

# PURIFICAÇÃO E RADIOIODAÇÃO DA GIROXINA (TOXINA SEMELHANTE À TROMBINA) DO VENENO DE CROTALUS DURISSUS TERRIFICUS.

Maria A.P. Camillo; Paulo C. Arruda Paes; Maria Teresa C.P. Ribela e José Roberto Rogero.

Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares - IPEN-CNEN/SP  
Caixa Postal 11049  
05422-970, São Paulo, Brasil

## RESUMO

Os venenos de serpentes têm atraído especial atenção em pesquisas por serem ricos em compostos bioativos, constituírem ferramentas de estudo de inúmeros processos fisiológicos e serem importante fonte de medicamentos.

Algumas enzimas semelhantes à trombina são utilizadas em testes laboratoriais e como agentes terapêuticos; no entanto, parece estar associado a elas uma síndrome neurotóxica denominada "rolamento em barril" cujo mecanismo é desconhecido. Estudos farmacocinéticos e de biodistribuição destas toxinas podem contribuir para esclarecer este mecanismo e, conseqüentemente, auxiliar na elaboração de indicações clínicas mais seguras, detalhando as precauções que deverão ser tomadas frente aos possíveis efeitos colaterais.

O presente trabalho apresenta a primeira etapa destes estudos com a giroxina (toxina semelhante à trombina) do veneno de Crotalus durissus terrificus. São apresentados os esquemas de purificação, método de radioiodação e controle de pureza das toxinas nativa e iodada.

## I. INTRODUÇÃO

Os estudos dos venenos de animais peçonhentos têm proporcionado um grande avanço no conhecimento de mecanismos de diversos sistemas fisiológicos. As atividades coagulantes e neurotóxicas dos venenos são específicas e podem ser ferramentas poderosas nos estudos dos mecanismos da coagulação sanguínea e dos estímulos nervosos, podendo agir direta ou indiretamente. O conhecimento da estrutura e mecanismo de ação dessas substâncias podem auxiliar na compreensão do papel de outras com ações similares, e fundamentais para a manutenção de fenômenos de importância vital. Estes conhecimentos possibilitam utilizar componentes isolados de venenos em clínica médica, no tratamento de diversas patologias e como reagentes para diagnóstico [ 1 ]. Um exemplo são as enzimas semelhantes à trombina utilizadas como agentes trombolíticos, pois abaixam rapidamente o nível plasmático do fibrinogênio (até menos de 40 mg/100ml), não provocam sangramento extensivo, promovem rápida involução de sinais e sintomas mesmo em pacientes que não respondem à terapia convencional, não são inibidas por heparina e não afetam outros fatores da coagulação. Nos testes para análises clínicas destaca-se a Reptilase R, que tem sido usada para a determinação do tempo de coagulação do plasma (tempo de reptilase) apresentando maior estabilidade que a trombina e

indicação nas situações em que o tempo de trombina está prolongado.

Em 1988, Alexander et al. [ 2 ] estudando a enzima semelhante à trombina do veneno de Crotalus durissus terrificus observou que esta enzima era a mesma toxina descrita por Barrio et al. [ 3 ] como uma neurotoxina, que este denominou giroxina. Esta toxina, quando injetada em camundongos via intraperitoneal ou endovenosa, é responsável por uma efeito neurotóxico que inicia com uma hiperreflexia seguida de hipoatividade progressiva, opistotonos, perda de reflexos e um rolamento sobre o eixo longitudinal do corpo. Este comportamento pode ser denominado "rolamento em barril" e também é observado para outras moléculas, algumas endógenas, tais como a vasopressina e a oxitocina, e outras sintéticas, como SMS201-995 [ 4; 5 ]. Não se sabe se a giroxina atravessa a barreira hematoencefálica tendo um alvo no sistema nervoso central ou se atua indiretamente liberando estas substâncias endógenas. Por outro lado, sua atividade enzimática semelhante à trombina tem levado alguns autores a proporem que sua ação se deva à liberação de um produto neurotóxico originado de substrato endógeno, provavelmente presente na corrente circulatória [ 2 ]. Recentemente, os resultados obtidos no método *in vitro* de liberação de neurotransmissores tritiados de tecido estriatal de rato [ 6 ] corroboraram com a hipótese de ação indireta, pois a presença da toxina no sistema não induziu alterações

no padrão normal de liberação de [<sup>3</sup>H]dopamina e [<sup>3</sup>H]acetilcolina.

Os processos fisiológicos que desencadeiam este comportamento neurotóxico, assim como o mecanismo de ação destas toxinas, ainda são desconhecidos. Logo, estudos de farmacocinética e principalmente de biodistribuição usando traçadores radioativos podem trazer algumas respostas, contribuindo para um melhor conhecimento de possíveis efeitos colaterais e permitindo a elaboração de indicações clínicas mais segura destas toxinas ou de seus derivados.

Neste trabalho são apresentados o esquema de isolamento da gioxina (ou enzima semelhante à trombina) do veneno de *Crotalus durissus terrificus*, o método de radioiodação e o controle de pureza das formas nativa e iodada.

## II PARTE EXPERIMENTAL

**Isolamento da gioxina.** O isolamento da toxina foi feito em duas etapas. Inicialmente, 100 mg de veneno foram dissolvidos em 3 ml de tampão formiato de amônio 100mM, pH 3,0 e centrifugados por 5 min a 13000 rpm. O sobrenadante apresentou 97 mg de proteína e foi fracionado em coluna (2,3 x 95 cm) de Sephadex G.100, no mesmo tampão, com fluxo de 15 ml/h, tendo-se coletado frações de 1,9 ml. O perfil de eluição foi registrado por absorvância em 280 nm (Figura 1).

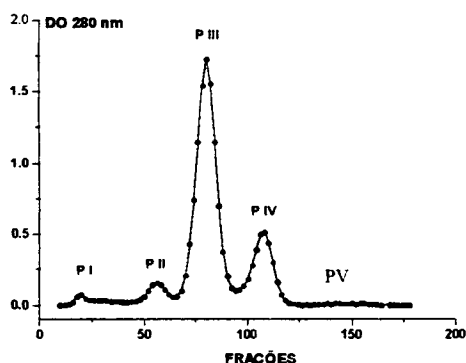


Figura 1- Perfil cromatográfico em gel filtração (Sephadex G-100) do veneno de *Crotalus durissus terrificus*

**Ensaio *in vivo*.** O ensaio consiste na injeção endovenosa, em camundongos, da solução de toxina e registro da atividade neurotóxica, ou seja, observação da síndrome de "rolamento em barril" (descrito anteriormente).

A identificação das frações de interesse foi por este teste. Os tubos que apresentaram esta atividade na Figura 1 estão no pico PII. Foram reunidas estas frações de diversas cromatografias, dialisadas contra tampão Tris-HCl 100 mM com 500 mM NaCl, pH 8,5 e submetidas a coluna de afinidade Benzamidina-Sepharose 6B (Pharmacia) com 25 ml de gel ligante. Utilizou-se o fluxo de 12 ml/h, sendo coletadas frações de 2 ml. A eluição das frações ligadas foi feita pela troca do tampão para acetato de sódio 100 mM

com 500 mM NaCl, pH 4,5 (a partir do tubo 60). As frações com a atividade de gioxina foram identificadas no terceiro pico (P3) (Figura 2).

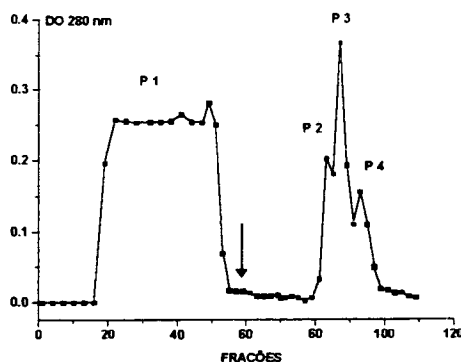


Figura 2- Perfil cromatográfico em coluna de afinidade com Benzamidina-Sepharose 6B da fração gioxina de *Crotalus durissus terrificus*.

O acompanhamento da recuperação em cada etapa e a determinação da concentração protéica nos picos foram feitos pelo método de Lowry modificado [ 7 ] e por integração das áreas (TABELA 1).

TABELA 1- Proporção expressa por conteúdo protéico e integração das áreas dos picos dos perfis cromatográficos.

	Proteína (%)	Integração das áreas dos picos (%)
Gel filtração (Sephadex G100)		
PICO I	4,6	4,9
PICO II	3,0	6,0
PICO III	66,9	64,2
PICO IV	14,1	19,8
PICO V	8,8	5,1
Afinidade (Benzamidina-Sepharose 6B)		
PICO 1	86,3	76,1
PICO 2+3	9,9	16,0
PICO 4	3,8	7,9

**Iodação.** A radioiodação foi feita segundo Ribela et al.1993 [ 8 ]. Resumidamente, a 26 MBq de Na<sup>125</sup>I (2,3 µl) foram adicionados 5 µg de gioxina pura dissolvida em 30 µl de tampão fosfato de potássio 300 mM, pH 7,4 e 0,8 µg de cloramina T em 12 µl de tampão fosfato 50 mM, pH 7,4. A reação ocorreu à temperatura ambiente (27°C) durante 5 min; sendo adicionado então, 1 µg de metabissulfito de sódio em 5 µl do mesmo tampão 50 mM.

Para a purificação do traçador utilizou-se uma coluna (2.3 x 45 cm) de Sephadex G.100 eluída com tampão fosfato 50 mM contendo 1% de soro albumina bovina (Figura 3).

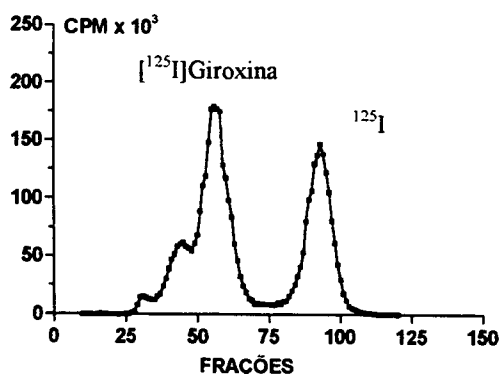


Figura 3 - Perfil de eluição em Sephadex G.100 da mistura de radioiodação da gioxina.

Nas marcações com iodo estável ( $\text{Na}^{127}\text{I}$ ) as concentrações das soluções e a proporção entre os reagentes foram mantidas. Entretanto, as quantidades utilizadas foram multiplicadas por 80 para possibilitar a realização do teste de neurotoxicidade *in vivo*. As iodações foram com 0,13  $\mu\text{g}$  e 3,5  $\mu\text{g}$  de  $\text{Na}^{127}\text{I}$  para cada 5  $\mu\text{g}$  de toxina.

**Análises.** Para verificar a pureza da toxina isolada utilizou-se o método de eletroforese em placas com gel de poliácridamida (EGPA) a 15%, não reduzido, e sistema descontínuo de tampões [9]. A revelação foi feita fixando-se o gel em ácido tricloroacético 12,5% e corando-o com Coomassie Brilliant Blue-R250 (Figura 4). Na análise da toxina radioiodada o gel foi cortado em segmentos de 5 mm e contado. (Figura 5). Neste caso correu-se paralelamente a toxina nativa como referência para a comparação dos pesos moleculares.

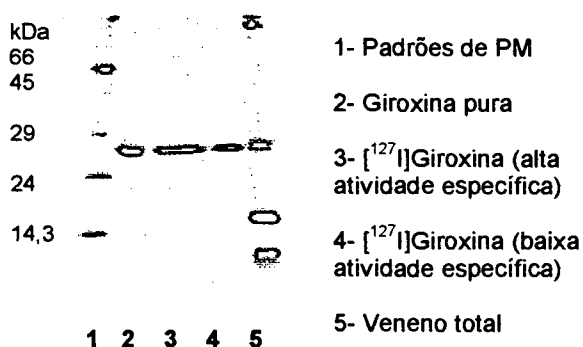


Figura 4. Análise em eletroforese, EGPA 15%, sistema não reduzido e descontínuo de tampões, das formas nativa e iodada da gioxina.

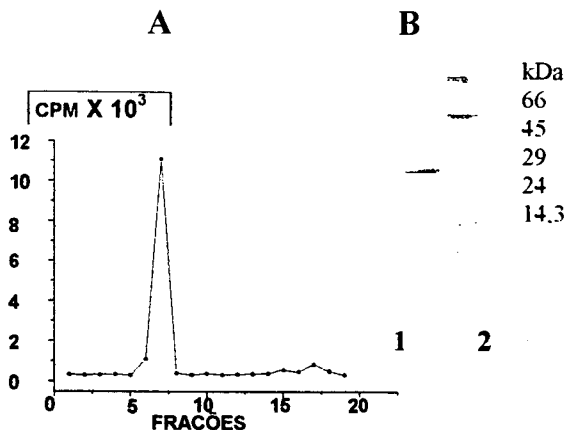


Figura 5- A: Perfil eletroforético da gioxina após radioiodação.

B: 1- gioxina padrão (não marcada) e 2- Padrões de pesos moleculares.

Para os ensaios *in vivo* com a toxina iodada (com  $\text{Na}^{127}\text{I}$ ), as amostras foram dialisadas contra solução fisiológica e concentradas em *centriprep 10* (Amicon).

O efeito neurotóxico ("rolamento em barril") foi observado para ambas as formas, nativa e iodada.

### III. DISCUSSÃO

A gioxina de *Crotalus durissus terrificus* é uma glicoproteína, portanto os processos de purificação e marcação foram desenvolvidos de forma a preservar sua estrutura glicídica, pois, as cadeias de açúcares quase sempre são importantes para a atividade biológica. Neste sentido, os testes *in vivo* foram essenciais para o acompanhamento de cada etapa dos métodos utilizados.

A purificação da toxina foi alcançada com duas cromatografias obtendo-se rendimento compatível com dados da literatura [2,3].

As análises em EGPA (Figura 4) e HPLC (resultado não apresentado) permitiram verificar a pureza da preparação e confirmar algumas características da molécula, tais como seu peso molecular (calculado em 28 kDa) e a cadeia peptídica única, sem subunidades. (este resultado foi confirmado na presença de  $\beta$ -mercaptoetanol 10% e uréia 8M).

O método de iodação escolhido utiliza condições suaves de marcação, com baixíssima concentração de cloramina T que, em geral, é o reagente responsável pelos danos ocorridos nas proteínas durante a reação. Também houve um aumento do tempo de reação em relação ao método clássico, permitindo obter bom rendimento (46%) e atividade específica (2,5 MBq/ $\mu\text{g}$ ) adequada para os ensaios futuros de toxicocinética e biodistribuição.

As condições utilizadas para o fracionamento da mistura de marcação foram eficientes para a separação do

traçador, fornecendo um marcado livre de iodo, de formas agregadas ou da própria soro albumina bovina usada como carregador. Este dado foi confirmado com a análise eletroforética, que permitiu calcular a pureza de [<sup>125</sup>I]giroxina em 94.4%. O marcado e a toxina nativa mantiveram as mesmas migrações relativas no gel, com estimativa de peso molecular calculado entre 28-29 kDa.

Os testes *in vivo* demonstraram que a iodação (com o isótopo estável) nas condições escolhidas, não interferiram com a atividade tóxica da proteína mesmo com alta atividade específica (1,6 a 2 átomos de iodo por molécula).

Concluindo, estes resultados dão confiabilidade para a utilização de [<sup>125</sup>I]giroxina como traçador nos ensaios de farmacocinética e biodistribuição, que são as próximas etapas deste projeto.

### REFERÊNCIAS

- [1] STOCKER, K.F. **Medical use of snake venom proteins**. CRC Press, Florida, 1990.
- [2] ALEXANDER, G.; GROTHUSEN, J.; ZEPEDA, H. & SCHWARTZMAN, R.J. **Gyroxin, a toxin from the venom of *Crotalus durissus terrificus*, is a thrombin-like enzyme**. *Toxicon*. 26 (10): 953 - 960, 1988.
- [3] BARRIO, A. **Gyroxin, a new neurotoxin of *Crotalus durissus terrificus* venom**. *Acta physiol. Latinoam.*, 11:224 .1961.
- [4] DE WIED, D.; DIAMANT, M. & FODOR, M. **Central Nervous System effects of the neurohypophyseal hormones and related peptides**. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 14(4):251-302, 1993.
- [5] LANDGRAJ, R. **Intracerebrally released vasopressin and oxytocin: measurement, mechanisms and behavioural consequences**. *J. Neuroendocrinol.*, 7:243-253, 1995.
- [6] CAMILLO, M.A.P.; TRONCONE, L.P.R. & ROGERO, J.R. **"In vitro" labelled neurotransmitters release for the study of neurotoxins**. Joint Nuclear Conferences, III ENAN, 7-11 Agosto, Águas de Lindóia, 1995.
- [7] MILLER, G.L. **Protein determination for large numbers of samples**. *Anal. Chem.*, 31(1-6): 964, 1959.
- [8] RIBELA, M.T.C.P.; MURATA, Y.; MORGANTI, L.; TONIOLO, D. & BARTOLINI, P. **The use of recombinant human growth hormone for radiodination and standard preparation in radioimmunoassay**. *J. Immunol. Meth.* 159:269-274, 1993.
- [9] LAEMMLI, U.K. **Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4**. *Nature* 227, 680-985, 1970.

### ABSTRACT

Snake's venoms have attracted special interest in research because they are rich in bioactive compounds, which are scientific tools to study many physiological processes and are also important source of new therapeutic agents.

Some thrombin-like enzymes are used as a reagent in laboratorial assays as well as in medical drugs. However, a neurotoxic syndrome called gyroxin syndrome or "barrel rotation" seems to be related to those enzymes. Pharmacokinetics and biodistribution studies of these toxins can contribute to clarify this mechanisms and, consequently, it will help to elaborate safer clinical prescriptions giving more information about possible nocive effects.

This paper describes the first step of these studies with the thrombin-like enzyme (or gyroxin) from *Crotalus durissus terrificus*'s venom. The purification and radioiodination methods as well as electrophoretic analysis and biological assay are presented.