações das proteínas colocadas na coluna. Foram realizadas uma série muito grande de experiências, onde se procurou através o doseamento das proteínas e a medida das áreas dos picos, evidenciar a proporção molar de interação.

Na Figura 9 tem-se os padrões de filtração na coluna de Sephadex G 75. O gráfico A representa a filtração de uma amostra de Crotoxina cristalizada e eletroforeticamente pura. O gráfico B representa a cromatografia de uma amostra contendo excesso de Fosfolipase A e, no gráfico C uma amostra contendo excesso de Crotapotin.

Na Tabela II tem-se dados obtidos para um grupo de experiências de interações entre Fosfolipase A e Crotapotin, usando a técnica de filtração em gel Sephadex G 75. Os dados de concentração da amostra, concentração do complexo formado e do excesso de proteína, foram calculados pelo método Lowry e confirmados pela medida da área dos respectivos picos.

III.10 – Interação entre Crotapotin e Crotamina

A Figura 10 mostra uma das experiências de interação Crotapotin-Crotamina realizada com a técnica de filtração em gel Sephadex G 75.

A Tabela III mostra os dados obtidos para concentração de amostra, concentração de proteínas dos picos, medidas pelo doseamento de Lowry e confirmadas pela medida das áreas dos picos.

A Tabela III mostra também os valores da proporção molar de interação entre Crotapotin-Crotamina nas experiências realizadas, evidenciando uma inconstância para os valores obtidos de proporção molar de interação.

III.11 – Interação entre Fosfolipase A e Crotamina com Crotapotin Contendo Crotapotin ¹²⁵I como Traçador

Para demonstrar a participação de Crotapotin nos complexos Crotapotin-Fosfolipase A e Crotapotin-Crotamina, realizamos experiências de interação em gel Sephadex G 75, utilizando na composição das amostras colocadas na coluna, Crotapotin marcada com ¹²⁵I. Nestes casos a proteína marcada foi misturada antes da interação com a proteína fria.

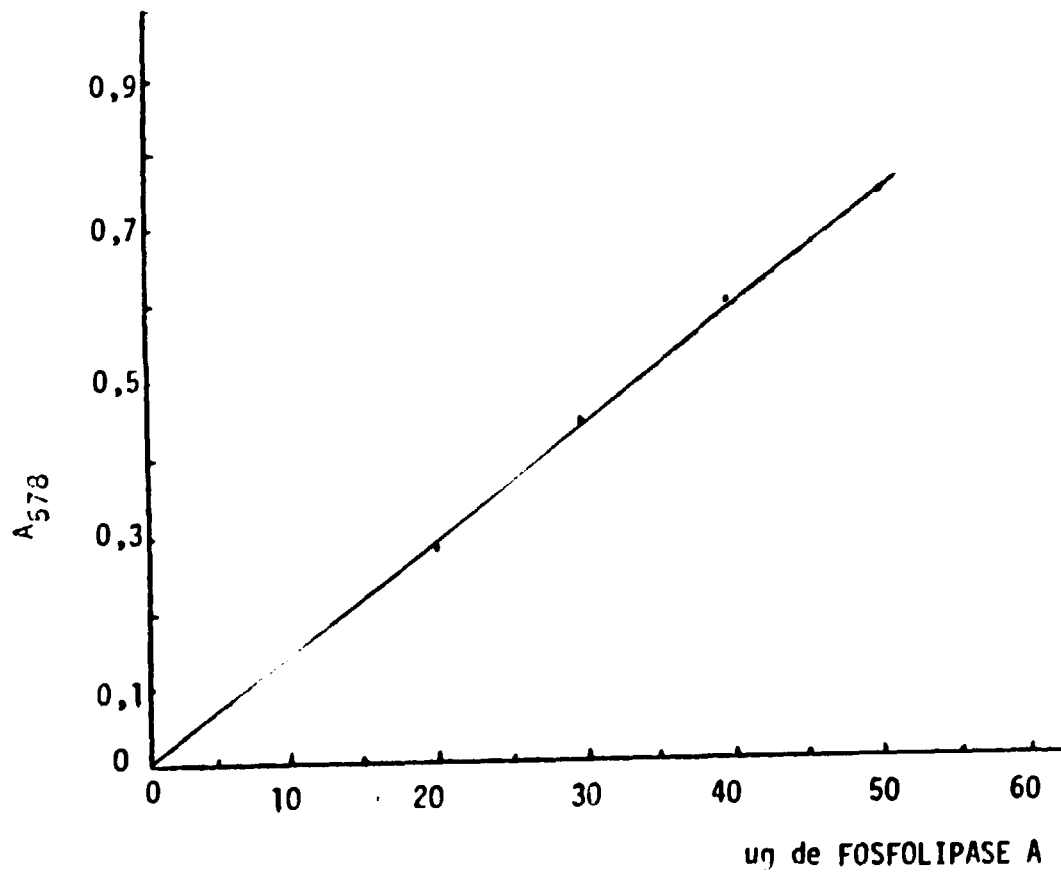


Figura 8 - Curva de Atividade Hemolítica de Fosfolipase A. Incubação Inicial da Fosfolipase A em Solução Fisiológica com Gema de Ovo Fresca por 2 horas a 37°C. A esta Mistura junta-se uma Suspensão a 0,6% de Glóbulos Vermelhos de Rato em Solução Fisiológica e Incubase-se por 40 minutos a 38°C. Após Centrifugação, as Amostras são Lidas Quanto à Absorbância em 578 nm

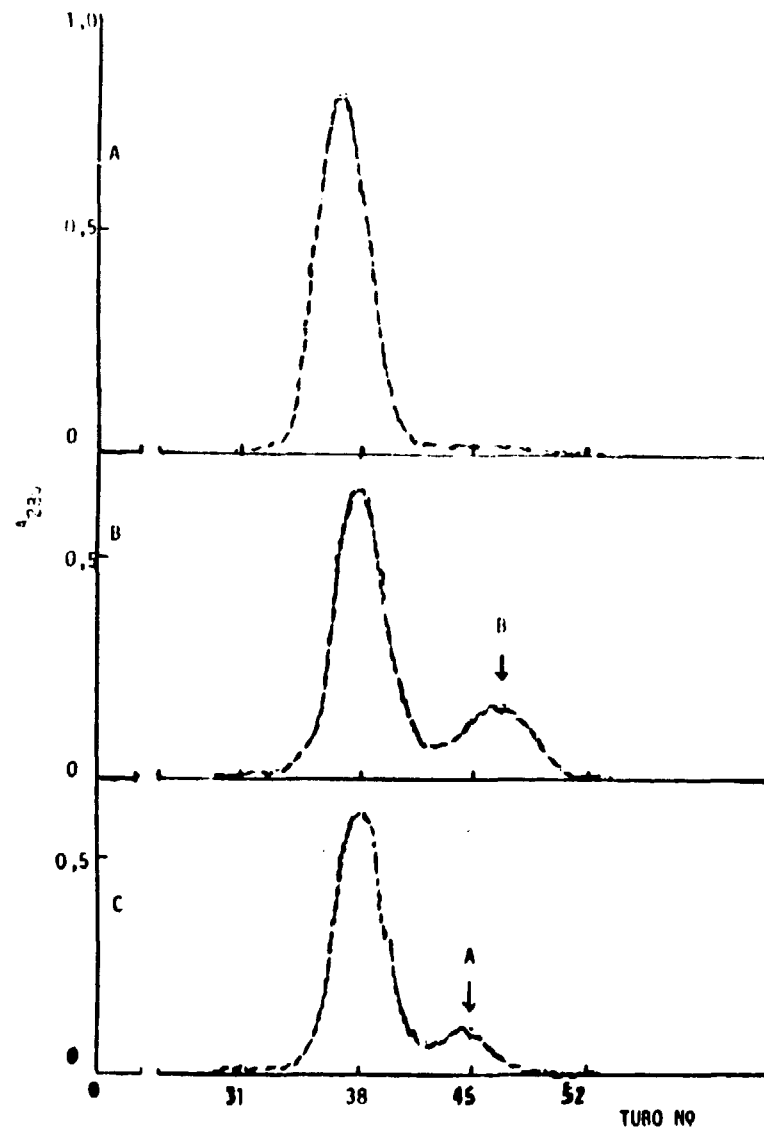


Figura 9 – Interação entre Crotopotín e Fosfolipase A. Perfis Cromatográficos Obtidos pela Filtração em Gel Sephadex G 75 Fino, Coluna de 0,9 cm: 80 cm, Equilibrado e Eluído com Tampão Formiato 0,05 M, pH 3,5.

A – Cromatografia de 2 mg de Crotoxina/ml de Tampão Formiato 0,05 M pH 3,5.

B – Cromatografia de 3,25 mg de Fosfolipase A/0,5 ml de Tampão Formiato 0,05 M, pH 3,5 + 1,6 mg de Crotopotín/0,5 ml do Mesmo Tampão.

C – Cromatografia de 1,6 mg de Crotopotín/0,5 ml de Tampão Formiato + 1,3 mg de Fosfolipase A/0,5 ml do Mesmo Tampão.

Para as Experiências A, B e C Foram Mantidos Fluxo de 0,2 ml/min. e 4 ml/tubo de Volume Eficiente.

Tabela II

Interação Crotopotín-Fosfolipase A na Filtração em Sephadex G 75*

Exper. nº	Prot. total (mg)	Proporções na amostra A: B (μ moles)	Complexo (mg)	Proporções de interação B: A (μ moles)
1	2,9	2: 1	2,1	1: 1
2	3,4	1: 2	2,1	1: 1
3	4,8	1: 1,2	3,46	1: 1,03
4	2,5	1,1: 1	2,34	1: 1,04
5	2,5	1,1: 1	2,24	1: 0,81
6	2,5	1,1: 1	2,05	1: 1,05
7	2,5	1,1: 1	2,32	1: 0,89
8	2,5	1,1: 1	2,13	1: 1,6

* A tabela mostra os valores de proteína total na amostra, proporções molares de Crotopotín (A) para Fosfolipase A (B) colocadas na coluna de gel Sephadex G 75 mg do complexo formado e proporções de interação após a filtração.

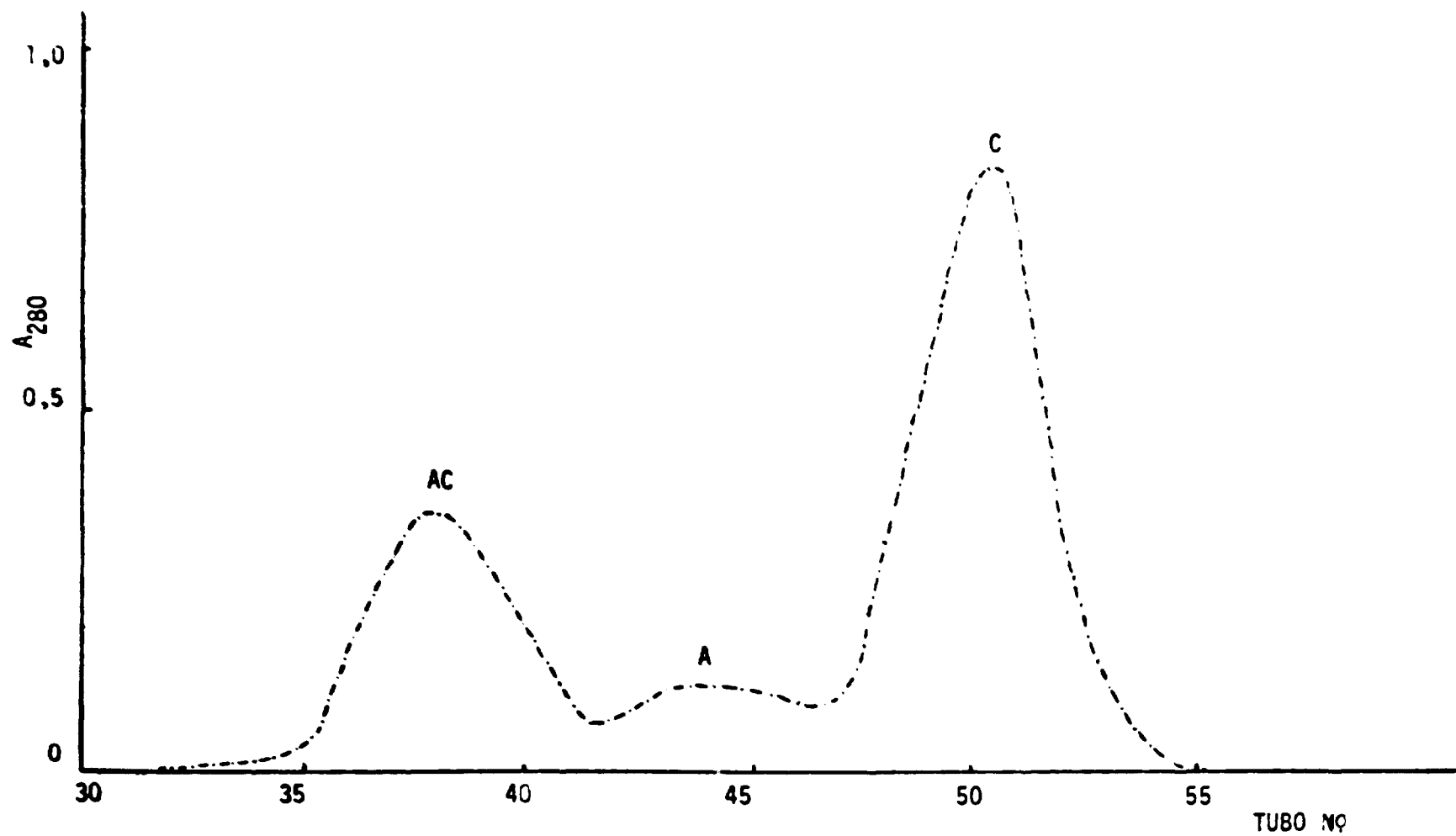


Figura 10 — Interação entre Crotapotin e Crotamina. Perfil Cromatográfico Obtido pela Filtração em Coluna de 0,9 cm; 80 cm de Gel Sephadex G 75 Fino, de Amostra Contendo 3 mg de Crotamina/0,5 ml de Tampão Formiato 0,05 M pH 3,5 + 0,8 mg de Crotapotin/0,5 ml do Mesmo Tampão, Equilibrado e Eluído com Tampão Formiato 0,05 M, pH 3,5. AC é o Complexo Formado. Fluxo de 0,2 ml/min., com Recolhimento de 4 ml/tubo.

Tabela III

Interação Crotopotin–Crotamina na Filtração em Gel Sephadex G 75*

Exper. nº	Prot. total (mg)	Proporções na amostra C: A (μ moles)	Complexo (mg)	Proporções de interação C: A (μ moles)
1	6,68	4:1	1,5	1:1
2	3,80	6:1	1,12	1:4
3	3,06	0,6:1	0,50	1:1,1
4	2,81	4:1	0,48	1:1,1
5	3,62	6:1	0,98	1:2,1

* A tabela mostra os valores de proteína total na amostra, proporções molares de Crotamina (C) para Crotopotin (A) colocadas na coluna de gel Sephadex G 75 mg do complexo formado e proporções de interação após a filtração.

A Figura 11 mostra os perfis cromatográfico e radioativo obtidos nas interações realizadas. O gráfico A representa o resultado da interação Crotopotin-Fosfolipase A e no B a interação Crotopotin-Crotamina.

Figura evidencia claramente a participação da Crotopotin nos dois complexos.

III.12 – Determinação da DL₅₀

A determinação da DL₅₀ foi feita para Crotamina, Crotopotin, Fosfolipase A e para os complexos Crotopotin-Fosfolipase A, Crotopotin-Crotamina na proporção molar de 1:1.

A Tabela IV apresenta as porcentagens de mortalidades para as várias diluições de cada proteína ou dos complexos, assim como os valores da DL₅₀ obtidos.

Tabela IV

Toxicidade de Crotamina, Fosfolipase A e dos Complexos AB e AC*

Diluições	% Mortalidade		% Mortalidade	
	Fosfolipase A	Crotamina	AB	AC
1:1	100	100	100	100
1:2	83,3	83,3	83,3	100
1:4	66,6	50,0	83,3	83,3
1:8	50,0	33,3	66,6	16,6
1:16	16,6	0	33,3	0
1:32	0	0	0	0
DL ₅₀	0,55 mg/Kg	0,8 mg/Kg	0,05 mg/Kg	0,20 mg/Kg

* A tabela mostra as porcentagens de mortalidade para cada diluição obtidas pela injeção i.p. em camundongos, de Fosfolipase A, Crotamina e dos Complexos Crotopotin-Fosfolipase A (AB), Crotopotin-Crotamina (AC). Mostra também as DL₅₀ calculadas pelo método de Reed e Muench, das proteínas isoladas e dos complexos AB, AC.

III.13 – Medida da Velocidade de Troca Hidrogênio-Trítio

O método utilizado foi descrito por Englander⁽²⁰⁾, em 1963. Para os tempos pequenos como 1 minuto, 2 minutos e 3 minutos utilizou-se a técnica com uma coluna sb, ou seja a amostra após colocada na coluna de G 25 era eluída até aproximadamente 2/3 da altura total para eliminar o excesso de ³H₂O e, em seguida o fluxo da coluna era interrompido durante o tempo de 1 min., 2 min. e 3 min., para logo após, iniciar-se novamente a eluição.

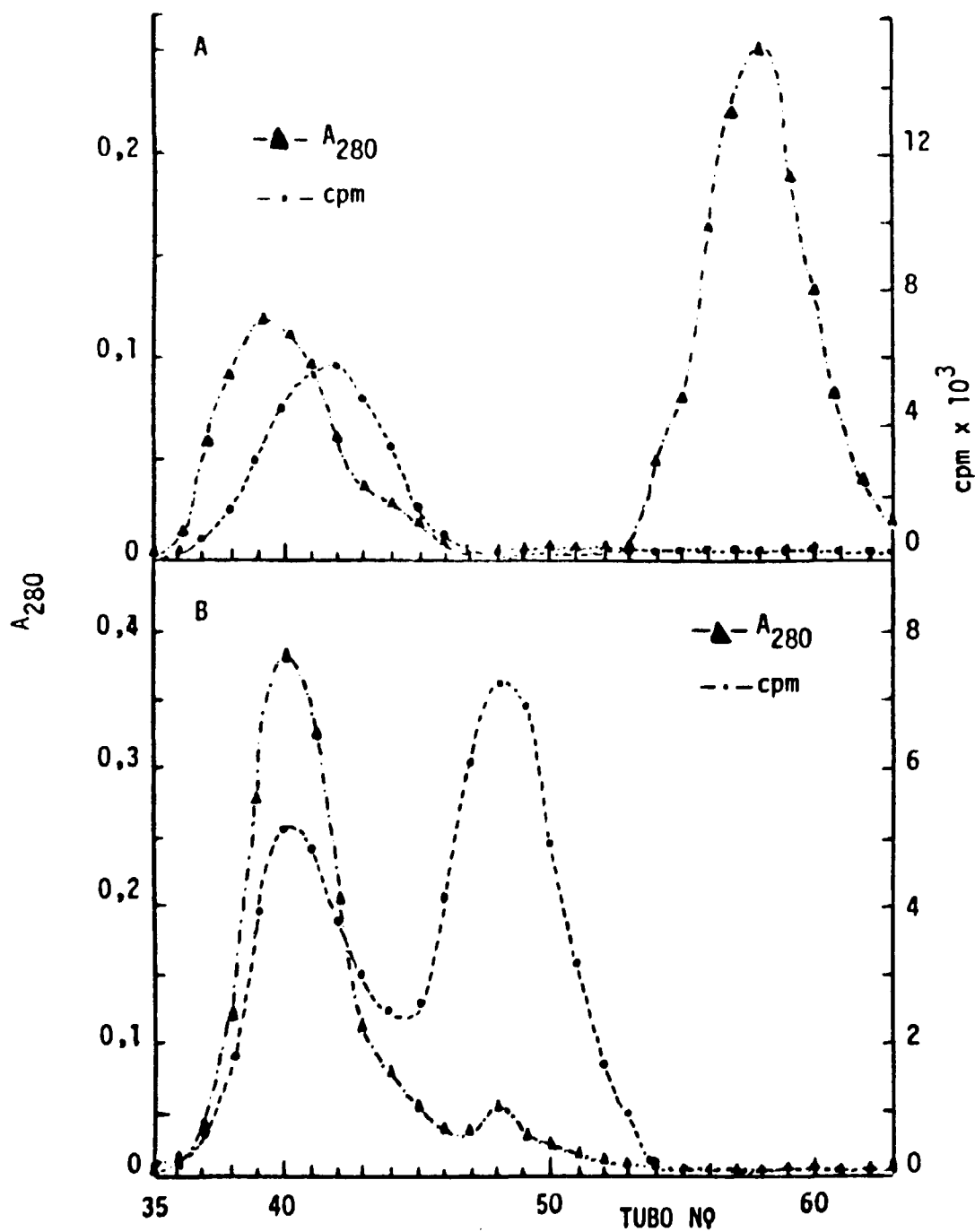


Figura 11 – Interação Crotaipotin–Fosfolipase A, Crotaipotin–Crotamina Contendo Crotaipotin- ^{125}I , em Gel Sephadex G 75. Coluna de 80 cm: 0,9 cm de Gel Sephadex G 75 Fino, Equilibrado e Eluído com Tampão Formiato 0,05 M, pH 3,5. Fluxo de 0,2 ml/min Recolhendo-se 4 ml/tubo.

A – Amostra Contendo 3 mg de Crotamina/0,5 ml do Mesmo Tampão + 0,8 mg de Crotaipotin + 20 μ l de Crotaipotin- ^{125}I /ml do mesmo Tampão.

B – Amostra Contendo 1,5 mg de Fosfolipase A/0,5 ml de Tampão + 1,0 mg de Crotaipotin + 80 μ l de Crotaipotin- ^{125}I /0,5 ml do mesmo Tampão Usado na Cromatografia

A Figura 12 mostra a separação que ocorre quando se utiliza a técnica descrita acima. Para os tempos mais longos de incubação, utilizou-se a técnica de duas colunas, que sem dúvida é muito mais eficiente na separação.

III.13.1 – Troca de Hidrogênio-Trício na Fosfolipase A

A Figura 13 mostra a curva obtida através de um ajuste dos dados de nº H_g/mol de proteína, contra tempo de saída do trício da proteína para o solvente. Os dados sobre os quais foi feito o melhor ajuste são encontrados na Tabela V.

O tratamento dos dados pela computação, assim como os valores obtidos, encontram-se no Apêndice 2.

A equação que representa a soma de duas exponenciais e que melhor se ajusta nos dados experimentais da troca H/T da Fosfolipase A foi a seguinte:

$$H_{(t)} = 71 \times e^{-0,9 \times 10^{-4} t} + 59 \times e^{-0,055 t}$$

onde 0,055 e $0,9 \times 10^{-4}$ representam as constantes de velocidade de trocas e, 59 e 71 os números de hidrogênios de cada classe.

Os dados de radioatividade inicial, radioatividade carregada pela proteína e absorbâncias a 280 nm das amostras, que originaram os valores médios C/A e conseqüentemente o nº H_g/mol de proteína, para cada tempo considerado, podem ser vistos no Apêndice 1.

III.13.2 – Troca de Hidrogênio-Trício na Crotapotin

Os dados experimentais obtidos para o nº H /mol de Crotapotin com os respectivos tempos de incubação, são mostrados na Tabela V.

O melhor ajuste obtido pela computação dos dados experimentais foi pela soma de duas exponenciais, o que é mostrado na Figura 14.

O modo como foi feito o ajuste é o mesmo do item anterior e os seus parâmetros podem ser encontrados no Apêndice 2.

A equação da soma de duas exponenciais que originou a Figura 14 foi:

$$H_{(t)} = 22 \times e^{-0,11 \times 10^{-2} t} + 84 \times e^{-0,22 t}$$

Os valores $0,11 \times 10^{-2}$ e 0,22 são as constantes de velocidade das classes com 22 e 84 hidrogênios respectivamente.

Os valores de nº H_g/mol de Crotapotin, nos respectivos tempos de incubação, originaram dos resultados de radioatividade inicial, radioatividade carregada pela proteína e absorbâncias a 280 nm das amostras que podem ser encontrados no Apêndice 1.

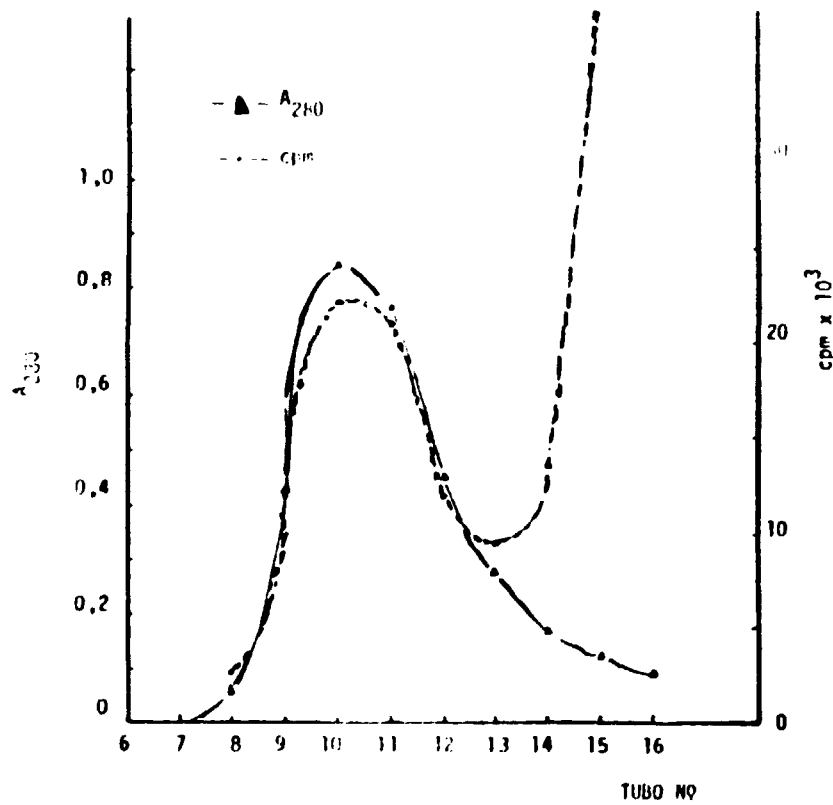


Figura 12 – Separação da Radioatividade Carregada Pela Proteína do Excesso de $^3\text{H}_2\text{O}$ na Filtração em Sephadex G 25 "Coarse". Amostra Contendo 3,42 mg de Fosfolipase A/ 0,8 ml de Tampão Formiato 0,1 M, pH 3,0 + $^3\text{H}_2\text{O}$ Dando uma Radioatividade Inicial de 10^8 cpm/ml, foi Incubada por 2 h a 70°C e Resfriada. Filtração em Coluna de 8 cm: 3 cm de Gel Sephadex G 25 "Coarse" Resfriada a 3°C com Fluxo de 1 ml/10 segundos, Recolhendo-se 1 ml/tubo. Após a Amostra ter Percorrido 2/3 da Coluna, o Fluxo foi Interrompido Durante 2 min para Logo em Seguida ser Restabelecido

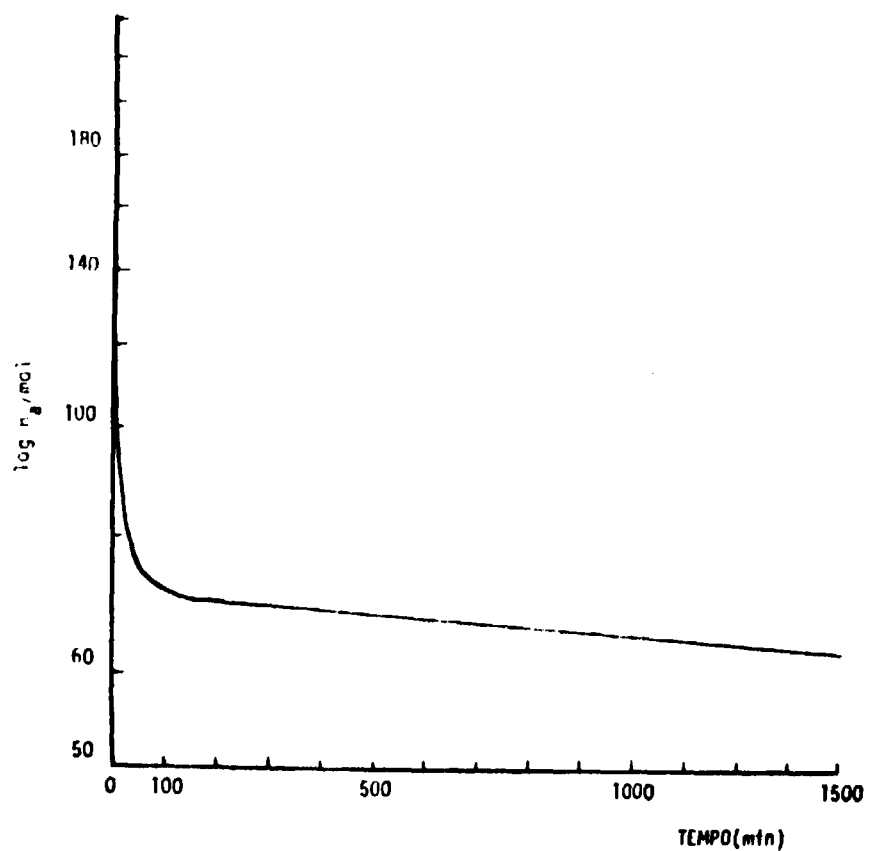


Figura 13 - Curva de Troca T/H da Fosfolipase A. Ajuste Obtido pela Computação dos Dados Experimentais de nº hidrogênios Aparentes (H_p) por mol de Fosfolipase A. A Curva Representa as Velocidades de Saída do Trício Incorporado à Proteína, para o Solvente (Exchange out) Obtidas pelo Método de Filtração em Colunas de Sephadex G 25 "Coarse", Mantidas a 3°C, Equilibradas e Eluídas com Tampão Formiato 0,1 M, pH 3,0

Tabela V

Troca Isotópica H/T da Fosfolipase A e Crotapotin*

Fosfolipase A 2 h a 70°C				Crotapotin 2 h a 60°C			
T _{min}	H _a	T _{min}	H _a	T _{min}	H _a	T _{min}	H _a
1	156	102	74	1	85	1320	5
2	128	140	69	2	83	1380	5
3	123	150	71	5	54	1440	4
4	113	240	70	10	30	—	—
5	104	300	70	30	27	—	—
6	106	360	69	60	23	—	—
15	100	420	64	90	22	—	—
20	98	1110	69	120	19	—	—
27	89	1200	68	170	18	—	—
30	78	1440	64	210	19	—	—
56	77	1470	62	240	15	—	—
72	73	1500	58	270	15	—	—
75	69	1800	60	300	16	—	—
90	70	—	—	410	15	—	—

* A tabela mostra o número de hidrogênios aparentes (H_a) por mol de Fosfolipase A e Crotapotin nos respectivos tempos de "exchange out".

A incubação inicial com ³H₂O foi de 2 h a 70°C para Fosfolipase A e 2 h a 60°C para Crotapotin.

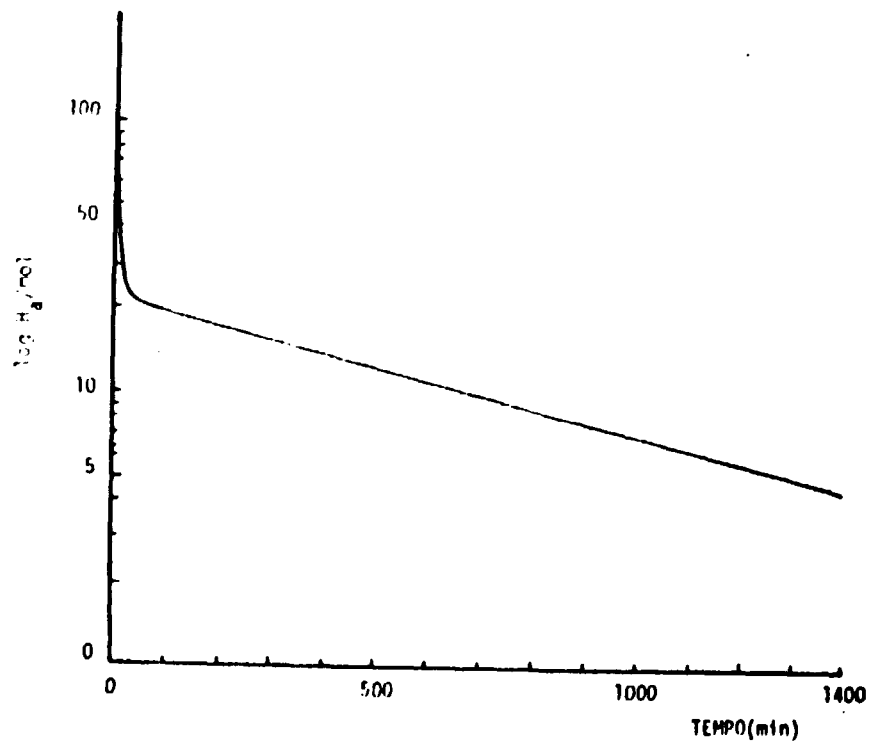


Figura 14 - Curva de Troca T/H da Crotopotin. Ajuste Obtido pela Computação dos Dados Experimentais de n° Hidrogênios Aparentes (H_a)/mol de Crotopotin. A Curva Representa as Velocidades de Saída do Trítio Incorporado à Proteína, para o Solvente (Exchange out), Obtidas pelo Método de Filtração em Colunas de Gel Sephadex G 25 "Coarse", Mantidas a 3°C, Equilibradas e Eluídas com Tampão Formiato 0,1 M, pH 3,0

III.13.3 – Troca de Hidrogênio-Trítio na Crotoxina

Na Tabela VI tem-se os dados experimentais obtidos para o nº H_g /mol de Crotoxina nos respectivos termos de incubação.

A Figura 15 mostra o ajuste feito pela computação dos dados experimentais da Tabela VI, cujos valores estão no Apêndice 2.

O melhor ajuste para a Crotoxina foi obtido pela soma de três exponenciais fornecendo a seguinte equação:

$$H_{(t)} = 96 \times e^{-0.13 \times 10^{-3} t} + 26 \times e^{-0.012 t} + 32 \times e^{-0.16 t}$$

Os valores de radioatividade inicial, radioatividade carregada pela proteína e absorbâncias que originaram os números da Tabela VI estão escritos no Apêndice 1.

A Figura 15 também mostra uma curva teórica obtida pela soma dos dados de troca H/T para Fosfolipase A + Crotapotin com intuito de comparar esta simples soma com os dados experimentais de troca H/T da Crotoxina que é o produto da recombinação entre Fosfolipase A e Crotapotin.

III.13.4 – Troca de Hidrogênio-Trítio da Crotamina

Os resultados da troca H/T da Crotamina estão escritos na Tabela VI. Foram realizadas para Crotamina experiências com variação no tempo de incubação inicial: uma com 2 horas de incubação da proteína com 3H_2O a $70^\circ C$ e outra com 18 horas de incubação também a $70^\circ C$.

Os dados experimentais foram ajustados no computador e o resultado destes ajustes estão na Figura 16.

Os valores de radioatividade inicial, radioatividade carregada pela proteína e absorbâncias que permitiram o cálculo do nº H_g /mol de Crotamina para cada tempo considerado, estão no Apêndice 1.

O Apêndice 2 contém os parâmetros encontrados pela computação dos dados.

Os melhores ajustes aos dados experimentais surgiram da soma de duas exponenciais para ambas as experiências. Para o caso da incubação inicial de duas horas a $70^\circ C$, a equação obtida foi:

$$H_{(t)} = 26 \times e^{-0.65 \times 10^{-3} t} + 38 \times e^{-0.26 t}$$

Para incubação de 18 horas a $70^\circ C$, a equação obtida foi:

$$H_{(t)} = 16 \times e^{-0.33 \times 10^{-3} t} + 8 \times e^{-0.016 t}$$

II.14 – Medida da Radioatividade

A Figura 17 mostra a curva de porcentagens de eficiências para os padrões de radioatividade

Tabela VI

Troca Isotópica H/T da Crotoxina e Crotamina*

Crotoxina 2 h a 70°C				Crotamina 2 h a 60°C			
T _{min}	H _a	T _{min}	H _a	T _{min}	H _a	T _{min}	H _a
1	143	150	94	1	58	5	24
2	154	240	94	5	47	20	24
3	147	280	98	7	29	40	21
5	132	300	91	10	39	55	19
12	112	310	93	15	29	60	21
15	137	360	93	48	28	150	16
30	119	420	92	55	26	165	15
35	111	480	87	88	30	180	17
55	102	930	87	97	25	210	15
60	107	960	85	120	23	220	13
70	103	1020	88	180	22	240	16
75	111	1260	85	345	18	260	15
90	104	1320	78	410	20	270	16
100	112	1430	81	480	20	290	16
120	104	1490	75	1410	12	1380	10
130	97	—	—	1490	9	1440	10
150	98	—	—	1550	10	—	—

* A tabela mostra o número de hidrogênios aparentes (H_a) por mol de Crotoxina e Crotamina nos respectivos tempos de "exchange out".

A incubação inicial com ³H₂O foi de 2 h a 70°C para a Crotoxina e 2 h e 18 h a 70°C para Crotamina.

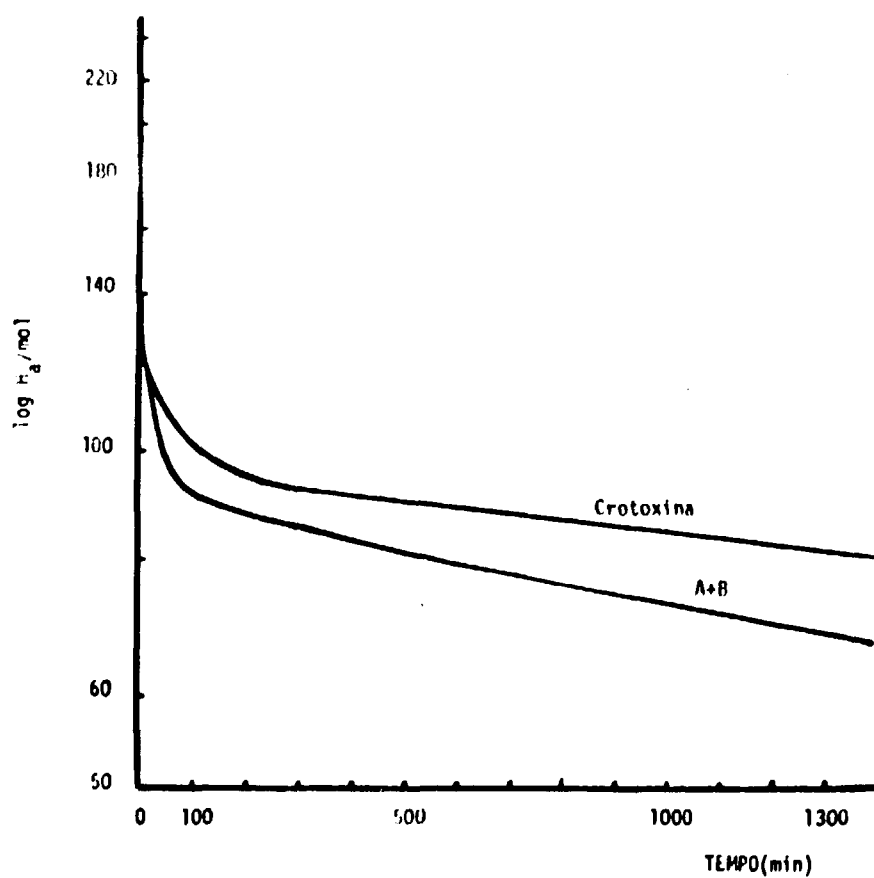


Figura 15 - Curva de Troca T/H da Crotoxina. Ajuste Obtido pela Computação dos Dados Experimentais de n° Hidrogênios Aparentes (H_a)/mol de Crotoxina. A Curva Representa as Velocidades de Saída do Trício Incorporado à Proteína, para o Solvente (Exchange out), Obtidas pelo Método de Filtração em Colunas de Gel Sephadex G 25 "Coarse", Mantidas a 3°C, Equilibradas e Eluídas com Tampão Formiato 0,1 M, pH 3,0. A Curva A+B Representa a Soma Teórica da Equação Obtida pelo Ajuste aos Dados Experimentais de n° H_a /mol de Crotopotin + a equação Obtida pelo Ajuste aos Dados de n° H_a /mol de Fosfolipase A

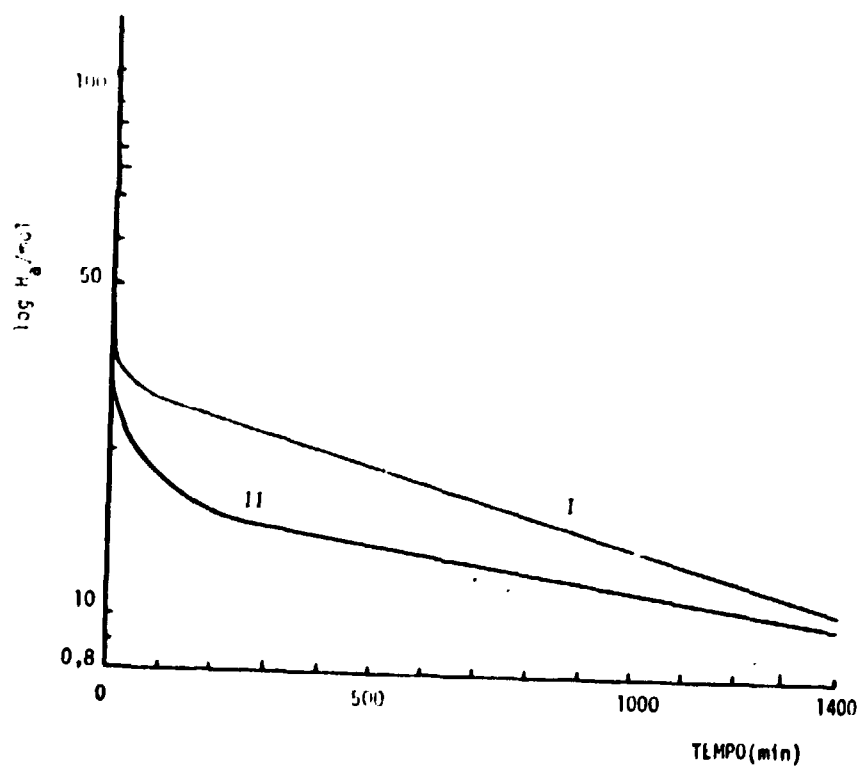


Figura 16 – Curva de Troca T/H da Crotamina. Ajustes Obtidos pela Computação dos Dados Experimentais de nº Hidrogénios Aparentes (H_g)/mol de Crotamina. As Curvas Representam as Velocidades de Saída do Trício Incorporado à Proteína, para o Solvente (Exchange out), Obtidas pelo Método de Filtração em Colunas de Gel Sephadex G 25 "Coarse", Mantidas a 3°C, Equilibradas e Eluídas com Tampão Formiato 0,1 M, pH 3,0. Na Curva I, Temos os Valores Obtidos Após a Incubação Inicial da Proteína com 3H_2O a 70°C por 2 horas. Na curva II, Após a Incubação Inicial com 3H_2O a 70°C por 18 horas

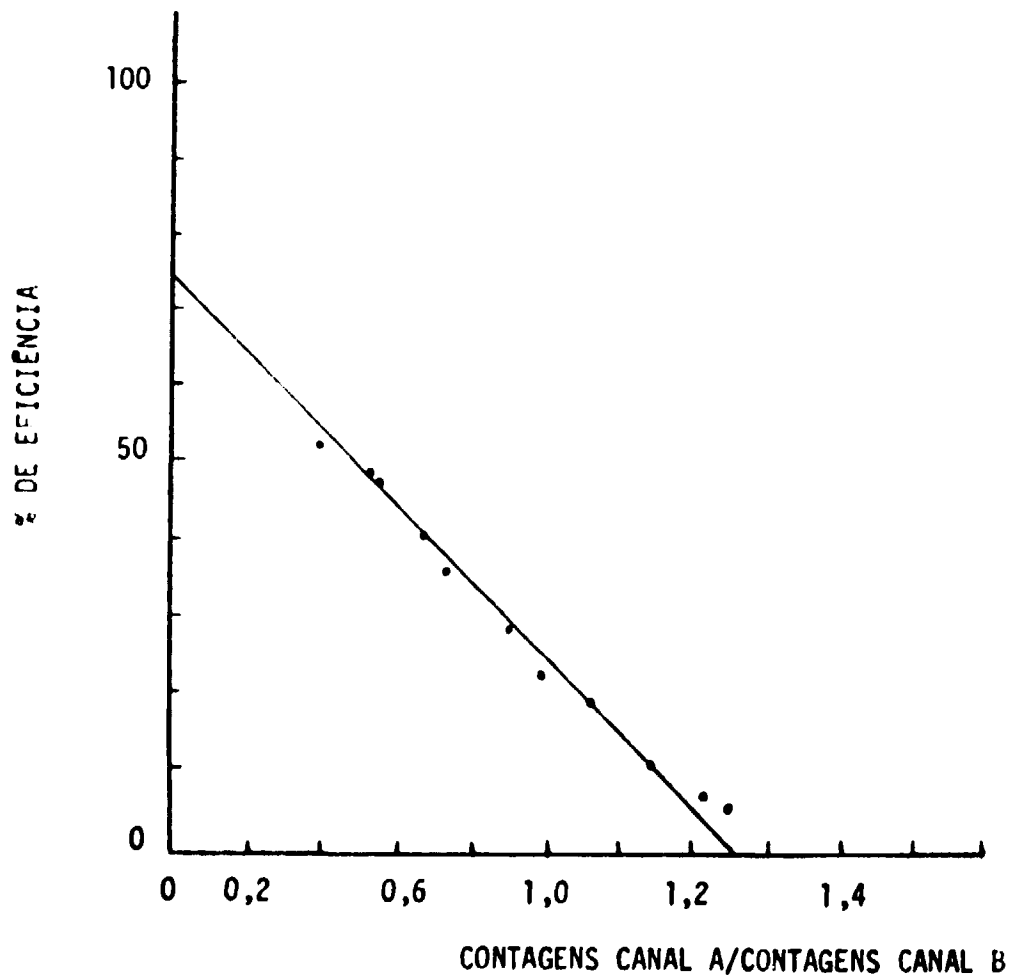


Figura 17 - Curva de % Eficiência Obtida no Contador de Cintilação ISOCAP/300. Curva Padrão de Eficiência Obtida no Contador de Cintilação ISOCAP/300 (Nuclear Chicago) com Radioatividade Conhecida de Amostras Padrões (Nuclear Chicago) Contendo "Quenching", Utilizando o Método da Relação de Canais para Corrigir a Eficiência das Amostras Triladas

conhecida, contra os valores da relação de canais A/B. Esta curva foi utilizada para o cálculo das eficiências de contagens das amostras que continham trítio.

IV – DISCUSSÃO

A análise dos resultados deste trabalho necessita em primeiro lugar que retiremos da literatura alguns dados sobre as proteínas por nós purificadas.

A Crotapotin é uma proteína muito ácida (A) de ponto isoeletrico por volta de 3,4-3,7^(3,48), desprovida de toxicidade, com peso molecular entre 8400-9400^(47,48).

A Fosfolipase A é uma proteína muito básica (B) de ponto isoeletrico entre 8,4-9,7^(3,48), com baixa toxicidade e peso molecular de 13000 de acordo com Hendon e Fraenkel-Conrat⁽⁴⁷⁾ e 16294 de acordo com Breithaupt et alii⁽⁵⁾.

A Crotamina é uma proteína muito básica (C) de ponto isoeletrico 10,3⁽³²⁾, altamente tóxica, com peso molecular 4880⁽⁵⁸⁾.

Os resultados da análise de aminoácidos da Fosfolipase A e Crotapotin descritos na Tabela I, apresentam pequenas diferenças dos obtidos por Hendon e Fraenkel-Conrat⁽⁴⁷⁾. Estas diferenças representam 4 a.a.* a mais na Fosfolipase A e 3 a.a. a mais na Crotapotin. O ponto principal discordante é o número de cisteínas, onde temos 12 para A e para B enquanto que o referido autor encontra 11. Os resultados obtidos no item III.8 mostram que não foi possível detectar grupos SH livres nas proteínas mesmo em presença de uréia, o que nos leva a crer que o número de cisteínas deva ser par e os SH estejam comprometidos em pontes de enxofre.

Na Tabela I temos também dados da composição de aminoácidos da Crotamina que concordam muito bem com os publicados por Laure⁽⁵⁸⁾. A Crotamina também não apresenta grupos tióis livres reforçando a hipótese da existência de 3 pontes de enxofre envolvendo as 6 cisteínas.

Gonçalves e Polson⁽³⁵⁾ em 1947, utilizando equipamento de Tiselius, analisaram o comportamento eletroforético das proteínas do veneno de *Crotalus d. terrificus*. Usando pH 8,6 a 7,7 puderam verificar o aparecimento de uma proteína muito básica mais tarde caracterizada como Crotamina; nesses valores de pH era evidente a existência de complexos entre proteínas com cargas positivas e negativas. Para minimizar a interação proteína-proteína foi preciso aumentar a força iônica ou realizar a eletroforese a pH 3,0 onde segundo os autores as proteínas possuíam a mesma carga e forneciam diagramas eletroforéticos com imagens especulares nos ramos ascendente e descendente da célula em U.

Com o isolamento e a caracterização da Fosfolipase A e Crotapotin em 1971 por Hendon e Fraenkel-Conrat⁽⁴⁷⁾ e Rubsamen et alii⁽⁷⁸⁾ ficou evidenciado que a Crotoxina resulta da interação eletrostática entre as duas proteínas e que ocorre um fenômeno sinérgico quanto à ação neurotóxica.

A possibilidade de ocorrerem interações entre proteínas de cargas opostas que resultem num aumento de toxicidade, foi levantada por Jeng e Fraenkel-Conrat⁽⁶⁵⁾, em 1976. Os autores estudando a toxina de um cogumelo (*Volvariella volvacea*), a volvatoxina, que como na Crotoxina, tem uma ação tóxica resultante da interação de duas proteínas não tóxicas só que de mesmos pontos isoeletricos: pI 5,0, denominadas A₁ e A₂, verificaram que a volvatoxina A₂ interage com a Fosfolipase A aumentando cerca de 6 vezes a toxicidade da lecitinase.

Como o complexo só se forma com a proteína A₂ da volvatoxina e como foi infrutífera a tentativa de se aumentar a toxicidade da Fosfolipase A, pela presença de outras proteínas ácidas, supõem os autores que o sinergismo não pode ser explicado simplesmente por interações poli iônicas.

* a.a. = aminoácido

O surgimento destes complexos híbridos, mais o constante aparecimento de um contaminante protéico carregado negativamente, durante as purificações de Crotamina por nós realizadas, que mais tarde identificamos como sendo a Crotapotin, levou-nos a estudar a possível formação de um complexo Crotamina Crotapotin.

Na Figura 9, mostramos que A e B interagem formando um complexo estável, não dissociável na filtração de gel, com um volume efluente igual ao obtido para a Crotaxina pura e não fracionada. As mudanças quantitativas de uma proteína em relação a outra, ou seja, excesso de B em relação a A ou vice-versa, não alteraram o volume efluente do complexo AB, como mostramos nas partes B e C da Figura 9.

A Tabela II mostra claramente que em qualquer que seja a proporção molar A : B colocada na coluna, forma-se um complexo AB estável na proporção molar de 1 : 1.

Pela mesma técnica pudemos comprovar como mostramos na Figura 10, Crotamina (C) e Crotapotin (A) interagem formando um complexo que é entretanto dissociável pela filtração em gel, pois com qualquer proporção molar A : C colocada na coluna, temos sempre como resultado o aparecimento de 3 picos AC, A e C na ordem crescente de volumes efluentes. Desta maneira pela técnica de filtração em Sephadex G 75 foi difícil chegarmos à exata proporção molar de interação como constatamos nos dados da Tabela III. Os dados de medida de concentração de proteína e área dos picos forneceram proporções molares variadas, sugerindo que ocorre uma dissociação espontânea do complexo AC, durante a passagem pelo gel.

Este fato não causa surpresa, uma vez que, outros autores como por exemplo Hartley e Smeaton⁽⁴⁶⁾ na interação entre Barnase e seu inibidor Barstar e Cuatrecasas e Hollemberg⁽¹¹⁾ numa revisão sobre interação proteínas-membranas constataram a impossibilidade de em alguns casos definir as proporções molares de interação pela filtração em gel Sephadex, devido a dissociação dos complexos formados.

Entretanto, Nakazone et alii^(65,66,67,75) em nosso laboratório demonstraram de maneira elegante, utilizando técnicas imunológicas, que o complexo AC se forma realmente na proporção molar de 1:1.

O aumento da toxicidade da Crotamina e da Fosfolipase A, pela interação com Crotapotin pode ser verificada na Tabela IV, onde temos as DL₅₀ obtidas para B e C isoladas e para os complexos AB e AC. Nota-se que a ação tóxica da Fosfolipase A é aumentada cerca de 10 vezes pela interação com Crotapotin e a toxicidade da Crotamina é aumentada cerca de 4 vezes, quando está complexada com Crotapotin.

Mais uma evidência da participação de A na formação dos complexos AC e AB pode ser visualizada na Figura 11 que resulta de experiências nas quais usamos Crotapotin marcada com ¹²⁵I, como traçador.

Como já dissemos o fenômeno de sinergismo que ocorre pela interação entre as proteínas, não é somente produzido pela aproximação eletrostática, alguns fatores estruturais devem estar envolvidos para que a formação dos complexos seja possível.

Do ponto de vista conformacional o que se conhece sobre Crotamina, Crotapotin e Fosfolipase A, é realmente muito pouco.

Breithaupt et alii⁽⁶⁾ em 1974, após a redução e alquilação da Crotapotin, separaram por filtração em gel 3 cadeias peptídicas, sugerindo que a proteína na sua estrutura original contém as 3 cadeias unidas por pontes de enxofre. Sugerem os autores ainda que a Fosfolipase A é uma cadeia polipeptídica intramolecularmente ligada por pontes de enxofre.

Em 1975, Paradies e Breithaupt⁽⁷⁰⁾ através das medidas de sedimentação, viscosidade e difusão, sugerem que a Crotoxina seria uma esfera com raio de Stokes 22,5 Å e uma relação axial 1: 3, enquanto que a Fosfolipase A seria assimétrica, com uma relação axial muito alta e a Crotapotin assumiria uma formação de um elipsóide oblato de revolução.

Em 1976, Hampe e Gonçalves⁽⁴⁴⁾ trabalhando sobre a dispersão óptica rotatória da Crotamina encontraram um espectro totalmente atípico. Os mesmos autores em 1978 analisando a dispersão óptica rotatória em vários valores de pH, definem a presença de 3 conformêros diferentes, com pH de transição 2,6 do conformêro I para o II e 9,7 do conformêro II para o III⁽⁴⁵⁾.

A análise dos conformêros pelos autores sugerem que a Crotamina seria uma esfera com grau de compactação decrescente com o aumento do pH.

O estudo do comportamento estrutural de proteínas em solução, pela medida da velocidade de troca hidrogênio/trício, tem merecido um certo destaque nos últimos anos. Assim podemos citar importantes trabalhos com mioglobina e hemoglobina^(23,25,26), conformação do vírus de Mosaico do Tabaco⁽⁸⁾, ácidos nucleicos⁽²²⁾, anidrase carbônica⁽⁷⁷⁾ e outras, que utilizam a tecnologia da filtração em Sephadex G 25 e a interpretação matemática originalmente aplicada por Linderstrom-Lang⁽⁶¹⁾, em 1955. Esta análise considera que a velocidade de troca hidrogênio-trício (ou deutério) é representada, para a lisozima, como uma soma de 4 exponenciais do tipo de decaimento radioativo.

O número de exponenciais encontrado representa o número de classes de hidrogênios caracterizadas pelos parâmetros destas exponenciais.

O mesmo tipo de análise tem sido utilizada por outros autores como por exemplo: Englander⁽²⁰⁾, em 1963, estudando a ribonuclease encontra o melhor ajuste na soma de 4 exponenciais para a curva de velocidade troca H/T definindo 4 classes de hidrogênios, ou seja, uma classe I que seria rapidamente expostos ao solvente com $t_{1/2}$ da ordem de segundos; uma classe II que seria hidrogênios peptídicos em "random-chain" com $t_{1/2}$ entre 4-10 minutos; uma classe III seria composta por hidrogênios peptídicos envolvidos em alfa-hélice com $t_{1/2}$ por volta de 160 min. e a classe IV hidrogênios peptídicos ou de cadeias laterais, escondidos na estrutura protéica.

Duas críticas principais surgiram nos trabalhos mais recentes, a primeira se refere à relação direta da porcentagem de alfa-hélice ao número de hidrogênios da classe III, uma vez que, as medidas realizadas por diversas técnicas não forneciam os mesmos resultados⁽⁵⁴⁾. Hoje já se procura associar a velocidade de troca H/T de uma proteína à localização dos seus hidrogênios, se estão mais ou menos expostos ao solvente.

A segunda crítica está muito bem fundamentada no trabalho de Laiken e Printz⁽⁵⁷⁾. Os autores se referem à obtenção do melhor ajuste dos pontos experimentais pela computação dos dados, constatando que é possível, a partir dos mesmos dados, obter-se ajustes razoáveis contendo duas ou três exponenciais. Fica evidente que, a escolha entre a existência de duas ou de três exponenciais, leva a erros na interpretação dos resultados.

Entretanto consideramos que as críticas não invalidam os bons resultados obtidos por trabalhos mais recentes, principalmente aqueles que procuram analisar as curvas exponenciais do ponto de vista comparativo.

Outro fato que devemos considerar é a existência dos efeitos isotópico químico e cinético nas experiências de troca isotópica H/T e H/D. A existência do efeito isotópico cinético já havia sido demonstrada por Englander⁽²⁰⁾ em 1963 na ribonuclease, ou seja, a proteína deuturada perdia deutério para o solvente mais lentamente do que a triciada.

Em 1969, Englander e Poulsen⁽²⁴⁾ trabalhando com poliaminoácidos confirmaram a existência de um efeito isotópico de equilíbrio para os hidrogênios das ligações peptídicas ou seja, o equilíbrio

entre T/H no polímero é 21% maior do que T/H no solvente. A partir deste feito os autores passaram a incluir na equação utilizada para o cálculo do número de hidrogênios por mol, o valor 1,21.

$$H = (111 \epsilon / 1,21 C_o) (C/A)$$

Nos cálculos destes trabalhos não consideramos os possíveis efeitos isotópicos, passando a nos referir ao número H/mol como número de hidrogênios aparentes por mol (H_a /mol).

Considerando também que se a computação dos resultados não fornecem números exatos para os hidrogênios ou constantes de velocidades, com certeza ela nos dá uma imagem do comportamento estrutural da proteína em solução e essa imagem é que nós utilizamos para analisar os resultados deste trabalho.

Duas linhas de pensamentos diferentes sobre a interpretação do aparecimento de hidrogênios lentos nas proteínas, tem sido austeramente discutidas nos últimos anos.

A primeira linha admite que ocorre na proteína em solução o que é chamado de "respiração" ou flutuações da estrutura protéica, ou ainda desnaturações reversíveis e localizadas, acompanhadas por destruições de pontes de hidrogênios e conseqüentemente exposição ao solvente para a troca^(25,27,54,63).

Desta linha destacamos o trabalho de Nakanishi e Tsuboi⁽⁶⁴⁾ sobre a flutuação da estrutura da lisozima. Após experiências com troca H/D com ou sem a presença de LiBr como desnaturante, os autores sugerem que existe na lisozima uma conformação N e uma conformação D. Na conformação N ocorre 44 pontes de hidrogênios peptídeo-peptídeo, as mesmas encontradas no estado cristalino. Na conformação D as pontes são quebradas e os 44 hidrogênios estão livres. Em solução, a conformação N está presente, mas quando é adicionado LiBr a quantidade da conformação D aumenta. Os autores imaginam ainda um número de diferentes conformações D₁, D₂, etc. nas quais algumas das 44 pontes de hidrogênio da lisozima estariam quebradas e outras intactas.

A segunda linha de pensamento interpreta o aparecimento de hidrogênios lentos, pelas diferentes acessibilidades ao solvente dos vários hidrogênios, ou seja, o número de hidrogênios lentos numa proteína nativa é igual ao número de hidrogênios com acessibilidade ao solvente restrita, e estes podem ou não estar envolvidos em pontes de hidrogênios intra-moleculares. Dentro ainda desta linha, o mecanismo de exposição ao solvente pode e provavelmente deve, envolver flutuações da proteína, mas estas flutuações não envolvem necessariamente quebra de pontes de hidrogênio.

Desta linha destacamos os trabalhos de Browne et al⁽⁶⁵⁾, Wickett et al⁽⁶⁷⁾ e principalmente as publicações de Ellis e Woodward^(18,90,91) que aplicam a técnica de troca isotópica H/T no inibidor da tripsina de soja, na tripsina e no complexo formado pela interação das duas proteínas.

A idéia fundamental do trabalho reside na obtenção das curvas cinéticas das proteínas isoladas, para a seguir após a interação das proteínas, analisar o comportamento cinético da troca H/T no complexo. Os autores observam que ocorre uma grande diferença entre a cinética do complexo e a simples soma das cinéticas das proteínas isoladas. A cristalografia de RX descartou a possibilidade do retardamento da velocidade de troca, ser explicado pelo aparecimento de pontes de hidrogênio.

Numa discussão muito bem feita os autores propõem que a atenuação da cinética de troca após a formação do complexo é devido primariamente às mudanças na distribuição das velocidades de troca em função das mudanças da acessibilidade ao solvente, mas uma pequena contribuição por formação de pontes de hidrogênio não é descartada pelos autores.

Um fato importante que é aceito pelos dois grupos de pesquisadores é de que o transporte de hidrogênio se faz segundo a teoria de Eigen^(16,17), que determina três fases para a reação de transferência: a primeira fase seria a colisão por difusão do doador de hidrogênio com o aceptor para a formação de uma ponte de hidrogênio no complexo; a segunda seria o equilíbrio de redistribuição do próton entre os dois membros; e a terceira seria a dissociação do complexo com o próton, se a reação teve sucesso, indo para o aceptor.

A análise dos resultados de cinética de troca H/T, aplicada a Crotapotin, Crotamina, Fosfolipase A e Crotóxina, pode ser feita considerando os fatos citados acima, mas não pode decidir sobre uma ou outra explicação das cinéticas encontradas, pela falta de maiores informações sobre as referidas proteínas.

Pela análise de aminoácidos temos que o número de hidrogênios teoricamente trocáveis da Fosfolipase A é 223, sendo que destes, 122 são hidrogênios peptídicos e, 101 são hidrogênios de cadeias laterais e de grupos terminais. A Figura 13 nos mostra o ajuste feito sobre os dados experimentais de troca H/T da Tabela V, cujo desenvolvimento matemático pode ser visto no Apêndice 2.

A equação que originou este ajuste nos fornece a existência de duas classes de hidrogênios, sendo que aqueles mais rápidos, impossíveis de serem determinados pela técnica, são obtidos por simples subtrações do total teórico. Assim teríamos

Classe I = 93 H muito rápidos

Classe II = 59 H com $t_{1/2} = 12,6$ minutos

Classe III = 71 H com $t_{1/2} = 128$ horas

Não aparece na Fosfolipase A a classe de hidrogênios envolvidos em alfa-hélice cujo $t_{1/2}$ seria de 2 a 2,5 horas. Observa-se também que 68% dos hidrogênios teoricamente trocáveis são rápidos, mesmo considerando o fato de trabalharmos a pH 3,0 que está próximo do pH mínimo ou do pH onde a velocidade de troca isotópica é mínima, que está entre pH 2 e pH 4⁽²⁷⁾. Por outro lado sabemos que a Fosfolipase A é uma enzima que produz a hidrólise de ésteres de ácidos graxos ligados à posição 2 de 1,2 diacil-sn-fosfoglicédeos^(3,4,76). Sabemos também que estes substratos são insolúveis e se encontram na forma micelar.

Estudos sobre mecanismos de ação da Fosfolipase A de Naja⁽¹³⁾, de veneno de *Crotalus adamanteus*^(85,86) e principalmente sobre a Fosfolipase A de pâncreas de porco^(71,72,89), tem mostrado que a enzima tem preferência sobre substratos na forma micelar e, que neste caso necessita penetrar na micela para hidrolisar a ligação ésteres.

O número grande de hidrogênios rápidos encontrados na troca H/T da Fosfolipase A, portanto acessíveis ao solvente e possivelmente solvatados, facilitariam a interação com o substrato na forma micelar também solvatado.

Na Figura 14 temos o melhor ajuste feito para a Crotapotin pela computação dos dados experimentais da troca H/T da Tabela V, cujos parâmetros são encontrados no APÊNDICE 2.

O número de hidrogênios teoricamente trocáveis calculados pela análise de aminoácidos é 130, sendo que destes, 81 são hidrogênios peptídicos e, 49 são das cadeias laterais e de grupos terminais. Da equação que originou o ajuste temos:

Classe I = 24 H muito rápidos

Classe II = 84 H com $t_{1/2} = 3,5$ minutos

Classe III = 22 H com $t_{1/2} = 10,5$ horas

Não aparece na Crotapotin a exponencial característica da alfa-hélice com $t_{1/2}$ de 2,5 horas e 83% dos hidrogênios teóricos são rapidamente trocados com o solvente.

Paradies e Breithaupt⁽⁷⁰⁾ mostraram que a Crotapotin é composta de três cadeias polipeptídicas unidas por pontes de enxofre e que a proteína em solução apresenta-se na forma de um elipsóide oblato de revolução com relação a/b = 3. Este fato mostra que a Crotapotin é mais esférica que a Fosfolipase A o que poderia explicar o aparecimento de um maior número de hidrogênios rápidos na Crotapotin.

Por outro lado, do ponto de vista de acessibilidade ao solvente segundo Welch e Fasman⁽⁸⁴⁾, proteínas pequenas devem trocar seus hidrogênios com velocidades maiores do que proteínas de alto peso molecular e sem dúvida tanto a Crotapotin quanto a Fosfolipase A são consideradas proteínas pequenas.

O fenômeno de sinergismo que ocorre na interação não é inespecífico ou somente uma aproximação entre proteínas de cargas opostas; devem ocorrer algumas mudanças estruturais possibilitando a formação de um complexo altamente tóxico que é a Crotoxina.

Na Figura 15 temos o melhor ajuste aos dados experimentais (Tabela VI) da troca H/T da Crotoxina cujos parâmetros podem ser encontrados no Apêndice 2.

O número de hidrogênios teoricamente trocáveis, calculados pela análise de aminoácidos é 353, sendo que destes, 203 são hidrogênios peptídicos e, 150 são de cadeias laterais e grupos terminais. Da equação que originou o ajuste temos:

Classe I = 199 H muito rápidos

Classe II = 32 H com $t_{1/2} = 4,3$ minutos

Classe III = 26 H com $t_{1/2} = 58$ minutos

Classe IV = 96 H com $t_{1/2} = 90$ horas

Na Figura 15 temos também a curva que representa a soma teórica das exponenciais da Crotapotin + as da Fosfolipase A, considerando a interação com proporção molar 1 : 1.

Em primeiro lugar devemos ressaltar que pela simples comparação das curvas da Figura 15, vemos que a Crotoxina apresenta uma curva mais lenta do que a da soma das duas proteínas que a compõem. Em segundo lugar pelos dados obtidos pelo ajuste, temos o aparecimento de uma nova classe de hidrogênios com $t_{1/2} = 58$ min. podendo ser identificados como participantes de pontes de hidrogênios que surgiriam da interação Fosfolipase A-Crotapotin.

No geral podemos dizer que pela interação Fosfolipase A – Crotapotin aparecem na Crotoxina cerca de 13% a mais de hidrogênios lentos que a simples soma das proteínas isoladas.

Segundo Paradies e Breithaupt⁽⁷⁰⁾ pela interação da Fosfolipase A-Crotapotin, a liberação de água é acompanhada por uma liberação de íons H^+ da Fosfolipase A resultando num decréscimo na carga positiva, pelo estabelecimento de pontes de hidrogênios entre grupos carboxil da Crotapotin por volta de pH 6,0. Por outro lado os 26 hidrogênios que trocam com velocidade próxima daqueles participantes de alfa-hélice poderiam sugerir a presença de aproximadamente 8 voltas de uma espiral constituindo-se numa razoável alteração estrutural e que seria, quem sabe, o ponto de ligação aos receptores e conseqüentemente responsável pelo grande aumento de toxicidade.

Na Figura 16 temos os ajustes aos dados experimentais (Tabela VI) da troca H/T da Crotamina em duas condições iniciais de incubação: uma com 2 horas a 70°C e outra com 18 horas a 70°C.

Na Crotamina temos 86 hidrogênios teoricamente trocáveis, sendo que destes, 44 são peptídicos e 42 são hidrogênicos em cadeias laterais e de grupos terminais. Das equações que originaram os ajustes teremos:

	Classe I = 22 H	muito rápidos
2 h a 70°C	Classe II = 38 H	com $t_{1/2} = 3$ minutos
	Classe III = 26 H	com $t_{1/2} = 18$ horas
	Classe I = 61 H	muito rápidos
18 h a 70°C	Classe II = 9 H	com $t_{1/2} = 43$ minutos
	Classe III = 16 H	com $t_{1/2} = 35$ horas

A Crotamina é uma proteína compacta e altamente resistente à temperatura^(44,45). Com aquecimento de 70°C por 18 horas, a Crotamina manteve sua toxicidade plenamente.

Os valores de troca H/T nos mostram que a Crotamina não apresenta hidrogênios envolvidos em pontes, concordando com os dados já publicados de ORD^(44,45). Os 31% de hidrogênios lentos que aparecem após a incubação de duas horas a 70°C, diminuem para 18% se a incubação prossegue até 18 horas e, há o aparecimento de um grupo de 9 hidrogênios com $t_{1/2} = 43$ minutos, que é intermediário entre os encontrados para hidrogênios peptídicos livres ou aqueles comprometidos em pontes de hidrogênios⁽²⁰⁾.

Estes fatos podem sugerir uma "abertura" da proteína sem no entanto levar a uma desnaturação.

Por outro lado, do ponto de vista de acessibilidade ao solvente podemos dizer que a Crotamina, como uma proteína pequena de peso molecular 4880, troca seus hidrogênios rapidamente mantendo um núcleo contendo 26 H lentos, que diminuem para 16 H quando o aquecimento passa de 2 horas a 70°C a 18 horas na mesma temperatura.

V – CONCLUSÕES

- 1) A Crotapotin interage com Fosfolipase A, formando um complexo estável, na proporção molar de 1 : 1, aumentando a toxicidade da Fosfolipase A cerca de 10 vezes.
- 2) A Crotapotin interage com Crotamina, formando um complexo dissociável pela filtração em gel, cuja toxicidade quando a proporção molar do complexo é 1 : 1, é cerca de 4 vezes maior que a Crotamina sozinha.
- 3) A Crotapotin, Fosfolipase A e Crotamina quando estudadas pela medida da velocidade de troca H/T, apresentam comportamento cinético que pode ser representado pela soma de duas exponenciais.

- 4) A cinética da troca isotópica H/T da Crotamina submetida a um aquecimento com $^3\text{H}_2\text{O}$ a 70°C por duas horas e 18 horas, mostra que para um maior tempo de incubação ocorre um aumento do número de hidrogênios rápidos com consequente diminuição dos lentos.
- 5) A cinética de troca H/T da Crotoxina difere da cinética obtida pela simples soma Fosfolipase A + Crotopotin, evidenciando o aparecimento de uma terceira exponencial cujos parâmetros se assemelham aos característicos de hidrogênios envolvidos em alfa-hélice.

APÊNDICE 1

O Apêndice 1, contém os valores de Absorbância (A), contagens por minuto (cpm/ml) e contagens por minuto/Absorção (C/A) para cada tubo após a filtração das amostras contendo proteína + $^3\text{H}_2\text{O}$.

Contém também, os valores de radioatividade inicial da incubação proteína + $^3\text{H}_2\text{O}(\text{C}_0)$ e os tempos de "exchange out".

Finalmente o Apêndice 1 contém o nº de hidrogênios calculados para cada amostra (H) submetida à filtração, com base na equação:

$$\text{H/mol} = (\text{E} \times 111/\text{C}_0) (\text{C/A})$$

Foram utilizados para o cálculo do nº H/mol, valores médios de C/A que tinham uma variação entre si de no máximo 5%.

CROTOXINA

	$C_o = 7,86 \times 10^8$ cpm/ml tempo = 1 min						$C_o = 7,18 \times 10^8$ cpm/ml tempo = 2 min						$C_o = 7,24 \times 10^8$ cpm/ml tempo = 3 min					
tubo	20	21	22	23	24	25	17	18	19	19	20	21	19	20	21	22	23	24
A	0,60	0,78	0,70	0,56	0,37	0,23	0,56	0,72	0,69	0,55	0,39	0,27	0,35	0,50	0,48	0,42	0,33	0,25
cpm/ml	20016	22516	23319	18561	11834	8117	19392	22948	21479	18323	13742	9227	11390	14655	15247	13368	11620	9126
C/A	33360	28866	33312	33144	31983	34540	34628	31872	31128	33314	35235	34174	32542	29310	31764	31828	35212	36504
H_m	143						154						147					

	$C_o = 9,29 \times 10^8$ cpm/ml tempo = 5 min						$C_o = 9,29 \times 10^8$ cpm/ml tempo = 12 min						$C_o = 9,5 \times 10^8$ cpm/ml tempo = 15 min					
tubo	19	20	21	22	23	24	14	15	16	17	18	19	16	17	18	19	20	21
A	0,17	0,15	0,15	0,11	0,08	0,05	0,06	0,13	0,19	0,20	0,15	0,10	0,12	0,18	0,22	0,17	0,11	0,08
cpm/ml	6617	6553	5184	4008	2665	1608	1890	4252	6193	6341	5786	3052	5473	7387	8576	6396	4476	3220
C/A	38923	43686	34560	36436	32812	32160	31500	32707	32594	31705	38573	30520	45623	41038	38981	37623	40690	40250
H_m	132						112						137					

CROTOXINA

	$C_o = 9,5 \times 10^8$ cpm/ml tempo = 30 min						$C_o = 9,29 \times 10^8$ cpm/ml tempo = 35 min						$C_o = 9,29 \times 10^8$ cpm/ml tempo = 55 min					
tubo	15	16	17	18	19	20	18	19	20	21	22	23	17	18	19	20	21	22
A	0,15	0,22	0,22	0,18	0,14	0,10	0,18	0,17	0,15	0,15	0,11	0,09	0,14	0,15	0,12	0,11	0,09	0,06
cpm/ml	4879	7499	7543	5968	4820	3903	5738	5404	5738	4311	3192	2737	4207	3923	3208	2919	2523	1752
C/A	32526	34016	34286	33155	34428	39030	31877	31788	38253	28740	29018	30411	30050	26153	26733	26536	28033	29200
H_m	119						111						102					

	$C_o = 9,5 \times 10^8$ cpm/ml tempo = 60 min						$C_o = 9,29 \times 10^8$ cpm/ml tempo = 70 min						$C_o = 9,5 \times 10^8$ cpm/ml tempo = 75 min					
tubo	18	19	20	21	22	23	18	19	20	21	22	23	16	17	18	19	20	21
A	0,19	0,22	0,21	0,17	0,12	0,08	0,09	0,15	0,20	0,18	0,16	0,14	0,24	0,24	0,19	0,14	0,11	0,07
cpm/ml	6210	6634	6240	5543	3621	2848	2431	4381	5662	5207	4995	3802	7445	7602	6009	4945	3519	3106
C/A	32684	30154	29714	32605	30175	35600	27011	29206	28310	28927	31218	27157	31020	31675	31626	35321	30600	44471
H_m	107						103						111					

CROTOXINA

	$C_o = 9,29 \times 10^8$ cpm/ml tempo = 90 min						$C_o = 9,5 \times 10^8$ cpm/ml tempo = 100 min						$C_o = 9,29 \times 10^8$ cpm/ml tempo = 120 min					
tubo	14	15	16	17	18	19	18	19	20	21	22	23	17	18	19	20	21	22
A	0,12	0,13	0,11	0,10	0,09	0,09	0,19	0,19	0,19	0,17	0,13	0,09	0,06	0,13	0,18	0,20	0,19	0,14
cpm/ml	3380	3622	2980	2980	2665	1722	6445	5823	6163	5356	4092	3002	1643	4036	5322	5735	5088	4294
C/A	28166	27861	27090	29800	29611	24600	33921	30805	32436	31505	31476	33355	27383	31046	29566	27975	28266	30671
H_m	104						112						104					

	$C_o = 9,5 \times 10^8$ cpm/ml tempo = 130 min						$C_o = 9,5 \times 10^8$ cpm/ml tempo = 150 min						$C_o = 9,29 \times 10^8$ cpm/ml tempo = 190 min					
tubo	16	17	18	19	20	21	18	19	20	21	22	23	15	16	17	18	19	20
A	0,15	0,122	0,24	0,22	0,16	0,11	0,09	0,16	0,23	0,23	0,19	0,10	0,14	0,19	0,20	0,17	0,11	0,07
cpm/ml	4036	5183	8003	6129	4418	3121	2537	5090	6207	6266	5060	4291	3740	4848	5191	4476	2876	2162
C/A	26906	23559	33345	27859	27612	26008	26989	31812	26986	27243	26631	42910	26714	25515	25955	26329	25008	26145
H_m	97						96						94					

CROTOXINA

	$C_o = 9,29 \times 10^8$ cpm/ml tempo = 240 min						$C_o = 9,5 \times 10^8$ cpm/ml tempo = 280 min						$C_o = 9,5 \times 10^8$ cpm/ml tempo = 300 min					
tubo	20	21	22	23	24	25	13	14	15	16	17	18	16	17	18	19	20	21
A	0,18	0,19	0,18	0,13	0,11	0,07	0,17	0,21	0,20	0,15	0,13	0,06	0,14	0,21	0,21	0,21	0,15	0,12
cpm/ml	5981	4842	4711	3730	2719	2212	4776	5971	5577	4044	2767	2040	3342	5258	5937	4940	4524	3034
C/A	32227	25484	26172	28692	24718	31600	28094	28433	27885	26960	21284	34000	23871	25038	28271	23523	30160	25283
H_m	94						98						91					

	$C_o = 9,29 \times 10^8$ cpm/ml tempo = 310 min						$C_o = 9,5 \times 10^8$ cpm/ml tempo = 360 min						$C_o = 9,5 \times 10^8$ cpm/ml tempo = 420 min					
tubo	16	17	18	19	20	21	16	17	18	19	20	21	18	19	20	21	22	23
A	0,13	0,19	0,20	0,17	0,13	0,09	0,18	0,25	0,23	0,17	0,13	0,07	0,18	0,23	0,23	0,20	0,14	0,09
cpm/ml	3322	5517	5135	4760	3201	2385	5232	6585	6085	4992	3456	1977	4629	6017	6057	4958	3974	3076
C/A	25553	29036	25048	28000	24623	26500	29066	26340	26456	29364	26584	24712	25716	26160	26334	24790	28385	34177
H_m	93						93						92					

CROTOXINA

	$C_o = 9,5 \times 10^8$ cpm/ml tempo = 480 min						$C_o = 7,18 \times 10^8$ cpm/ml tempo = 930 min						$C_o = 7,18 \times 10^8$ cpm/ml tempo = 960 min					
tubo	17	18	19	20	21	22	18	19	20	21	22	23	17	18	19	20	21	22
A	0,09	0,19	0,26	0,23	0,22	0,16	0,13	0,12	0,11	0,08	0,06	0,03	0,10	0,16	0,14	0,14	0,09	0,06
cpm/ml	2935	4641	6151	6844	5416	3841	2839	2603	2136	1596	1192	917	1809	3319	3869	2675	2172	1307
C/A	30572	24425	23657	29756	24618	74006	21838	21691	19418	19950	19866	24131	18090	20743	27635	19107	24133	21783
H_m	87						87						85					

	$C_o = 7,18 \times 10^8$ cpm/ml tempo = 1020 min						$C_o = 7,18 \times 10^8$ cpm/ml tempo = 1260 min						$C_o = 7,18 \times 10^8$ cpm/ml tempo = 1320 min					
tubo	18	19	20	21	22	23	15	16	17	18	19	20	20	21	22	23	24	25
A	0,05	0,09	0,13	0,11	0,11	0,08	0,05	0,11	0,15	0,15	0,12	0,07	0,11	0,13	0,12	0,11	0,08	0,05
cpm/ml	1063	2427	3427	2337	2204	1855	1048	2033	2476	2919	2461	1294	2036	2407	2293	1916	1822	1132
C/A	21260	26966	26361	21245	20036	20611	20960	18481	16506	19460	20508	18485	18509	18515	19100	17600	21690	19517
H_m	88						85						78					

CROTOXINA

	$C_0 = 9,29 \times 10^8$ cpm/ml tempo = 1430 min						$C_0 = 9,29 \times 10^8$ cpm/ml tempo = 1490 min					
tubo	16	17	18	19	20	21	15	16	17	18	19	20
A	0,11	0,18	0,20	0,19	0,14	0,08	0,10	0,18	0,22	0,20	0,16	0,11
cpm/ml	2440	3897	4533	4343	3068	2011	2199	4133	4840	4083	3271	2134
C/A	22181	21650	22765	22857	21914	25137	20942	22961	22000	20415	20443	19400
H_m	81						75					

FOSFOLIPASE A

	$C_o = 5,9 \times 10^8$ cpm/ml tempo = 1 min						$C_o = 5,3 \times 10^8$ cpm/ml tempo = 2 min						$C_o = 4,05 \times 10^8$ cpm/ml tempo = 3 min					
tubo	12	13	14	15	16	17	8	9	10	11	12	13	16	17	18	19	20	21
A	0,12	0,18	0,19	0,18	0,18	0,18	0,06	0,43	0,84	0,76	0,45	0,28	0,37	0,74	0,89	0,82	0,61	0,41
cpm/ml	5735	6772	7094	6715	7458	–	2526	12072	21955	21080	11894	9423	8620	15344	17572	15744	12058	8515
C/A	45880	37622	37366	37305	41433	–	42100	28074	26136	27736	26431	33653	22986	20735	19743	19200	19767	20768
H_m	156						128						123					

	$C_o = 3,16 \times 10^8$ cpm/ml tempo = 4 min						$C_o = 5,96 \times 10^8$ cpm/ml tempo = 5 min						$C_o = 5,99 \times 10^8$ cpm/ml tempo = 6 min					
tubo	17	18	19	20	21	22	10	11	12	13	14	15	7	8	9	10	11	12
A	0,73	1,0	1,2	0,96	0,65	0,38	0,16	0,44	0,69	0,75	0,64	0,40	0,13	0,48	0,65	0,55	0,48	0,39
cpm/ml	14256	19142	21513	17656	12064	7570	4048	11342	16554	18251	17097	14545	3143	15560	16542	14992	16228	–
C/A	19528	19142	17927	18391	18560	19921	25300	25777	23991	24384	26714	36362	24176	32416	25449	27258	33808	–
H_m	113						104						106					

FOSFOLIPASE A

	$C_o = 5 \times 10^8$ cpm/ml tempo = 15 min						$C_o = 7 \times 10^8$ cpm/ml tempo = 20 min						$C_o = 7 \times 10^8$ cpm/ml tempo = 27 min					
tubo	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	17	18	19	20	21	22
A	0,22	0,50	0,49	0,46	0,41	0,30	0,04	0,15	0,21	0,23	0,16	0,09	0,07	0,16	0,22	0,24	0,25	0,21
cpm/ml	4503	10010	9863	9568	—	—	1932	4296	6038	5855	4583	2862	1777	4037	5527	5800	4406	2739
C/A	20468	20020	20128	20865	—	—	48300	28640	28752	25456	28643	31800	25385	25231	25122	24166	17624	13042
H_m	100						98						89					

	$C_o = 9.04 \times 10^8$ cpm/ml tempo = 30 min						$C_o = 7 \times 10^8$ cpm/ml tempo = 56 min						$C_o = 7 \times 10^8$ cpm/ml tempo = 72 min					
tubo	19	20	21	22	23	24	18	19	20	21	22	23	16	17	18	19	20	21
A	0,08	0,08	0,09	0,07	0,05	0,03	0,06	0,14	0,30	0,26	0,21	0,14	0,08	0,16	0,22	0,22	0,18	0,13
cpm/ml	1988	2404	2516	2066	1988	—	1463	3051	6527	5404	3934	3051	1700	3877	4334	4864	4048	3335
C/A	24850	30050	27995	29514	39760	—	24383	21792	21756	20784	18733	21792	21250	24231	19700	22109	21881	25653
H_m	78						77						73					

FOSFOLIPASE A

	$C_0 = 9,04 \times 10^8$ cpm/ml tempo = 75 min						$C_0 = 9,04 \times 10^8$ cpm/ml tempo = 90 min						$C_0 = 7 \times 10^8$ cpm/ml tempo = 102 min					
tubo	19	20	21	22	23	24	18	19	20	21	22	23	20	21	22	23	24	25
A	0,06	0,09	0,11	0,11	0,08	0,06	0,04	0,06	0,06	0,06	0,07	0,06	0,06	0,15	0,21	0,23	0,23	0,18
cpm/ml	1466	2594	2925	2541	1883	1356	1171	1518	1950	1680	1761	-	1516	3331	4576	4530	4939	3714
C/A	24433	28822	26590	23100	23573	22600	27880	25300	29545	26350	25157	-	25266	22206	21790	19695	21473	20633
H_m	69						70						74					

	$C_0 = 9,04 \times 10^8$ cpm/ml tempo = 140 min						$C_0 = 7,42 \times 10^8$ cpm/ml tempo = 150 min						$C_0 = 7,42 \times 10^8$ cpm/ml tempo = 240 min					
tubo	13	14	15	16	17	18	20	21	22	23	24	25	19	20	21	22	23	24
A	0,06	0,09	0,10	0,08	0,04	-	0,17	0,28	0,23	0,23	0,19	0,15	0,14	0,23	0,31	0,30	0,23	0,15
cpm/ml	1332	2227	2333	1791	1095	-	4326	6032	5689	4946	4060	3090	2889	5515	6303	6182	4970	2796
C/A	22200	24744	23330	22387	27375	-	25447	21542	24734	21504	21368	20600	20635	23978	20336	20606	21608	18640
H_m	69						71						70					

FOSFOLIPASE A

	$C_0 = 7,42 \times 10^8$ cpm/ml tempo = 300 min						$C_0 = 7,42 \times 10^8$ cpm/ml tempo = 360 min						$C_0 = 7,42 \times 10^8$ cpm/ml tempo = 420 min					
tubo	7	8	9	10	11	12	11	12	13	14	15	16	20	21	22	23	24	25
A	0,06	0,57	0,47	0,14	0,04	0,03	0,14	0,22	0,25	0,19	0,14	0,10	0,15	0,25	0,28	0,29	0,21	0,18
cpm/ml	1287	11859	9716	2828	-	-	2701	4587	5416	3542	3016	-	10051	4614	5477	5078	3884	2857
C/A	21450	20805	20672	20200	-	-	19292	20850	21664	18642	21542	-	67006	18456	19560	18135	18495	15443
H_m	70						69						64					

	$C_0 = 5,25 \times 10^8$ cpm/ml tempo = 1110 min						$C_0 = 5,25 \times 10^8$ cpm/ml tempo = 1200 min						$C_0 = 7 \times 10^8$ cpm/ml tempo = 1440 min					
tubo	18	19	20	21	22	23	17	18	19	20	21	22	20	21	22	23	24	25
A	0,04	0,06	0,05	0,05	0,03	-	0,06	0,08	0,07	0,07	0,03	0,02	0,19	0,20	0,23	0,17	0,12	0,08
cpm/ml	821	960	798	831	473	-	855	1256	1037	1013	-	-	2852	3653	4204	3016	2325	1683
C/A	20625	16000	15960	16620	15766	-	14250	15700	14814	14471	-	-	15010	18265	18278	17976	19375	21037
H_m	69						68						64					

FOSFOLIPASE A

	$C_0 = 5,52 \times 10^8$ cpm/ml tempo = 1470 min						$C_0 = 7 \times 10^8$ cpm/ml tempo = 1500 min						$C_0 = 7 \times 10^8$ cpm/ml tempo = 1800 min					
tubo	19	20	21	22	23	24	19	20	21	22	23	24	19	20	21	22	23	24
A	0,06	0,08	0,08	0,06	0,04	0,03	0,11	0,20	0,23	0,25	0,18	0,14	0,03	0,06	0,07	0,07	0,06	0,05
cpm/ml	1127	1059	1098	927	595	422	1093	3879	3464	4093	2790	1990	709	1116	1411	1337	1128	1049
C/A	18783	13237	13725	15450	14875	14066	15390	19395	15060	16372	15500	14214	23633	18600	20157	19100	18800	20980
H_m	62						58						60					

CROTAPOTIN

	$C_o = 5,57 \times 10^8$ cpm/ml tempo = 1 min						$C_o = 5,73 \times 10^8$ cpm/ml tempo = 2 min						$C_o = 8,33 \times 10^8$ cpm/ml tempo = 5 min					
tubo	17	18	19	20	21	22	12	13	14	15	16	17	21	22	23	24	25	26
A	0,20	0,26	0,22	0,14	0,08	0,04	0,15	0,25	0,30	0,25	0,13	0,08	0,06	0,06	0,10	0,08	0,07	–
cpm/ml	12789	12777	10333	6444	3645	2506	7227	12949	14811	12880	8960	–	1708	2809	4500	3838	3309	–
C/A	63945	49142	46968	46028	45562	62250	48180	51796	49370	51520	68923	–	28466	47150	45000	47975	47271	–
H_m	85						83						54					

	$C_o = 6,31 \times 10^8$ cpm/ml tempo = 10 min						$C_o = 8,33 \times 10^8$ cpm/ml tempo = 30 min						$C_o = 6,31 \times 10^8$ cpm/ml tempo = 60 min					
tubo	18	19	20	21	22	23	20	21	22	23	24	25	19	20	21	22	23	24
A	0,04	0,05	0,05	0,04	0,03	–	0,07	0,15	0,16	0,16	0,13	0,09	0,02	0,05	0,04	0,04	0,03	–
cpm/ml	674	1060	954	846	557	–	2740	3593	3916	3426	2887	2122	560	791	676	615	419	–
C/A	16850	21200	19080	21150	18566	–	38055	23953	24123	21412	21385	22574	28000	15820	13520	15375	13966	–
H_m	30						27						23					

CROTAPOTIN

	$C_o = 8,33 \times 10^8$ cpm/ml tempo = 90 min						$C_o = 8,33 \times 10^8$ cpm/ml tempo = 120 min						$C_o = 8,33 \times 10^8$ cpm/ml tempo = 170 min					
tubo	17	18	19	20	21	22	20	21	22	23	24	25	16	17	18	19	20	21
A	0,08	0,16	0,23	0,19	0,10	0,04	0,10	0,12	0,13	0,12	0,11	0,10	0,09	0,10	0,08	0,07	0,06	-
cpm/ml	1617	3228	4320	3261	1875	1006	1726	2132	1834	2101	1709	1770	1527	1494	1257	1230	937	-
C/A	20212	20175	18782	17163	18750	25150	17260	17766	14107	17508	17354	17700	16966	14940	15712	15375	15616	-
H_m	22						20						18					

	$C_o = 6,85 \times 10^8$ cpm/ml tempo = 210 min						$C_o = 6,85 \times 10^8$ cpm/ml tempo = 240 min						$C_o = 8,33 \times 10^8$ cpm/ml tempo = 270 min					
tubo	20	21	22	23	24	25	17	18	19	20	21	22	17	18	19	20	21	22
A	0,08	0,12	0,11	0,10	0,09	0,05	0,06	0,08	0,09	0,09	0,08	0,07	0,09	0,14	0,15	0,14	0,12	0,07
cpm/ml	411	1275	1315	1122	878	565	537	749	922	997	776	503	1461	1752	1969	2078	1496	918
C/A	5137	10625	11954	11220	9755	11300	8950	9362	10244	11077	9700	7185	16233	12514	13126	14842	12466	13114
H_m	16						15						15					

CROTAPOTIN

	$C_o = 8,33 \times 10^8$ cpm/ml tempo = 300 min						$C_o = 6,31 \times 10^8$ cpm/ml tempo = 410 min						$C_o = 6,85 \times 10^8$ cpm/ml tempo = 1320 min					
tubo	14	15	16	17	18	19	16	17	18	19	20	21	17	18	19	20	21	22
A	0,11	0,17	0,19	0,09	0,07	0,05	0,03	0,05	0,04	0,05	0,04	0,04	0,04	0,08	0,10	0,12	0,11	0,08
cpm/ml	1548	2394	2619	1342	410	342	239	447	372	446	203	193	249	253	281	223	351	255
C/A	14072	14082	13784	14911	5857	6840	7966	8940	9300	8920	5075	4825	6225	3162	2810	1858	3190	3187
H _m	16						15						5					

	$C_o = 6,85 \times 10^8$ cpm/ml tempo = 1380 min						$C_o = 6,85 \times 10^8$ cpm/ml tempo = 1440 min					
tubo	20	21	22	23	24	25	16	17	18	19	20	21
A	0,08	0,10	0,11	0,10	0,07	-	0,09	0,10	0,11	0,09	-	0,06
cpm/ml	294	381	406	259	258	-	222	267	288	185	-	149
C/A	3675	3810	3690	2590	3685	-	2466	2670	2618	2055	-	2483
H _m	5						4					

CROTAMINA - 2 horas de incubação a 70°C

	$C_o = 9,01 \times 10^8$ cpm/ml tempo = 7 min						$C_o = 9,01 \times 10^8$ cpm/ml tempo = 15 min						$C_o = 9,01 \times 10^8$ cpm/ml tempo = 48 min					
tubo	20	21	22	23	24	25	13	14	15	16	17	18	20	21	22	23	24	25
A	0,11	0,14	0,16	0,10	0,07	0,03	0,02	0,13	0,13	0,08	0,03	-	0,06	0,10	0,11	0,11	0,10	0,06
cpm/ml	2111	2846	3287	2055	1484	892	-	2801	2731	1617	792	-	1302	2045	2273	2187	2000	1608
C/A	19190	20328	20543	20550	21200	29733	-	21546	21007	20212	26400	-	21700	20450	20663	19881	20000	26800
H_m	29						29						28					

	$C_o = 9,01 \times 10^8$ cpm/ml tempo = 55 min						$C_o = 9,01 \times 10^8$ cpm/ml tempo = 88 min						$C_o = 9,01 \times 10^8$ cpm/ml tempo = 97 min					
tubo	16	17	18	19	20	21	20	21	22	23	24	25	18	19	20	21	22	23
A	0,05	0,13	0,17	0,17	0,08	0,07	0,03	0,09	0,14	0,12	0,10	-	0,10	0,16	0,16	0,11	0,05	0,03
cpm/ml	945	2425	3075	3061	1804	1640	1130	1772	2918	2546	2040	-	1818	2961	2657	1990	948	777
C/A	18900	18653	18018	18005	22550	23514	37666	19688	20842	19584	20400	-	18180	18506	14731	18090	18960	22852
H_m	26						30						25					

CROTAMINA - 2 horas de Incubação a 70°C

	$C_o = 3,93 \times 10^8$ cpm/ml tempo = 1 min						$C_o = 5,04 \times 10^8$ cpm/ml tempo = 5 min						$C_o = 5,76 \times 10^8$ cpm/ml tempo = 10 min					
tubo	13	14	15	16	17	18	20	22	23	24	26	27	19	20	21	22	23	24
A	0,11	0,18	0,30	0,36	0,40	-	0,12	0,46	0,57	0,59	0,35	0,22	0,46	0,59	0,61	0,45	0,34	0,25
cpm/ml	1998	3316	5210	6090	6907	-	2163	8589	10173	10806	6479	3917	8261	10243	10210	7786	5625	4110
C/A	18163	18422	17366	16916	17267	-	18025	18671	17487	18315	18511	17804	17958	17361	16737	17302	16544	16440
H_m	58						47						39					

	$C_o = 9,01 \times 10^8$ cpm/ml tempo = 1490 min						$C_o = 9,01 \times 10^8$ cpm/ml tempo = 1550 min					
tubo	24	25	26	27	28	29	19	20	21	22	23	24
A	0,10	0,12	0,13	0,11	0,07	0,04	0,07	0,12	0,15	0,15	0,11	0,07
cpm/ml	1222	786	593	683	471	272	486	915	975	1117	803	611
C/A	12220	6550	7561	6209	6728	6800	6942	7625	6500	7446	7300	8728
H_m	9						10					

CROTAMINA – 2 horas de incubação a 70°C

	$C_o = 9,01 \times 10^8$ cpm/ml tempo = 120 min						$C_o = 9,01 \times 10^8$ cpm/ml tempo = 180 min						$C_o = 9,01 \times 10^8$ cpm/ml tempo = 345 min					
tubo	23	24	25	26	27	28	19	20	21	22	23	24	19	20	21	22	23	24
A	0,11	0,12	0,11	0,09	0,07	0,04	0,05	0,10	0,11	0,10	0,08	0,05	0,05	0,10	0,20	0,10	0,09	0,04
cpm/ml	1720	1962	2305	1517	1138	770	1021	1534	1604	1671	1557	768	615	1343	2425	1487	1040	–
C/A	15636	16350	20954	16855	16257	18333	20420	15340	14581	16710	19462	15360	12300	13430	12125	14870	11555	–
H_m	23						22						18					

	$C_o = 9,01 \times 10^8$ cpm/ml tempo = 410 min						$C_o = 9,01 \times 10^8$ cpm/ml tempo = 480 min						$C_o = 9,01 \times 10^8$ cpm/ml tempo = 1410 min					
tubo	21	22	23	24	25	26	20	21	22	23	24	25	21	22	23	24	25	–
A	0,06	0,08	0,10	0,11	0,09	–	0,07	0,09	0,09	0,10	0,08	0,05	0,07	0,10	0,11	0,10	0,08	–
cpm/ml	816	1059	1355	1897	1302	–	942	1256	1285	1342	1091	999	593	873	937	1236	679	–
C/A	13600	13237	13550	17245	14466	–	13457	13955	14277	13420	13637	19980	8471	8730	8518	12360	8487	–
H_m	20						20						12					

CROTAMINA - 18 horas de Incubação a 70°C

	$C_o = 8,36 \times 10^8$ cpm/ml tempo = 5 min						$C_o = 8,36 \times 10^8$ cpm/ml tempo = 20 min						$C_o = 8,36 \times 10^8$ cpm/ml tempo = 40 min					
tubo	18	19	20	21	22	23	15	16	17	18	19	20	19	20	21	22	23	24
A	0,04	0,09	0,14	0,12	0,09	0,07	0,06	0,12	0,18	0,16	0,13	0,08	0,09	0,12	0,17	0,12	0,11	0,08
cpm/ml	670	1470	2225	1858	2388	1795	909	1715	2351	2502	1957	872	1981	1606	2314	1634	1575	1060
C/A	16730	16333	15892	15816	25866	25642	15150	14291	13061	15637	15053	10900	22011	13383	13670	13616	14318	13250
H_m	24						24						21					

	$C_o = 8,39 \times 10^8$ cpm/ml tempo = 55 min						$C_o = 8,36 \times 10^8$ cpm/ml tempo = 60 min						$C_o = 8,39 \times 10^8$ cpm/ml tempo = 150 min					
tubo	17	18	19	20	21	22	17	18	19	20	21	22	21	22	23	24	25	26
A	0,12	0,27	0,20	0,15	0,08	0,05	0,08	0,14	0,17	0,16	0,12	0,07	0,06	0,11	0,13	0,13	0,14	0,11
cpm/ml	1180	3445	2570	1851	829	552	1660	1783	2238	2693	1778	1026	644	1104	1406	1321	1492	-
C/A	9833	12759	12850	12340	10362	11040	20750	12735	13164	16831	14816	14657	10733	10036	10815	10161	10657	-
H_m	19						21						16					

CROTAMINA - 18 horas de Incubação a 70°C

	$C_o = 8,39 \times 10^8$ cpm/ml tempo = 165 min						$C_o = 8,36 \times 10^8$ cpm/ml tempo = 180 min						$C_o = 8,39 \times 10^8$ cpm/ml tempo = 210 min					
tubo	17	18	19	20	21	22	17	18	19	20	21	22	24	25	26	27	28	29
A	0,06	0,15	0,20	0,18	0,11	0,06	0,12	0,19	0,17	0,14	0,06	0,05	0,12	0,13	0,14	0,12	0,09	0,07
cpm/ml	1006	1472	1986	1900	1121	588	1677	2115	1811	1478	972	872	1201	1658	1344	1230	916	744
C/A	17100	9813	9930	10555	10190	8966	13985	11131	10652	10557	16200	17740	10008	12753	9600	10250	10177	10628
H_m	15						17						15					

	$C_o = 8,39 \times 10^8$ cpm/ml tempo = 220 min						$C_o = 8,36 \times 10^8$ cpm/ml tempo = 240 min						$C_o = 8,39 \times 10^8$ cpm/ml tempo = 260 min					
tubo	14	15	16	17	18	19	18	19	20	21	22	23	23	24	25	26	27	28
A	0,08	0,12	0,13	0,12	0,10	0,09	0,07	0,10	0,14	0,13	0,11	0,09	0,10	0,14	0,13	0,13	0,12	0,09
cpm/ml	1235	1055	1121	1082	807	893	722	1486	1808	1497	1358	850	968	2044	1515	1384	1149	854
C/A	15437	8791	9623	9016	8070	9922	10314	14860	12914	11515	12345	10625	9680	14600	11807	10646	9575	9488
H_m	13						16						15					

CROTAMINA - 18 horas de Incubação a 70°C

	$C_0 = 8,36 \times 10^8$ cpm/ml tempo = 270 min						$C_0 = 8,36 \times 10^8$ cpm/ml tempo = 290 min						$C_0 = 8,36 \times 10^8$ cpm/ml tempo = 1380 min					
tubo	19	20	21	22	23	24	15	16	17	18	19	20	20	21	22	23	24	25
A	0,11	0,18	0,20	0,15	0,10	-	0,06	0,14	0,15	0,16	0,12	0,09	0,11	0,12	0,12	0,09	0,08	0,05
cpm/ml	1151	1917	2092	1819	1005	-	668	1538	1611	1773	1730	1611	739	726	636	608	483	263
C/A	10463	10650	10460	12126	10050	-	11133	10985	10740	11081	14416	17500	6718	6050	5300	6755	6037	5260
H_m	16						16						10					

	$C_0 = 3,36 \times 10^8$ cpm/ml tempo = 1440 min					
tubo	10	11	12	13	14	15
A	0,06	0,18	0,24	0,19	0,10	0,04
cpm/ml	395	1274	1544	1220	1138	707
C/A	6500	7077	6433	6421	11380	17675
H_m	10					

APÊNDICE 2

O Apêndice 2, contém os parâmetros obtidos pela computação dos dados experimentais do nº de H/mol de cada proteína.

Os ajustes foram alcançados num Computador IBM/370, modelo 155 do Centro de Processamento de Dados do IEA, através um programa denominado SAAM (Simulation, Analysis and Modeling) na versão nº 25, desenvolvido pelo National Institutes of Health no Laboratory of Theoretical Biology por Mones Berman e Marjory F. Weiss.

FINAL VALUES
 SUBROUTINE VERSION OF 350PP74J-IBM
 ADJUST DE 3 EXPONENTIALS - CROTILINA

A. SAARINEN

PARAMETER VALUES

ADJUSTABLE PARAMETERS	DEPENDENT PARAMETERS	FIXED PARAMETERS
U1 5.0 11.0 0.2664822E+02		
U2 5.0 11.0 0.2263775E+02		
U3 5.0 11.0 0.2344824E+03		
U4 5.0 11.0 0.2262154E+03		
U5 5.0 11.0 0.2167151E+00		

D	C	---CAY---	T	THE TA	KTEFF.1	QC1	GN	GD-QC	UC/DO	WT	F50
1	5	0	0.1000E+01	0.0	0.1000E+01	0.14207E+03	0.14207E+03	0.69754E+01	1.049	0.4766E+00	0.2122E-01
2	5	0	0.2000E+01	0.0	0.1000E+01	0.14518E+03	0.14500E+03	0.96157E+01	0.964	0.4110E+00	0.6401E-02
3	5	0	0.3000E+01	0.0	0.1000E+01	0.14145E+03	0.14700E+03	0.55471E+01	0.962	0.4519E+00	0.5364E-02
4	5	0	0.4000E+01	0.0	0.1000E+01	0.13518E+03	0.13200E+03	0.31776E+01	1.024	0.5594E+00	0.1968E-01
5	5	0	0.5000E+01	0.0	0.1000E+01	0.12324E+03	0.11200E+03	0.11242E+02	1.100	0.7770E+00	0.2331E-01
6	5	0	0.6000E+01	0.0	0.1000E+01	0.11426E+03	0.11300E+03	0.16366E+02	0.881	0.5193E+00	0.1847E-01
7	5	0	0.7000E+01	0.0	0.1000E+01	0.11147E+03	0.11100E+03	0.47447E+01	0.960	0.6883E+00	0.1699E-01
8	5	0	0.8000E+01	0.0	0.1000E+01	0.11297E+03	0.11100E+03	0.19711E+02	1.218	0.7911E+00	0.1651E-01
9	5	0	0.9000E+01	0.0	0.1000E+01	0.10844E+03	0.10200E+03	0.68444E+01	1.067	0.4938E+00	0.9841E-02
10	5	0	0.0000E+02	0.0	0.1000E+01	0.10700E+03	0.10700E+03	0.99748E+00	1.009	0.8513E+00	0.9154E-02
11	5	0	0.2000E+02	0.0	0.1000E+01	0.10641E+03	0.10300E+03	0.36109E+01	1.033	0.9187E+00	0.9774E-02
12	5	0	0.3500E+02	0.0	0.1000E+01	0.10568E+03	0.11100E+03	0.59159E+01	0.952	0.7911E+00	0.1065E-01
13	5	0	0.5000E+02	0.0	0.1000E+01	0.10374E+03	0.10400E+03	0.26247E+00	0.997	0.9011E+00	0.1337E-01
14	5	0	0.6000E+02	0.0	0.1000E+01	0.10261E+03	0.11200E+03	0.93884E+01	0.916	0.7770E+00	0.1448E-01
15	5	0	0.7000E+02	0.0	0.1000E+01	0.10077E+03	0.10400E+03	0.32991E+01	0.960	0.9011E+00	0.1985E-01
16	5	0	0.8000E+02	0.0	0.1000E+01	0.98499E+02	0.97000E+02	0.28899E+01	1.030	0.1036E+01	0.1981E-01
17	5	0	0.9000E+02	0.0	0.1000E+01	0.98502E+02	0.96000E+02	0.25018E+01	1.024	0.1058E+01	0.1494E-01
18	5	0	0.1000E+03	0.0	0.1000E+01	0.96429E+02	0.96000E+02	0.24293E+01	1.024	0.1103E+01	0.1207E-01
19	5	0	0.2000E+03	0.0	0.1000E+01	0.94483E+02	0.96000E+02	0.68291E+02	1.087	0.1103E+01	0.1038E-01
20	5	0	0.3000E+03	0.0	0.1000E+01	0.93478E+02	0.96000E+02	0.43218E+01	0.956	0.1015E+01	0.1130E-01
21	5	0	0.4000E+03	0.0	0.1000E+01	0.93257E+02	0.91000E+02	0.22573E+01	1.025	0.1177E+01	0.1206E-01
22	5	0	0.5000E+03	0.0	0.1000E+01	0.93762E+02	0.91000E+02	0.41981E+01	1.001	0.1127E+01	0.1245E-01
23	5	0	0.6000E+03	0.0	0.1000E+01	0.92195E+02	0.91000E+02	0.88496E+00	0.991	0.1127E+01	0.1402E-01
24	5	0	0.7000E+03	0.0	0.1000E+01	0.91304E+02	0.92000E+02	0.49363E+00	0.992	0.1152E+01	0.1483E-01
25	5	0	0.8000E+03	0.0	0.1000E+01	0.90427E+02	0.87000E+02	0.35027E+01	1.040	0.1208E+01	0.1468E-01
26	5	0	0.9000E+03	0.0	0.1000E+01	0.85116E+02	0.87000E+02	0.18843E+01	0.978	0.1288E+01	0.8127E-02
27	5	0	0.0000E+04	0.0	0.1000E+01	0.84777E+02	0.85000E+02	0.22884E+02	0.997	0.1349E+01	0.8229E-02
28	5	0	0.1000E+04	0.0	0.1000E+01	0.84688E+02	0.85000E+02	0.39113E+01	0.956	0.1259E+01	0.8794E-02
29	5	0	0.2000E+04	0.0	0.1000E+01	0.81411E+02	0.85000E+02	0.35899E+01	0.958	0.1349E+01	0.1484E-01
30	5	0	0.3000E+04	0.0	0.1000E+01	0.80794E+02	0.78000E+02	0.27544E+01	1.035	0.1602E+01	0.1573E-01
31	5	0	0.4000E+04	0.0	0.1000E+01	0.79945E+02	0.81000E+02	0.16347E+01	0.982	0.1486E+01	0.1897E-01
32	5	0	0.5000E+04	0.0	0.1000E+01	0.78924E+02	0.75000E+02	0.30249E+01	1.052	0.1733E+01	0.2081E-01

MIN SQUARES AFTER 4 ITERATIONS IS 0.0329718E+01

(END OF 0.6329717E+01)

JG AFTER 4 ITERATIONS IS 0.2182655E+02

	SD	FSDC ¹⁰⁰	INITIAL ESTIMATE	MIN	MAX
ADJUSTABLE PARAMETERS					
U1 5.0 11.0 0.2664822E+02	0.0000E+00	0.2690E+00	0.1771808E-03	0.0	0.10000E+01
U2 5.0 11.0 0.2263775E+02	0.0000E+00	0.5740E+00	0.7071152E-02	0.0	0.10000E+01
U3 5.0 11.0 0.2344824E+03	0.0000E+00	0.4383E+02	0.1399999E+00	0.0	0.10000E+01
U4 5.0 11.0 0.2262154E+03	0.0000E+00	0.1400E+01	0.9800000E+02	0.0	0.10000E+03
U5 5.0 11.0 0.2167151E+00	0.0000E+00	0.2749E+00	0.1000000E+00	0.0	0.999999E+02

S 1 5.0 11.0 0.2263775E+02 0.0000E+00 0.4383E+02 0.1399999E+00 0.0 0.10000E+03

CORRELATION MATRIX

COLUMN	1	2	3	4	5	6
ROW 1	1.00	0.69	0.26	0.91	0.70	-0.28
ROW 2	0.69	1.00	0.63	0.75	0.70	-0.00
ROW 3	0.26	0.63	1.00	0.33	0.75	-0.19
ROW 4	0.91	0.75	0.33	1.00	0.70	-0.14
ROW 5	0.70	0.70	0.75	0.70	1.00	-0.01
ROW 6	-0.28	-0.00	-0.19	-0.14	-0.01	1.00

FINAL VALUES
 SAMPLING OF 0.848741-IBM
 Ajuste de 2 Exponenciais - CROTONIMA(2)

8 51 25

PARAMETER VALUES

ADJUSTABLE PARAMETERS
 1 1 5 0 0 0.500000E+01 0.0
 2 1 5 0 0 0.200000E+02 0.0
 3 1 5 0 0 0.500000E+02 0.0
 4 1 5 0 0 0.500000E+02 0.0
 5 1 5 0 0 0.500000E+02 0.0
 6 1 5 0 0 0.500000E+02 0.0
 7 1 5 0 0 0.500000E+02 0.0
 8 1 5 0 0 0.500000E+02 0.0
 9 1 5 0 0 0.200000E+03 0.0
 10 1 5 0 0 0.200000E+03 0.0
 11 1 5 0 0 0.200000E+03 0.0
 12 1 5 0 0 0.200000E+03 0.0
 13 1 5 0 0 0.200000E+03 0.0
 14 1 5 0 0 0.200000E+03 0.0
 15 1 5 0 0 0.100000E+04 0.0
 16 1 5 0 0 0.100000E+04 0.0

DEPENDENT PARAMETERS

THETA
 1 1 5 0 0 0.500000E+01 0.0
 2 1 5 0 0 0.200000E+02 0.0
 3 1 5 0 0 0.500000E+02 0.0
 4 1 5 0 0 0.500000E+02 0.0
 5 1 5 0 0 0.500000E+02 0.0
 6 1 5 0 0 0.500000E+02 0.0
 7 1 5 0 0 0.500000E+02 0.0
 8 1 5 0 0 0.500000E+02 0.0
 9 1 5 0 0 0.200000E+03 0.0
 10 1 5 0 0 0.200000E+03 0.0
 11 1 5 0 0 0.200000E+03 0.0
 12 1 5 0 0 0.200000E+03 0.0
 13 1 5 0 0 0.200000E+03 0.0
 14 1 5 0 0 0.200000E+03 0.0
 15 1 5 0 0 0.100000E+04 0.0
 16 1 5 0 0 0.100000E+04 0.0

FIXED PARAMETERS

QC
 1 1 5 0 0 0.500000E+01 0.0
 2 1 5 0 0 0.200000E+02 0.0
 3 1 5 0 0 0.500000E+02 0.0
 4 1 5 0 0 0.500000E+02 0.0
 5 1 5 0 0 0.500000E+02 0.0
 6 1 5 0 0 0.500000E+02 0.0
 7 1 5 0 0 0.500000E+02 0.0
 8 1 5 0 0 0.500000E+02 0.0
 9 1 5 0 0 0.200000E+03 0.0
 10 1 5 0 0 0.200000E+03 0.0
 11 1 5 0 0 0.200000E+03 0.0
 12 1 5 0 0 0.200000E+03 0.0
 13 1 5 0 0 0.200000E+03 0.0
 14 1 5 0 0 0.200000E+03 0.0
 15 1 5 0 0 0.100000E+04 0.0
 16 1 5 0 0 0.100000E+04 0.0

SUM SQUARES AFTER 6 ITERATIONS IS 0.19249070E+02

CCMP 6 ITERATIONS IS 0.10929745E+01

SD

ADJUSTABLE PARAMETERS
 1 1 5 17 0.3367767E-03 0.00 0.3335018E-04
 1 1 5 21 0.1617112E-01 0.00 0.6436512E-02
 1 1 5 11 0.1611473E+02 0.00 0.1287677E+01
 1 1 5 21 0.9610000E+01 0.00 0.2619044E+01

INITIAL ESTIMATE

1 1 5 17 0.3335018E-04 0.0
 1 1 5 21 0.6436512E-02 0.0
 1 1 5 11 0.1287677E+01 0.0
 1 1 5 21 0.2619044E+01 0.0

MIN

1 1 5 17 0.3335018E-04
 1 1 5 21 0.6436512E-02
 1 1 5 11 0.1287677E+01
 1 1 5 21 0.2619044E+01

MAX

1 1 5 17 0.3335018E-04
 1 1 5 21 0.6436512E-02
 1 1 5 11 0.1287677E+01
 1 1 5 21 0.2619044E+01

CORRELATION MATRIX

CCUM 2 3
 1 1.00 0.51 0.46 -0.06
 2 0.51 1.00 0.45 0.25
 3 0.46 0.45 1.00 0.00
 4 -0.06 0.25 0.00 1.00

CROTAMITIN + FUSEOLIPASE

0.100000000	01	0.218417170	03
0.410000000	02	0.991085590	02
0.810000000	02	0.923369780	02
0.121000000	03	0.905206590	02
0.161000000	03	0.872881740	02
0.201000000	03	0.881575470	02
0.241000000	03	0.870740710	02
0.281000000	03	0.860301140	02
0.321000000	03	0.850233030	02
0.361000000	03	0.840515110	02
0.401000000	03	0.831143490	02
0.441000000	03	0.822091090	02
0.481000000	03	0.813547430	02
0.521000000	03	0.804899390	02
0.561000000	03	0.796732440	02
0.601000000	03	0.788635350	02
0.641000000	03	0.781195770	02
0.681000000	03	0.773802310	02
0.721000000	03	0.766644790	02
0.761000000	03	0.759710710	02
0.801000000	03	0.752992270	02
0.841000000	03	0.746479330	02
0.881000000	03	0.740162950	02
0.921000000	03	0.734034210	02
0.961000000	03	0.728005190	02
0.100100000	04	0.722307960	02
0.104100000	04	0.716695010	02
0.108100000	04	0.711239190	02
0.112100000	04	0.705933690	02
0.116100000	04	0.700771990	02
0.120100000	04	0.695747890	02
0.124100000	04	0.690855410	02
0.128100000	04	0.686088940	02
0.132100000	04	0.681443040	02
0.136100000	04	0.676912570	02
0.140100000	04	0.672492600	02
0.144100000	04	0.668178420	02
0.148100000	04	0.663965550	02
0.152100000	04	0.659849700	02
0.156100000	04	0.655826790	02
0.160100000	04	0.651892910	02
0.164100000	04	0.648044330	02
0.168100000	04	0.644277510	02
0.172100000	04	0.640589030	02
0.176100000	04	0.636975670	02
0.180100000	04	0.633434320	02
0.184100000	04	0.629962040	02

ABSTRACT

Phospholipase A, Crotopotin and Crotoxine were purified from the venom of *Crotalus durissus terrificus*. The amino acid compositions of proteins showed molecular weights 13400 for Phospholipase A, 8300 for Crotopotin and 4880 for Crotoxine. From Sephadex gel filtration (G-75 fine) experiments, stable complex is formed by interaction (1:1 molar ratio) of Phospholipase A ($LD_{50} = 0.55$ mg/Kg, in mice) and Crotopotin. Recombination of Crotopotin with Phospholipase A in 1:1 molar ratio, increases the toxicity of Phospholipase A approximately 10 fold to $LD_{50} = 0.05$ mg/Kg. These facts indicate Crotoxine as a product of 1:1 molar ratio interaction of Crotopotin and Phospholipase A. From Sephadex gel filtration (G-75 fine) experiments, unstable complex is formed by interaction of Crotopotin and Crotoxine ($LD_{50} = 0.8$ mg/Kg, in mice). The "in vitro" combination of Crotopotin and Crotoxine (1:1 molar ratio) increases the toxicity of Crotoxine approximately 4 fold to $LD_{50} = 0.2$ mg/Kg. In protein tritium-hydrogen exchange experiments, the back exchange kinetic of tritium labelled Phospholipase A, Crotopotin, Crotoxine and Crotoxine were measured in gel filtration columns of Sephadex G 25 "coarse". The best fit of experimental data of H/T exchange of Phospholipase A shows two clearly distinguishable kinetic classes of exchangeable hydrogens. From the exchangeable hydrogens only 68% were rapidly exchanged and the occurrence of hydrogens involved in alpha-helix was practically absent. The Crotopotin has no hydrogens of alpha-helix and 83% of exchangeable hydrogens were rapidly exchanged with solvent. The H/T exchange kinetics of Crotoxine, after a initial heating in tritiated water at $70^{\circ}C$ for 2 hours, showed that 31% of exchangeable hydrogens were slowly exchanged with solvent. Increasing the initial heating to 18 hours, the number of slowly exchanging protons diminished for 11%. Fitting curves of experimental data of H/T exchange of Crotoxine showed three exponential classes of exchangeable hydrogens and about 26 protons have alpha-helix characteristic exchange rate. These facts suggest a possible conformational change after Phospholipase A-Crotopotin interaction.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

1. ACKERS, G. K. & THOMPSON, T. E. Determination of stoichiometry and equilibrium constants for reversibly association systems by molecular sieve chromatography. *Proc. natn. Acad. Sci. USA*, 53:342, 1965.
2. BRAY, G. A. A simple efficient liquid scintillation method for counting aqueous solutions in a liquid scintillation counter. *Analyt. Biochem.*, 1:279-85, 1960.
3. BREITHAUPT, H. Enzymatic characteristics of crotalus phospholipase A₂ and the crotoxine complex. *Toxicon*, 14:221, 1976.
4. BREITHAUPT, H.; OMORI-SATOH, T.; LANG, J. Isolation and characterization of three phospholipases A from the crotoxine complex. *Biochim. biophys. Acta*, 403:355-69, 1974.
5. BREITHAUPT, H.; RUBSAMEN, K.; HABERMANN, E. Biochemistry and pharmacology of crotoxine complex. *Eur. J. Biochem.*, 49:333-45, 1974.
6. BROWNE, C. A. & WALEY, S. G. Studies of triose phosphate isomerase by hydrogen exchange. *Biochem. J.*, 141:753-60, 1974.
7. BUDZYNSKI, A. Z. Difference in conformation of fibrinogen degradation products as revealed by hydrogen exchange and spectropolarimetry. *Biochim. biophys. Acta*, 229:663-71, 1971.
8. BUDZYNSKI, A. Z. & FRAENKEL - CONRAT, H. Hydrogen exchange as a probe of conformation to tobacco mosaic virus and its coat protein. *Biochemistry (New York)*, 9(17):3301-9, Aug. 1970.

(*) As referências bibliográficas relativas a documentos localizados pelo IEA foram revistas e enquadradas na NB-66 de ABNT.

9. CAMBIASO, C. L.; RETEGUI, L. A.; DELLACHA, J. M.; SANTOMÉ, J. A.; PALADINI, A. C. H-exchange behaviour and extent of reversible conformation charges in human, bovine, ovine, porcine and equine growth hormones. *Biochim. biophys. Acta*, 221:290-6, 1970.
10. CHEYMOL, J.; GONÇALVES, J. M.; BOURILLET, F.; ROUCH – ARVEILLER, M. Action neuromusculaire comparée de la crotamine et du venin de "Crotalus durissus terrificus" var. crotaminicus. *Toxicon*, 9:279, 1971.
11. CUATRECASAS, P. & HOLLEMBERG, M. D. Membrane receptors and hormone action. *Adv. Protein Chem.*, 30:251, 1976.
12. DAVIS, B. J. Disc electrophoresis. II. Method and application to human serum proteins. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 121:404, 1964.
13. DAWSON, R. M. C. On the mechanism of action of phospholipase A. *Biochem. J.*, 88:414, 1963.
14. DOWNER, N. W. & ENGLANDER, S. W. Hydrogen exchange study of membrane-bound rhodopsin. I. Protein structure. *J. biol. Chem.*, 252(22):8092-100, Nov. 1977.
15. DOWNER, N. W. & ENGLANDER, S. W. Hydrogen exchange study of membrane-bound rhodopsin. II. Light-induced protein structure change. *J. biol. Chem.*, 252(22):8101-4, Nov. 1977.
16. EIGEN, M. Proton transfer, acid-basic catalysis, and enzymatic hydrolysis. *Angew. Chem.*, 3:1, 1964.
17. EIGEN, M.; KUSE, W.; MAASS, G.; DEMAAYER, L. Rate constants of protolytic reactions in aqueous solution. *Prog. React. Kinet.*, 2:285, 1963.
18. ELLIS, L. M.; BLOOMFIELD, V. A.; WOODWARD, C. K. Hydrogen – tritium exchange kinetics of soybean trypsin inhibitor (Kunitz). Solvent accessibility in the folded conformation. *Biochemistry (New York)*, 14(15):3413-9, Jul. 1975.
19. ELLMAN, G. L. Tissue sulphhydryl groups. *Archs Biochem. Biophys.*, 82:70-7, 1959.
20. ENGLANDER, S. W. A hydrogen exchange method using tritium and Sephadex: its application to ribonuclease. *Biochemistry (New York)*, 2:798-803, 1963.
21. ENGLANDER, S. W. & CROWE, D. Rapid microdialysis and Lydogen exchange. *Analyt. Biochem.*, 12:579-84, 1965.
22. ENGLANDER, S. W. & ENGLANDER, J. J. Hydrogen exchange studies of sRNA. *Proc. natn Acad. Sci. USA*, 53:370, 1975.
23. ENGLANDER, S. W. & MAUEL, C. Hydrogen exchange studies of respiratory proteins. II. Detection of discrete, ligand – induced changes in hemoglobin. *J. biol. Chem.*, 247(8):2387-94, Apr. 1972.
24. ENGLANDER, S. W. & POULSEM, A. Hydrogen-tritium exchange of the random chain polypeptide. *Biopolymers*, 7:379, 1969.
25. ENGLANDER, S. W. & ROLFE, A. Hydrogen exchange studies of respiratory proteins. III. Structural and free energy changes in hemoglobin by use of a difference. *J. biol. Chem.*, 248(13):4852-61, Jul. 1973.
26. ENGLANDER, S. W. & STALLEY, R. Measurement of the free and the H-bonded amides of myoglobin. *J. molec. Biol.*, 45:277-95, 1969.

27. ENGLANDER, S. W.; DOWNER, N. W.; TEITELBAUM, H. Hydrogen exchange. *A. Rev. Biochem.*, 41:903, 1972.
28. FAIRCLOUGH JR., G. F. & FRUTON, J. S. Peptide-protein interaction as studied by gel filtration. *Biochemistry (New York)*, 5(2):673-83, Feb. 1966.
29. FRAENKEL-CONRAT, H. & SINGER, B. Fractionation and composition of crotoxin. *Archs Biochem. Biophys.*, 60:64-73, 1956.
30. GALARDY, R. E.; CRAIG L. C.; PRINTZ, M. P. Tritium – hydrogen exchange of the cyclic peptide polymyxin B₁. *Biochemistry (New York)*, 13(8):1674-7, Apr. 1974.
31. GONÇALVES, J. M. *Estudos sobre crotamina*. Ribeirão Preto, 1961. (Tese de doutoramento).
32. CONÇALVES, J. M. Purification and properties of crotamine. In: BUCKLEY, E. E. & PORGES, N., eds. *Venoms*. Washington, D. C., A. A. A. S., 1956. p.261.
33. GONÇALVES J. M. & DEUTSCH, H. F. Ultracentrifugal and zone electrophoresis studies of some Crotalidae venoms. *Archs Biochem. Biophys.*, 60:402-11, 1956.
34. 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. I.s.n.t. I. p.170.
35. GONÇALVES, J. M. & POLSON, A. The electrophoretic analysis of snake venoms. *Archs Biochem.*, 13:253-9, 1947.
36. GONÇALVES, J. M. & VIEIRA, L. G. Estudos sobre veneno de serpentes brasileiras. I. Análise eletroforética. *Anais Acad. bras. Cienc.*, 22(1):141-9, mar. 1950.
37. GRALÉN, N. & SVEDEBERG, T. The molecular weight crotoxin. *Biochem. J.*, 32:1375, 1938.
38. GREENWOOD, F. C.; HUNTER, W. H.; GLOVER, J. S. The preparation of ¹³¹I labelled human growth hormone of high specific radioactivity. *Biochem. J.*, 89:114-23, 1963.
39. HABERMANN, E. Gewinnung und Eigenschaften von Crotoxin, Phospholipase A, Crotamin und Toxin III aus dem Gift der Brasilianischen Klapperschlange. *Biochem. Z.*, 329:405, 1957.
40. HABERMANN, E. & NEUMANN, W. P. Crotoxin, ein neues Pharmakologisches Wirkprinzip aus dem Gift von "Crotalus terrificus". *Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Path. Pharmacol.*, 228:217, 1956.
41. HABERMANN, E. & NEUMANN, W. P. Die Hemmung der Hitzekoagulation von Eigelb durch Bienengift – ein Phospholipase – Effect. *Hoppe – Seyler's. Z. physiol. Chem.*, 296:179, 1954.
42. HABERMANN, E.; WALSCH, P.; BREITHAUPT, H. Biochemistry and pharmacology of the crotoxin complex. *Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Path. Pharmacol.*, 273:313, 1972.
43. HADLER, W. A. & VITAL BRAZIL, O. Pharmacology of crystalline crotoxin IV. Nephrotoxicity. *Mems Inst. Butantan*, 33:1001, 1966.
44. HAMPE, O. G. & GONÇALVES, J. M. Optical rotatory dispersion of crotamine: effect of denaturants. *Polymær*, 17:638, 1976.

45. HAMPE, O. G. & GONÇALVES, J. M. Optical rotatory dispersion of croptamine: effect of denaturants. *Toxicon*, 1978.
46. HARTLEY, R. W. & SMEATON, J. R. On the reaction between the extracellular ribonuclease of *Bacillus amyloliquefaciens* (Barnase) and its intracellular inhibitor (Barstar). *J. biol. Chem.*, 248(16):5624-6, Aug. 1973.
47. HENDON, R. A. & FRAENKEL-CONRAT, H. Biological roles of the two components of crotoxin. *Proc. natn. Acad. Sci. U.S.A.*, 68:1560, 1971.
48. HENDON, R. A. & FRAENKEL-CONRAT, H. The roles of complex formation in the neurotoxicity of crotoxin components A and B. *Toxicon*, 14:283, 1976.
49. HORST, J.; HENDON, R. A.; FRAENKEL-CONRAT, H. The active components of crotoxin. *Biochem. biophys. Res. Commun.*, 46(3):1042-7, 1972.
50. HUMMEL, J. P. & DREYER, W. J. Measurement of protein - binding phenomena by gel filtration. *Biochim. biophys. Acta*, 63:530, 1962.
51. HVIDT, A. Deuterium exchange between ribonuclease and water. *Biochim. biophys. Acta*, 18:307, 1955.
52. HVIDT, A. The deuterium exchange of lysozyme as followed by an infrared spectrophotometric method. *C. r. Trav. Carlsberg*, 33:475, 1963.
53. HVIDT, A. & KANAREK, L. The deuterium exchange of lysozyme as followed by the gradient method. *C. r. Trav. Carlsberg*, 33:463, 1963.
54. HVIDT, A. & NIELSEN, S. Hydrogen exchange in proteins. *Adv. Protein Chem.*, 21:287, 1966.
55. JENG, T. W. & FRAENKEL-CONRAT, H. Activation of crotoxin B by volvation A₂. *Biochem. biophys. Res. Commun.*, 70(4):132-9, Jun. 1976.
56. KELLET, G. L. The study of interacting protein systems by molecular sieve chromatography. *Lab. Pract.*, 16(7):857-62, 1967.
57. LAIKEN, S. L. & PRINTZ, M. P. Kinetic class analysis of hydrogen - exchange data. *Biochemistry (New York)*, 9(7):1547-53, Mar. 1970.
58. LAURE, C. J. Die Primärstruktur des Croptamins. *Hoppe - Seyler's Z. physiol. Chem.*, 356:213, 1975.
59. LAURE, C. J.; COUTINHO NETO, J.; GONÇALVES, J. M. Obtenção de croptaminas e sua quantificação. *Cienc. Cult. (S. Paulo)*, 23(Supl.):313-4, jun. 1971.
60. LI, C. H. & FRAENKEL-CONRAT, H. Electrophoresis of crotoxin. *J. Am. chem. Soc.*, 64(7):1586-8, Jul. 1942.
61. LINDERSTROM-LANG, K. The pH dependence of deuterium exchange of insulin. *Biochim. biophys. Acta*, 18:308, 1955
62. LOWRY, O. H.; ROSEBOUGH, N. J.; FARR, L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. biol. Chem.*, 193:265, 1951.
63. MARCIANI, D. J. & TOLBERT, B. M. Structural damage in γ -irradiated lysozyme. *Biochim. biophys. Acta*, 351:387-95, 1974.

64. NAKANISHI, M.; TSUBOI, M.; IKEGAM, A. Fluctuation of the lysozyme structure. *J. molec. Biol.*, 70:351-61, 1972.
65. NAKAZONE, A. K. *Aspectos imunquímicos da crotoxina e suas subunidades*. São Paulo, 1978. (Tese de doutoramento).
66. NAKAZONE, A. K.; ROGERO, J. R.; GONÇALVES, J. M. Caráter imunológico e potenciador da crotapotin. In: IIº REUNION regional de la Asociación de Sociedades Americanas de Bioquímica (PAABS), Córdoba, Argentina, 2 a 4 de novembro de 1977. (Res., nº 179).
67. NAKAZONE, A. K.; ROGERO, J. R.; GONÇALVES, J. M. Potenciação da crotamina pela interação com crotapotin. In: 6º ENCONTRO anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica, Caxambú, 20 a 23 abril, 1977. (Res., nº 79).
68. NEUMANN, W. P. & HABERMANN, E. Uber Crotoactin, das Haupttoxin des Giftes der Brasilianischen Klapperschlanger (*crotalus durissus terrificus*). *Biochim. Z.*, 327:170, 1955.
69. PAIVA, T. B.; PAIVA, A. C. M.; SCHERAGA, A. H. The conformation of angiotensin II in aqueous solution. *Biochemistry (New York)*, 2(6):1327-34, Nov. 1963.
70. PARADIES, H. H. & BREITHAUPT, H. On the subunit structure of crotoxin: hydrodynamic and shape properties of crotoxin, phospholipase A and crotapotin. *Biochim. biophys. Res. Commun.*, 66:496, 1975.
71. PIETERSON, W. A.; VIDAL, J. C.; VOLWERK, J. J.; HAAS, G. H. de Zymogen-catalyzed hydrolysis of monomeric substrates and the presence of a recognition site for lipid-water interfaces in phospholipase A₂. *Biochemistry (New York)*, 13(7):1455-60, Mar. 1974.
72. PIETERSON, W. A.; VOLWERK, J. J.; HAAS, G. H. de Interaction of phospholipase A₂ and its zymogen with divalent metal ions. *Biochemistry (New York)*, 13(7):1439-45, Mar. 1974.
73. PRINTZ, M. P. & HIPPEL, P. H. von Hydrogen exchange studies of DNA structure. *Proc. natn. Acad. Sci. U.S.A.*, 53:363, 1965.
74. REED, L. J. & MUENCH, H. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *Am. J. Hyg.*, 27:493, 1937.
75. ROGERO, J. R.; NAKAZONE, A. K.; GONÇALVES, J. M. Interação de crotapotin com fosfolipase A e crotamina. In: IIº REUNION regional de la Asociación de Sociedades Americanas de Bioquímica (PAABS), Córdoba, Argentina, 2 a 4 de novembro de 1977. (Res., nº 178).
76. ROHOLT, O. A. & SCHLAMOWITZ, M. Studies of the use of dihexanoyllecithins as substrates for phospholipase A. with addendum on aspects of micelle properties of dihexanoyllecithin. *Archs Biochem. Biophys.*, 94:364-79, 1961.
77. ROSENBERG, A. & CHAKRAVARTI, K. Studies of hydrogen exchange in proteins. I. The exchange kinetics of bovine carbonic anhydrase. *J. biol. Chem.*, 243(19):5193-201, Oct. 1968.
78. RUBSAMEN, K.; BREITHAUPT, H.; HABERMANN, E. Biochemistry and pharmacology of the crotoxin complex. *Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Path. Pharmacol.*, 270:274, 1971.
79. SIMIZU, K. *Ação do ácido β-bromopirúvico sobre aldolase de frutose 1,6 difosfato de músculo estriado de coelho*. São Paulo, 1972. (Tese de doutoramento).
80. SLOTTA, C. H. & FRENKEL-CONRAT, H. Purificação e cristalização do veneno de cobra cascavel. *Mems Inst. Butantan*, 12:505, 1938-1939.

81. VITAL BRAZIL, O. Pharmacology of crystalline crotoxin. II. Neuromuscular blocking action. *Mems Inst. Butantan*, 33:981, 1966.
82. VITAL BRAZIL, O.; FARINA, R.; YOSHIDA, L.; OLIVEIRA, V. A. Pharmacology of crystalline crotoxin. III. Cardiovascular and respiratory effects of crotoxin and "Crotalus durissus terrificus" venom. *Mems Inst. Butantan*, 33:993, 1966.
83. VITAL BRAZIL, O.; FRANCESCHI, J. P.; WAISBICH, E. Pharmacology of crystalline crotoxin. I. Toxicity. *Mems Inst. Butantan*, 33:973, 1966.
84. WELCH JR., W. H. & FASMAN, G. D. Hydrogen-tritium exchange in polypeptides. Models of α -helical and conformations. *Biochemistry (New York)*, 13(12):2455-66, Jun. 1974.
85. WELLS, M. A. Effect of pH on the kinetic and spectral properties of "Crotalus adamantus" phospholipase A₂ in H₂O and D₂O. *Biochemistry (New York)*, 13(11):2265-8, May 1974.
86. WELLS, M. A. A kinetic study of the phospholipase A₂ (Crotalus adamanteus) catalyzed hydrolysis of 1,2-Dibutyl-sn-glycero-3-phosphorylcholine. *Biochemistry (New York)*, 11(6):1030-41, Mar. 1972.
87. WICKETT, R. R.; IDE, G. J.; ROSENBERG, A. A hydrogen-exchange study of lysozyme conformation changes induced by inhibitor binding. *Biochemistry (New York)*, 13(16):3273-7, Jul. 1974.
88. WILLUMSEN, L. Hydrogen-deuterium exchange studies on chymotrypsinogen A, alpha - chymotrypsin, and diisopropylphosphoryl-alpha-chymotrypsin. *C. r. Trav. Lab. Carlsberg*, 36:227, 1968.
89. WOLWERK, J. J.; PIETERSON, W. A.; HAAS, G. H. de Histidine at the active site of phospholipase A₂. *Biochemistry (New York)*, 13(7):1446-54, Mar. 1974.
90. WOODWARD, C. K. & ELLIS, L. M. Hydrogen exchange kinetics changes upon formation of the soybean trypsin inhibitor - trypsin complex. *Biochemistry (New York)*, 14(15):3419-23, Jul. 1975.
91. WOODWARD, C. K. ELLIS, L. M.; ROSENBERG, A. Solvent accessibility in folded proteins: studies of hydrogen exchange in trypsin. *J. biol. Chem.*, 250(2):432-9, Jan. 1975.



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