



BR0443946



INIS-BR--3854

AUTARQUIA ASSOCIADA À UNIVERSIDADE  
DE SÃO PAULO

**ESTUDOS BIOQUÍMICO E FARMACOLÓGICO DAS  
CROTAMINAS NATIVA E IRRADIADA COM  
RADIAÇÃO GAMA DE  $^{60}\text{Co}$**

**MALVINA BONI MITAKE**

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

Orientador:  
Dr. José Roberto Rogero

**São Paulo  
2000**

**INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES**

**AUTARQUIA ASSOCIADA À UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**

**ESTUDOS BIOQUÍMICO E FARMACOLÓGICO DAS  
CROTAMINAS NATIVA E IRRADIADA COM  
RADIAÇÃO GAMA DE  $^{60}\text{Co}$ .**

**MALVINA BONI MITAKE**

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

**Orientador:  
Dr. José Roberto Rogero**

**São Paulo**

**2000**

## DEDICAÇÃO

Aos meus Pais, pelos seus esforços e exemplo de profundo respeito, e aos meus irmãos pelo amor e coragem demonstrado no exercício de nossas vidas.

Ao Nelson K. Mitake pelo amor, compreensão e paciência no sacrifício da espera.

## AGRADECIMENTOS

Toda tese, principalmente de natureza experimental, mesmo que tenha autor individual, não é, de fato, fruto de um trabalho isolado. Sem a colaboração de várias pessoas, teria sido impossível alcançar os resultados, ainda que modestos, atingidos neste trabalho.

Ao Professor Dr. José Roberto Rogero, pela orientação, confiança e disponibilidade dedicada a realização do presente trabalho.

À Professora Dra. Vera Sílvia Vassilieff, pelos ensinamentos, estímulo e amizade dedicada durante a realização desta pesquisa.

Ao Departamento de Bioengenharia e a Diretoria de Aplicações, IPEN, pela oportunidade concedida para a realização deste trabalho.

Ao Departamento de Radioproteção Ocupacional, e à Diretoria de Segurança Nuclear, IPEN, pelo apoio durante o período de realização deste trabalho.

Ao Bel. Fábio Fumio Suzuki pela realização dos cálculos farmacocinéticos.

Às Dra. Nanci Oguiura e Dra. Nanci do Nascimento pelas sugestões dadas no Seminário de Área.

A todos colegas do Grupo de Venenos, especialmente, à Helena Costa e Patrick Jack Spencer pelo apoio, incentivo e dedicação prestados no decorrer deste trabalho.

Ao Dr. Steven D. Aird pela ajuda na cromatografia por troca iônica.

À Dra. Maria Tereza P. de Carvalho Ribella pela realização da marcação das amostras de crotamina com  $^{125}\text{I}$  das amostras de crotamina.

Ao Dr. Michael P. Byrne pela realização do dicróismo circular.

Ao Dr. Harry Hines e Ernie Bruegerman pela realização da espectrometria de massa.

Ao Sr. Carlos Gaia da Silveira e à Bel. Elizabeth S. R. Somessari do Departamento de Aplicações na Engenharia e Indústria, IPEN, pela irradiação das amostras de crotamina.

Ao CNPq pela concessão das bolsas e auxílio à pesquisa.

A todos aqueles que, apesar de não terem sido mencionados individualmente, contribuíram para a realização deste trabalho.

**ESTUDOS BIOQUÍMICO E FARMACOLÓGICO DAS CROTAMINAS NATIVA E  
IRRADIADA COM RADIAÇÃO GAMA DE <sup>60</sup>CO.**

**Malvina Boni Mitake**

**RESUMO**

A radiação ionizante pode alterar a estrutura molecular e afetar as propriedades biológicas das moléculas. Este fato tem sido usado para atenuar toxinas animais. A crotamina é um polipeptídeo fortemente básico, constituída por 42 resíduos de aminoácidos, encontrada no veneno de cascavel sul-americana. Ela induz espasmos no músculo esquelético levando à paralisia espástica das patas posteriores de camundongos. Os objetivos desta tese foram a realização de estudos bioquímico e farmacológico da crotamina nativa e irradiada com <sup>60</sup>Co. A crotamina foi purificada do veneno de *Crotalus durissus terrificus* por meio de exclusão molecular em Sephadex G-100 seguida por cromatografia de troca iônica, usando um sistema FPLC. Ela foi irradiada na concentração de 2 mg/ml em NaCl 0,15 M com 2,0 kGy de radiação gama de <sup>60</sup>Co. As crotaminas nativa e irradiada foram avaliadas para caracterização bioquímica, atividade tóxica (DL<sub>50</sub>) e biodistribuição. As crotaminas foram marcadas com 29,6 MBq de <sup>125</sup>I usando o método da cloramina T, e separadas em uma coluna Sephadex G-50. Camundongos machos SWISS (35 ± 5 g), foram injetados i.p. com 0,1 mL (2,4x10<sup>6</sup> cpm/animal) de crotamina nativa <sup>125</sup>I ou com 0,4 mL (1,3x10<sup>6</sup> cpm/animal) de crotamina irradiada <sup>125</sup>I. Após 0,08; 0,25; 0,5; 1; 2; 4; 8; 12 e 24 horas os animais foram mortos por inalação com éter e o sangue, baço, fígado, rins, cérebro, pulmões, coração e músculo esquelético foram retirados para a determinação da radioatividade. Os resultados mostraram que a radiação não alterou o conteúdo protéico, o perfil eletroforético ou a estrutura primária da crotamina. No entanto, houve diferenças nos espectros de UV, dicroísmo circular e de massa. A radiação gama diminuiu a toxicidade da crotamina, mas não aboliu atividade biológica. Os estudos de biodistribuição mostraram que as crotaminas nativa e irradiada foram rapidamente absorvidas. Os resultados de biodistribuição indicaram que elas têm metabolismo hepático e eliminação renal. As crotaminas nativa e irradiada apresentaram afinidade por músculo esquelético e não atravessaram a barreira hematoencefálica.

## BIOCHEMICAL AND PHARMACOLOGICAL STUDIES OF NATIVE AND IRRADIATED CROTAMINE WITH GAMMA RADIATION OF $^{60}\text{Co}$ .

**Malvina Boni Mitake**

### ABSTRACT

Ionizing radiation can change the molecular structure and affect the biological properties of biomolecules. This has been employed to attenuate animal toxins. Crotonamine is a strongly basic polypeptide from the South American rattlesnake venom, composed of 42 amino acid residues. It induces skeletal muscle spasms leading to a spastic paralysis of hind limbs in mice. The objective of this thesis was to carry out biochemical and pharmacological studies of native and irradiated crotonamine with  $^{60}\text{Co}$ . Crotonamine was purified from *Crotalus durissus terrificus* venom by Sephadex G-100 gel filtration followed by ion exchange chromatography, using a Fast Performance Liquid Chromatography (FPLC) system. It was irradiated at 2 mg/ml in 0.15 M NaCl with 2.0 kGy gamma radiation emitted by a  $^{60}\text{Co}$  source. The native and irradiated crotonamine were evaluated by biochemical characterization, toxic activity ( $\text{LD}_{50}$ ) and biodistribution. The native and irradiated crotonamine were labelled with 29.6 MBq of  $^{125}\text{I}$  using chloramine T method, and separated in a Sephadex G-50 column. Male Swiss mice ( $35 \pm 5$  g), were injected i.p. with 0.1 mL ( $2.4 \times 10^6$  cpm/mouse) of  $^{125}\text{I}$  native crotonamine or with 0.4 mL ( $1.3 \times 10^6$  cpm/mouse) of  $^{125}\text{I}$  irradiated crotonamine. At 0.08; 0.25; 0.5; 1; 2; 4; 8; 12 and 24 hours the animals were killed by ether inhalation. Blood, spleen, liver, kidneys, brain, lungs, heart, and skeletal muscle were collected in order to determine radioactivity content. The results showed that gamma radiation did not change the protein concentration, the electroforetic profile or the primary structure of the protein, although differences were shown by spectroscopic techniques. The gamma radiation diminished the toxicity of crotonamine, but it did not abolish bioactivity. Biodistribution studies showed that native and irradiated crotonamine have hepatic metabolism and renal elimination. The native and irradiated crotonamine have affinity by skeletal muscle and they did not pass the blood - brain barrier.

**ABREVIACÕES DOS AMINOÁCIDOS**

<b>Aminoácido</b>	<b>Abreviação de 3 letras</b>	<b>Abreviação de 1 letra</b>
Alanina	Ala	A
Arginina	Arg	R
Asparagina	Asn	N
Ácido aspártico	Asp	D
Cisteína	Cys	C
Glutamina	Gln	Q
Ácido glutâmico	Glu	E
Glicina	Gly	G
Histidina	His	H
Isoleucina	Ile	I
Leucina	Leu	L
Lisina	Lys	K
Metionina	Met	M
Fenilalanina	Phe	F
Prolina	Pro	P
Serina	Ser	S
Tirosina	Tyr	Y
Treonina	Thr	T
Triptofano	Trp	W
Valina	Val	V

## SUMÁRIO

INTRODUÇÃO .....	1
OBJETIVOS .....	9
MATERIAL E MÉTODOS .....	10
1. Animais de experimentação .....	10
2. Drogas e reagentes utilizados .....	10
3. Estudo bioquímico das crotaminas nativa e irradiada .....	11
3.1. Purificação da crotamina .....	11
3.1.1. Dosagem protéica .....	11
3.1.2. Cromatografia de exclusão molecular .....	11
3.1.3. Recromatografia por troca iônica .....	11
3.1.4. Cromatografia de exclusão molecular de alto desempenho (HPSEC) .....	12
3.1.5. Cromatografia líquida de alto desempenho sob fase reversa (RP-HPLC) .....	12
3.2. Irradiação da crotamina .....	12
3.3. Dosagem protéica das crotaminas nativa e irradiada .....	13
3.4. Espectro de absorção em ultravioleta das crotaminas nativa e irradiada .....	13
3.5. Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) das crotaminas nativa e irradiada .....	13
3.6. Dicroísmo circular das crotaminas nativa e irradiada .....	14
3.7. Seqüenciamento de aminoácidos das crotaminas nativa e irradiada .....	14
3.8. Análise de aminoácidos das crotaminas nativa e irradiada .....	14
3.9. Espectrometria de massa das crotaminas nativa e irradiada .....	14
4. Estudo farmacológico das crotaminas nativa e irradiada .....	15
4.1. Teste de bioatividade das crotaminas nativa e irradiada .....	15
4.2. Determinação da atividade tóxica das crotaminas nativa e irradiada .....	16
4.3. Biodistribuição da crotamina nativa .....	16
4.3.1. Marcação da crotamina nativa com <sup>125</sup> I .....	16
4.3.1.1. Purificação da crotamina nativa radioiodada .....	16
4.3.2. Biodistribuição da crotamina nativa radioiodada .....	17
4.3.3. Marcação fria da crotamina nativa .....	18
4.3.4. Efeito farmacológico da crotamina nativa iodada .....	18
4.4. Biodistribuição da crotamina irradiada .....	18
4.4.1. Marcação com <sup>125</sup> I da crotamina irradiada .....	18
4.4.1.1. Purificação da crotamina irradiada radioiodada .....	19
4.4.2. Biodistribuição da crotamina irradiada radioiodada .....	19
5. Estatística .....	20
RESULTADOS .....	21
1. Purificação da crotamina .....	21
1.1. Dosagem protéica do veneno total .....	21
1.2. Cromatografia de exclusão molecular .....	21
1.3. Cromatografia por troca iônica .....	21
1.4. Cromatografia líquida de exclusão molecular de alto desempenho (SE-HPLC) .....	21
1.5. Cromatografia líquida de alto desempenho sob fase reversa (HPLC-RP) .....	21
2. Dosagem protéica das crotaminas nativa e irradiada .....	25
3. Espectro de absorção em UV das crotaminas nativa e irradiada .....	25
4. Eletroforese das crotaminas nativa e irradiada .....	26
5. Seqüenciamento de aminoácidos das crotaminas nativa e irradiada .....	26
6. Análise de aminoácidos das crotaminas nativa e irradiada .....	27
7. Dicroísmo Circular das crotaminas nativa e irradiada .....	27
8. Espectrometria de massa das crotaminas nativa e irradiada .....	28
9. Determinação da atividade tóxica das crotaminas nativa e irradiada .....	31
10. Teste de bioatividade das crotaminas nativa e irradiada .....	32

11. Marcação com $^{125}\text{I}$ da crotamina nativa.....	32
11.1. Purificação da crotamina nativa radioiodada.....	33
12. Biodistribuição das crotamina nativa radioiodada.....	34
13. Bioatividade da crotamina iodada.....	37
14. Marcação com $^{125}\text{I}$ da crotamina irradiada.....	37
14.1. Purificação da crotamina nativa radioiodada.....	37
15. Biodistribuição da crotamina irradiada.....	38
DISCUSSÃO.....	41
CONCLUSÕES.....	49
APÊNDICES.....	51
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	69

## INTRODUÇÃO

O estudo farmacológico dos venenos animais e de suas toxinas é da mais alta importância sob múltiplos aspectos. Somente através dele é possível adquirir conhecimento adequado da fisiopatologia dos envenenamentos e instituir medidas racionais e eficientes em seu tratamento. Além disso, tem revelado substâncias que vem contribuindo, de modo decisivo, para o esclarecimento de vários fenômenos fisiológicos e fisiopatológicos. Na realidade, certas toxinas são instrumentos de pesquisa indispensáveis para fisiologistas, farmacologistas e patologistas. O estudo farmacológico dos venenos animais tem ainda mostrado algumas substâncias promissoras em terapêutica, sendo possível que, no futuro, sua contribuição neste setor torne-se mais extensa e importante. Finalmente, o conhecimento da estrutura química e das ações farmacológicas das toxinas podem contribuir para esclarecer reações taxonômicas entre animais venenosos (Myers & Daly, 1976).

Os venenos animais, de uma maneira geral, são maus imunógenos e apresentam alta toxicidade (Tocker et al., 1990), ocasionando sérios problemas para quem entra em contato com estas toxinas.

As toxinas obtidas a partir de venenos de serpentes mostram-se diferentes de outras toxinas de origem animal, devido à sua complexidade bioquímica, e permanecem como um grande desafio para os cientistas do mundo todo (Iyanimura, 1991). Muitos conhecimentos sobre estas toxinas foram originados das extensivas pesquisas nas áreas biológica, química e farmacológica dos vários constituintes dos venenos de serpentes, embora alguns destes constituintes ainda careçam de melhor caracterização científica. Há cerca de 3000 espécies de serpentes no mundo e, dentre estas, somente 300 espécies são consideradas como venenosas (Cansdale, 1981; Jurecki, 1987). Sabendo-se que o conteúdo e a composição dos venenos de serpentes variam de espécie para espécie, pode-se inferir a extensão dos estudos que ainda devem ser realizados para que os conhecimentos científicos sobre os mesmos permitam a sua utilização como ferramenta de pesquisa e/ou com fins terapêuticos.

Vários especialistas estimam que anualmente ocorram cerca de 500000 picadas de serpentes venenosas no mundo e as mortes anuais resultantes são calculadas aproximadamente em 25000, ocorrendo mais freqüentemente entre crianças. Nas duas últimas décadas, a

bioquímica dos venenos tornou-se cada vez mais sofisticada. Atualmente começa-se a entender como uma quantidade minúscula de veneno causa rapidamente muitos danos podendo inclusive, matar um homem em minutos (Anderson, 1994).

As picadas de serpentes representam um sério problema médico, principalmente em países subtropicais, onde ainda causam altas taxas de mortalidade e morbidade. A cascavel sul-americana subordina-se ao gênero *Crotalus* e à espécie *durissus*, sendo atualmente reconhecidas várias subespécies na América do Sul dentre elas a *Crotalus durissus terrificus* (Vital Brazil, 1972). Ela tem sido responsável por 10% dos acidentes ofídicos no Brasil e, por apresentar alta toxicidade, acarreta um problema médico relevante para o país (Jorge & Ribeiro, 1992).

O veneno de cascavel vem sendo estudado desde longa data. Vital Brazil (1914), um dos pioneiros no estudo dos seus efeitos, já chamava a atenção para a sua eletividade pelo sistema nervoso. Este veneno encerra vários componentes farmacologicamente ativos, como: crotoxina, crotamina, convulxina, giroxina e delta-toxina (Vital Brazil, 1972). A crotoxina é o componente protéico prevalecente e responsável pela elevada toxicidade do veneno e várias de suas atividades já estão bem demonstradas. Esta toxina apresenta atividades tóxicas paralisantes, hemolíticas indiretas *in vitro* (Vital Brazil et al., 1966a) e miolíticas (Azevedo-Marques et al., 1987). A crotoxina pode causar morte por paralisia respiratória (Vital Brazil et al., 1983), no entanto, a maior parte dos óbitos ocorre devido a insuficiência renal aguda (Vital Brazil, 1980).

Sabe-se que as neurotoxinas interagem com o tecido nervoso e têm sido utilizadas como ferramenta farmacológica para estudos em neurociências (Mc Geer et al., 1986). Efeitos bloqueadores da crotoxina sobre a junção neuromuscular têm sido extensivamente estudados e o mecanismo de ação molecular proposto envolve tanto atividades pré (Vital-Brazil, 1966b, Gallacci, et al., 1998) como pós-sináptica (Bell & Biltonen, 1989).

Por sua vez, os estudos sobre as atividades cerebrais da crotoxina têm mostrado que, administração deste composto diretamente no hipocampo de ratos, induz efeitos neurotóxicos, como alterações neuropatológicas e padrões eletrográficos característicos de atividade epiléptica, os quais estão intimamente relacionados com os efeitos comportamentais observados (Moreira et al., 1992a).

A literatura descreve a presença de sítios ligantes específicos de alta afinidade para a crotoxina no cérebro (Degn et al., 1991), o que leva a pressupor a existência de efeito farmacológico deste composto no sistema nervoso central. Estudos de biodistribuição mostraram que a crotoxina marcada com  $^{131}\text{I}$  não atravessou a barreira hematoencefálica (Lomba, 1969). No entanto, Nascimento et al. (1998) mostraram que a crotoxina administrada intraperitonealmente foi detectada no cérebro. De fato, Moreira et al. (2000) mostraram que a crotoxina foi ansiogênica e o sistema GABA-benzodiazepínico estava envolvido neste efeito.

O tratamento eficaz nos acidentes ofídicos é a soroterapia, a injeção de quantidades empíricas de anticorpos, a partir da qual uma certa porcentagem é direcionada contra componentes do veneno. Embora a soroterapia tenha provado sua eficácia em reduzir a mortalidade e a morbidade de picadas de serpentes, ela também é responsável pelas reações alérgicas agudas e tardias, incidência que depende, principalmente, da quantidade de anticorpos heterólogos injetada e da pureza do antiveneno (Rivière et al., 1997). Torna-se importante a busca de tratamentos mais eficazes. Contudo, entre as várias dificuldades para a proposição de terapias alternativas, encontram-se as relacionadas ao pouco conhecimento das características biológicas dos demais componentes do veneno crotálico, uma vez que a maioria das pesquisas foram realizadas com a crotoxina. Além disso, seria importante um estudo de biodistribuição dos principais componentes farmacologicamente ativos do veneno, para otimizar a terapia do envenenamento.

Frente ao acima exposto, decidiu-se na presente pesquisa, estudar a crotamina.

A crotamina é uma toxina polipeptídica, fortemente básica ( $\text{pI}=10,3$ ), peso molecular 4870 daltons, composta por 42 resíduos de aminoácidos, sem grupos sulfidrila livres (Laure, 1975), firmemente reticulados por três pontes de dissulfeto, que conferem-lhe uma forma compacta e altamente resistente à temperatura, suportando aquecimento até  $60^\circ\text{C}$ , por 2 horas, em condições desnaturantes (uréia 8 M), sem perder sua conformação (Hampe & Gonçalves, 1976). Ela tem alto conteúdo de lisina (9 resíduos), baixo de arginina (2 resíduos) e não possui valina, treonina e alanina. O  $\text{NH}_2$  terminal é a tirosina e o  $\text{COOH}$  terminal é a glicina.

O veneno de *Crotalus durissus terrificus*, quanto à presença de crotamina, pode ser crotamina positivo e crotamina negativo. As serpentes que possuem venenos crotamina positivo são encontradas ao oeste do Estado de São Paulo e os crotamina-negativo, ao leste do Estado. Existe, porém, uma região híbrida no Estado de São Paulo, onde ocorrem os dois tipos

de veneno (Schenberg, 1959). Esse fenômeno foi também descrito para os venenos de *Crotalus durissus* procedentes de Mato Grosso e Mato Grosso do Sul (Silveira, 1990).

Estudos de espectroscopia com laser Raman realizados por Kawano et al. (1982) sugeriram a presença de  $\beta$ -estrutura e  $\alpha$  hélice com leve predominância da primeira forma. Utilizando métodos de titulação polarimétrica, Hampe et al. (1978) concluíram que a crotamina sofre alterações conformacionais com mudança de pH do meio. Foram identificados três isômeros: um isômero neutro (I) encontrado em valores de pH 4 a 8,5, correspondente à conformação nativa; um isômero ácido (II) ocorrendo em  $\text{pH} < 2$  e um isômero básico (III) encontrado em  $\text{pH} > 9,5$ . Tem sido demonstrado, com o método de SAXS (dispersão de Raio X de baixo ângulo), a ocorrência das alterações conformacionais com a mudança de pH, e a presença de uma forma molecular achatada ou alongada para a crotamina (Beltran et al., 1985).

A sequência primária da crotamina (Laure, 1975) exhibe um alto grau de homologia com miotoxinas, tais como: peptídeo C do veneno da *Crotalus viridis helleri* (Maeda et al., 1978); miotoxina a do veneno da *Crotalus viridis viridis* (Fox et al., 1979); miotoxinas I e II do veneno da *Crotalus viridis concolor* (Bieber et al., 1987); CAM toxina da *Crotalus adamanteus* (Samejima et al., 1991), toxina E da *Crotalus horridus horridus* (Allen et al., 1996), crotamina I-19 ( Dos Santos et al., 1993; Rádis-Baptista et al., 1999) conforme esquema abaixo:

	10	20	30	40	
YKQCHKKGGHCFPK	KEKICLPPSSDFGKMD	CRWRWKCKKGS			Crotamina
YKQCHKKGGHCFPK	KEKICLPPSSDFGKMD	CRWRWKCKKGS			Crotamina I-19
YKQCHKKGGHCFPK	KEKICLPPSSDLGKMD	CRWKWKCKKGS			Miotoxina <u>a</u>
YKRCHKKGGHCFPK	TVICLPPSSDFGKMD	CRWRWKCKKGS			Toxina <u>E</u>
YKRCHKKGGHCFPK	TVICLPPSSDFGKMD	CRWKWKCKKGS	VN		Peptídeo <u>C</u>
YKRCHKKGGHCFPK	TVICLPPSSDFGKMD	CRWKWKCKKGS	VN		Miotoxina I
YKRCHKKGGHCFPK	TEICTPPSSDFGKMD	CRWKWKCKKGS	VN		Miotoxina II
YKRCHKKGGHCFPK	TVICLPPSSDFGKMD	CRWRWKCKKGS	VNNA		CAM-toxina

Pouco se sabe sobre a estrutura terciária dessas pequenas miotoxinas básicas, pois, não há dados de cristalografia de raio X. Isto se deve a uma dificuldade na obtenção de cristais, que pode ser consequência da presença de isoformas, agregados ou conformações estruturais da crotamina e miotoxina a (Hampe et al., 1978; Beltran et al., 1985; Nedelkov & Bieber, 1997).

Algumas informações sobre a estrutura terciária da crotamina foram obtidas por Beltran & Mascarenhas (1990), por meio de estudos de SAXS. Através desse método indicou-se um modelo molecular para a crotamina consistindo de dois lóbulos, sendo um lóbulo menor (S) e outro maior (L), ligados pela ponte dissulfeto cys 18-cys 30, sendo o lóbulo (S) consideravelmente menos polar do que o lóbulo (L). Embora nenhum mecanismo tenha sido proposto para a ação tóxica da crotamina, este modelo sugere que o lóbulo (S), sendo menos polar do que o lóbulo (L), poderia ter um papel na interação da crotamina com a membrana celular.

A crotamina foi isolada do veneno de *Crotalus durissus terrificus* argentina, pela primeira vez, por Gonçalves & Polson (1947). Foi, posteriormente, designada crotamina quando Gonçalves & Vieira (1950) a isolaram do veneno da cascavel brasileira da região central e sul. Estes autores mostraram que esta toxina induz espasmos musculares em camundongos e estes dados foram posteriormente convalidados (Barrio & Vital Brazil, 1951; Cheymol et al., 1969; Cheymol et al., 1971a; Cheymol et al., 1971b).

O papel da crotamina nos acidentes crotálicos humanos ainda não foi esclarecido. A crotamina parece ter grande importância na imobilização da presa a ser ingerida pela serpente. Estudos com venenos de serpentes *Crotalus durissus terrificus*, crotamina positivo, mostraram que, imediatamente após a picada, o camundongo atingido fica totalmente imobilizado, impedindo dessa forma a sua fuga. Resultados semelhantes foram observados para *Crotalus viridis concolor*, *Crotalus viridis viridis* e *Crotalus viridis helleri*, que expressam proteínas homólogas à crotamina (Ownby et al., 1988).

Essas miotoxinas causam indução instantânea de contratura muscular, levando à paralisia dos membros posteriores de camundongos. A miotoxina a induz necrose de células musculares esqueléticas, causando a dilatação do retículo sarcoplasmático, trinta minutos após a injeção da toxina. O exame microscópico do tecido, 3 a 24 horas após a injeção da toxina, revelou a presença de vacúolos nas células musculares afetadas. Após 48 horas o retículo sarcoplasmático está degenerado em pequenas vesículas e aparecem algumas miofibrilas rompidas. Em 72 horas, a maioria das células afetadas apresenta-se completamente desorganizada, no entanto, o sarcolema e a lâmina basal permanecem morfológicamente intactos. Não há alterações morfológicas em outras células, tais como macrófagos, fibroblastos ou células endoteliais de capilares. Parece que estas toxinas são específicas para células

musculares esqueléticas (Obwny et al., 1988). A crotamina induz essencialmente o mesmo tipo de patogênese da mionecrose (Cameron & Tu, 1978); assim como duas toxinas similares do veneno de *Crotalus viridis concolor* (Engle, et al., 1983).

Embora o mecanismo preciso pelo qual estas toxinas danificam células musculares esqueléticas não seja ainda conhecido, existem duas linhas de investigação para tentar esclarecer como estas moléculas interagem com a célula muscular esquelética.

Uma destas linhas de investigação tem focalizado a interação destas miotoxinas com  $\text{Ca}^{+2}$ -ATPase do retículo sarcoplasmático (Volpe et al., 1986; Utaisincharoen et al. 1991). Mas, Engle et al., (1983) observaram que miotoxinas homólogas do veneno de *Crotalus viridis concolor* não causaram qualquer alteração significativa na  $\text{Ca}^{+2}$ -  $\text{Mg}^{+2}$ - ATPase ou na recaptura ou liberação de  $\text{Ca}^{+2}$  das vesículas isoladas do retículo sarcoplasmático.

Uma segunda linha de investigação tem tentado responder como estas toxinas interagem com a membrana plasmática da célula muscular. Muitos destes estudos indicam que estas toxinas alteram a função dos canais de sódio voltagem - dependente da membrana plasmática das células musculares esqueléticas, aumentando o influxo de sódio conduzindo a despolarização e contração. A crotamina produz alterações nas propriedades contráteis da preparação nervo-músculo de mamíferos tanto *in vitro* como *in situ* (Cheymol et al., 1971; Cheymol et al., 1971b; Chang & Tseng, 1978; Vital Brazil, 1972, Vital Brazil, 1990). Ela induz uma rápida despolarização das fibras isoladas de diafragma de ratos e camundongos, e este efeito foi prevenido ou revertido por tetrodotoxina, um bloqueador específico de canal de sódio voltagem-dependente (Chang & Tseng, 1978; Pellegrini Filho, 1976). A indução de contração de músculo esquelético pela crotamina deve-se à sua ação na membrana de fibras musculares promovendo aumento de influxo de sódio (Pellegrini Filho, 1976; Pellegrini Filho et al., 1978).

Matavel et al. (1998) acreditam que os efeitos tóxicos da crotamina *in vivo* e *in vitro* podem ser explicados como consequência das alterações cinéticas dos canais de  $\text{Na}^{+}$ .

A administração intralobar da crotamina em camundongos induz espasticidade e convulsões e a intraventricular cerebral produz imediata hiperpnea e alteração de comportamento, o qual consiste em prostração geral associado com períodos de agitação (Haberman & Cheng-Raude, 1975). Quando injetada no hipocampo induz efeitos neurotóxicos similares aos da crotoxina, a saber: sacudidelas corporais, mioclonias das patas, andar em

círculos, episódios de corridas abruptas isoladas ou acompanhadas por convulsões tônico-clônicas generalizadas. Estas alterações são devidas aos efeitos toxicológicos deste composto, uma vez que foi demonstrada a existência de lesões hipocampais no local de sua injeção (Moreira et al., 1992b).

Inúmeras tentativas têm sido feitas para atenuar a toxicidade de venenos. Dentre as metodologias aplicadas para destoxicá-los, a radiação ionizante tem se mostrado uma ótima ferramenta para esta finalidade, pois preserva as propriedades imunológicas e não adiciona novas substâncias que poderiam funcionar como imunógenos no processo (Puranananda, 1972; Kankonkar et al., 1975; Gaitonde et al., 1975; Baride et al., 1980; Herrera et al., 1986; Murata, 1988; Guarnieri-Cruz et al., 1990; Hati et al., 1990; Murata et al., 1990; Souza-Filho et al., 1992; Nascimento et al., 1996; Rogero & Nascimento, 1997 e Clissa et al., 1999).

A irradiação de proteínas, tanto no estado seco quanto em solução aquosa, tem sido estudada por induzir alterações nas propriedades químicas e físico-químicas das mesmas (Butler et al., 1984). Tanto a ação direta quanto a ação indireta de radiações ionizantes sobre as proteínas pode levar à perda da atividade biológica, bem como à possíveis alterações nas propriedades imunológicas destas.

Ação direta é o termo usado quando a macromolécula recebe energia diretamente da radiação incidente, por meio de excitação ou ionização. Ação indireta é quando a macromolécula recebe a energia pela transferência de outra molécula.

A maioria dos efeitos da radiação sobre macromoléculas é devido à ação indireta da mesma. Neste caso, o dano da radiação a algumas macromoléculas resulta na produção de espécies quimicamente reativas que se difundem e reagem com outras moléculas. Sabendo-se que a radiação interage casualmente por toda a massa de qualquer material exposto, e que muitos materiais biológicos são principalmente constituídos de água (80%), estas espécies reativas são, freqüentemente, produtos radiolíticos da água. A natureza do dano da radiação em proteínas devido aos efeitos indiretos é complexo, porque é dependente da proteína, do meio ambiente químico no qual ela é irradiada e das condições físicas existentes. A temperatura é um fator crítico, pois afeta diretamente a taxa de difusão. Barreiras físicas entre o produto radiolítico e a macromolécula podem influenciar o dano final provocado pela radiação (Kemper, 1993).

Os efeitos diretos da radiação surgem da interação entre a radiação ionizante e as macromoléculas. Por definição, outras moléculas não tem papel nestes efeitos. Em comparação aos efeitos indiretos, os efeitos diretos da radiação ionizante sobre macromoléculas em soluções líquidas são insignificantes (Garrison, 1987).

Os estudos dos mecanismos básicos da radiólise de proteínas, envolvendo oxidação de aminoácidos e resíduos de aminoácidos, induzida por oxigênio livre, indicam que a via mais comum para a oxidação de aminoácidos alifáticos envolve a eliminação de um átomo de hidrogênio mediada por radical hidroxil, formando um radical “carbon-centered” na posição  $\alpha$  do aminoácido ou resíduo de aminoácido na cadeia polipeptídica. A adição de  $O_2$  ao radical “carbon-centered” induz a formação de derivados de radical peróxi que sofrem decomposição produzindo amônia e  $\alpha$  cetoácidos ou produzindo amônia, gás carbônico e aldeídos ou ácidos carboxílicos. A eliminação de átomo de hidrogênio em outras posições na cadeia carbônica torna-se mais importante e leva à formação de derivados hidroxil ou produtos de ligação cruzada entre aminoácidos, ocorrendo, conseqüentemente, um processo de recombinação de radicais “carbon-centered”.

A eliminação de hidrogênio tem papel menor na oxidação de aminoácidos aromáticos por radiólise, todavia o sítio primário de ataque é o anel aromático levando aos derivados hidroxil, abertura do anel e, no caso da tirosina, a formação de dímero Tyr-Tyr (Stadtman, 1993).

Todos os resíduos aminoácidos nas proteínas estão sujeitos ao ataque por radicais hidroxil gerados por radiação ionizante, no entanto, os aminoácidos aromáticos e aminoácidos contendo enxofre são mais sensíveis à oxidação.

Pelo acima exposto percebe-se que, embora a literatura contenha um número expressivo de informações sobre a crotamina, existem aspectos fundamentais bioquímicos e farmacológicos, ainda não estudados. Assim sendo, decidiu-se no presente trabalho, purificar a crotamina e investigar a sua estrutura molecular, usando-se os métodos de espectrofotometria de absorção em ultravioleta e dicroísmo circular e espectrometria de massa. Estudou-se também a atividade tóxica ( $DL_{50}$ ) e a biodistribuição da crotamina.

Ainda mais, estudou-se as alterações causadas pela radiação gama de  $^{60}Co$  sobre a estrutura molecular da crotamina e as conseqüências sobre a atividade biológica,  $DL_{50}$  e a biodistribuição.

## OBJETIVOS

1. Purificar a crotamina a partir do veneno bruto de *Crotalus durissus terrificus*.
2. Estudar a estrutura molecular da crotamina nativa por meio de espectrofotometria de absorção em ultravioleta, dicroísmo circular e espectrometria de massa.
3. Determinar a dose letal a 50% (DL<sub>50</sub>) e a biodistribuição da crotamina nativa.
4. Estudar as possíveis alterações estruturais da crotamina nativa induzidas pela radiação gama de <sup>60</sup>Co.
5. Estudar a crotamina irradiada com radiação gama de <sup>60</sup>Co, quanto à atividade biológica, dose letal (DL<sub>50</sub>) e biodistribuição da crotamina irradiada.

## MATERIAL E MÉTODOS

### 1. Animais de experimentação

Para a realização deste trabalho foram utilizados camundongos SWISS machos, adultos, cedidos pelo Biotério do Departamento de Bioengenharia do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo (IPEN/CNEN-SP). Os camundongos foram mantidos neste Biotério em grupos de 20 em gaiolas coletivas, com temperatura controlada ( $22 \pm 2$  °C), luz natural. Eles receberam água e ração “ad libitum”. Os procedimentos aos quais os camundongos foram submetidos estão de acordo com os regulamentos para manipulação de animais preparados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

### 2. Drogas e reagentes utilizados

O veneno liofilizado de *Crotalus durissus terrificus* foi obtido do Instituto Butantan e conservado a -20°C.

Cloreto de sódio - Grupo Química Industrial Ltda Brasil.

Acrilamida, Bis-acrilamida, Coomassie Brilliant Blue G-250, Tricina, TEMED e Persulfato de sódio - Sigma Chemical Co.

Acetonitrila – Mallinckrodt -USA

Ácido trifluoro acético TFA – Merck – São Paulo

Padrões de baixo peso molecular- Promega conservados a -20°C.

Sephadex G-50, Sephadex G-100, Resource S - Pharmacia.

Iodeto de sódio - <sup>125</sup>I - MSD Nordion

Cloramina T - Merck, São Paulo

Éter etílico - Synth

Os demais reagentes utilizados foram da mais alta qualidade, com grau P.A.

### **3. Estudo bioquímico das crotaminas nativa e irradiada**

#### **3.1. Purificação da crotamina**

##### **3.1.1. Dosagem protéica**

O método de Bradford (1976) foi usado para a determinação da concentração protéica do veneno. A reação baseia-se na capacidade das proteínas interferir com a absorvância do corante Coomassie Brilliant Blue G-250 em meio altamente ácido, resultando em modificação proporcional à cor, detectável a 595 nm.

##### **3.1.2. Cromatografia de exclusão molecular**

O isolamento da crotamina foi realizado a partir do veneno bruto dessecado de *Crotalus durissus terrificus*, por meio de filtração molecular em coluna de gel Sephadex G-100. Em cada cromatografia foram dissolvidos 200 mg do veneno total liofilizado crotamina positivo em 3,0 mL de tampão ácido fórmico/formiato de amônio 100 mM, pH 3,0. A seguir, a solução foi centrifugada a 12100 g por 10 minutos, em uma centrífuga refrigerada (Sorvall RC2B). O sobrenadante foi reservado e o precipitado foi ressuspenso em 1,0 mL do mesmo tampão e centrifugado nas mesmas condições. Os sobrenadantes foram reunidos, homogeneizados e passados por meio de uma coluna de Sephadex G-100 de 85 x 2,5 cm, previamente, entumecido e equilibrado com o tampão já descrito. A eluição foi feita com este mesmo tampão, fluxo de 12 mL/h, coletando-se 3,0 mL por tubo em coletor de frações (LKB) em câmara refrigerada a 4°C. Uma eluição inicial dos marcadores de peso molecular, azul dextrana e azul de bromofenol, permitiu determinar o volume de exclusão e o volume total da coluna. A eluição foi acompanhada pela leitura da absorvância a 280 nm em um espectrofotômetro (Pharmacia Ultrospec III), em cubetas de quartzo de 1 cm de percurso óptico. O conteúdo protéico das frações foi determinado também por métodos colorimétricos (Lowry et al., 1951; Bradford, 1976).

A fração correspondente à crotamina foi separada e liofilizada.

##### **3.1.3. Recromatografia por troca iônica**

A fração de crotamina, obtida anteriormente, foi recromatografada em uma coluna catiônica de 1 mL Resource S, conectada a um sistema dual de bombas FPLC (Pharmacia), equilibrada em tampão A, ácido fosfórico/fosfato de sódio, 25 mM, pH 7,8. O tampão B foi idêntico, exceto que continha 2 M cloreto de sódio. Após uma lavagem inicial com 5,0 mL de

5% de tampão B, a eluição foi realizada com gradiente linear para 10 min (30 mL). A coluna foi então regenerada com 10 mL de 100% de tampão B seguido por uma lavagem com 10 mL de tampão A. O fluxo durante toda a corrida foi de 3,0 mL/min e o eluente foi monitorado em 280 nm. A fração foi então dessalinizada por diálise e liofilizada.

#### **3.1.4. Cromatografia de exclusão molecular de alto desempenho (HPSEC)**

A crotamina, obtida conforme descrito anteriormente, foi submetida a cromatografia de exclusão molecular de alto desempenho, em coluna de filtração em gel TOSO HAAS G2000 SW (7,5 mm x 60 cm), no cromatógrafo Waters 501. O sistema foi previamente equilibrado em tampão bicarbonato de amônio 50 mM, pH 7,0. Foi injetada uma quantidade de 20 µL de crotamina, sendo a eluição efetuada com o mesmo tampão de equilíbrio a um fluxo de 1 mL/min. O perfil cromatográfico foi acompanhado por medidas de absorvância a 280 nm e registrado por meio do uso de um registrador/integrador automático Waters 746.

#### **3.1.5. Cromatografia líquida de alto desempenho sob fase reversa (RP-HPLC)**

A crotamina foi solubilizada em água MILLI-Q contendo ácido trifluoracético (TFA) 0,04% (v/v), centrifugada a 12100 g por 3 minutos. O sobrenadante (20 µL) foi cromatografado em alto desempenho, sob fase reversa, em coluna µBoundapak C-18-Waters (3,9 x 300 mm), à 25°C, em cromatógrafo Waters 501. Foi realizado um gradiente linear do solvente A (água MILLI-Q contendo TFA 0,04%) para o solvente B [acetonitrila/água 60/40 (v/v), contendo TFA 0,04%], em 40 minutos, a um fluxo de 1 mL/min. A eluição foi monitorada por medidas de absorvância em 280 nm e registrada por meio do uso de um registrador/integrador automático Waters 746.

### **3.2. Irradiação da crotamina**

A crotamina, 2 mg/mL em solução de cloreto de sódio 0,15 M, foi irradiada em frascos de vidro com raios gama procedentes de uma fonte de <sup>60</sup>Co, "Gammacell 220" da Atomic Energy of Canada Limited, utilizando a dose de 2000 Gy e taxa de dose de 800 Gy/h. Trabalhos prévios realizados em nosso laboratório mostraram que a dose de 2000 Gy diminuiu a toxicidade do veneno de *Crotalus durissus terrificus* e da crotóxina, sem perda da capacidade imunogênica. (Murata et al., 1990; Souza-Filho et al., 1992; Murata, 1990; Nascimento et al., 1996; Clissa et al., 1999).

### **3.3. Dosagem protéica das crotaminas nativa e irradiada**

Foi utilizado o método de Lowry et al. (1951), modificado por Miller (1959), utilizando-se soroalbumina bovina como padrão. Este método foi usado para a dosagem protéica de crotamina purificada, uma vez que o método de Bradford subestimou a quantidade protéica para esta toxina (dados não publicados).

O conteúdo protéico das amostras de crotamina foi determinado antes e após a irradiação.

### **3.4. Espectro de absorção em ultravioleta das crotaminas nativa e irradiada**

As amostras de crotamina nativa e irradiada foram analisadas na concentração de 0,5 mg/mL, no intervalo de 210 a 350 nm, em um espectrofotômetro Ultrospec III (Pharmacia Biotech) com registro automático nos vários comprimentos de onda. As leituras foram obtidas contra uma solução de cloreto de sódio 0,15 M, que foi utilizada como solvente.

### **3.5. Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) das crotaminas nativa e irradiada**

A SDS-PAGE foi utilizada para avaliar a pureza da crotamina purificada e detectar as possíveis variações de peso molecular decorrentes da formação de agregados e quebras da proteína induzidas pela radiação. Esta técnica apresenta boa sensibilidade e alto poder de resolução, baseando-se em características de peso molecular da amostra. Escolheu-se a eletroforese em sistema descontínuo em camada vertical de gel de poliacrilamida, em condições desnaturantes na presença de 0,1% de SDS, segundo o método descrito por Schägger & von Jagow (1987). O géis de resolução e de empilhamento consistiam de 16,5% de T e 6% de C e 4% de T e 3% de C, respectivamente, em tampão Tris/HCl 3 M, pH 8,45. A SDS-PAGE-Tricina permite melhor resolução para proteínas pequenas do que a SDS-PAGE-Glicina, e esta resolução superior ocorre especialmente no intervalo de 5 a 20 kDa.

### **3.6. Dicroísmo circular das crotaminas nativa e irradiada**

As amostras de crotamina nativa e irradiada foram analisadas na concentração de 125 µg/mL em tampão ácido acético/acetato de sódio 20 mM, pH 4,0, no intervalo de 260 a 190 nm em um espectropolarímetro Jasco J-720 do National Cancer Institute (Frederick, MD - USA). O comprimento do caminho óptico foi de 2 mm e o experimento foi realizado à temperatura ambiente. Utilizou-se uma resolução de 0,5 nm, largura de banda de 1 nm e sensibilidade de 20 miligraus. O tempo de resposta foi de 20 segundos e a velocidade de varredura de 20 nm/minuto. Cada espectro é o resultado de 2 varreduras.

### **3.7. Seqüenciamento de aminoácidos das crotaminas nativa e irradiada**

As crotaminas nativa e irradiada (10 a 30 pmoles) foram submetidas inicialmente a um único ciclo de degradação de Edman (Edman, 1950), segundo metodologia estabelecida por Hunkapiller (1988), em seqüenciador automático Applied Biosystem, modelo 476A, para se confirmar a estrutura da amostra. Foram analisados os cinco resíduos da região amino terminal. Os peptídeos foram então aplicados em membranas de polivinilideno (PVDF), previamente tratadas com Polybrene. A degradação de Edman consiste, resumidamente, das seguintes etapas: a) acoplamento do peptídeo com o reagente fenilisotiocianato (PITC) em condições alcalinas, sob atmosfera de nitrogênio, no qual o PITC reage com o resíduo N-amino terminal para formar N-feniltiocarbamoil (PTC) derivado do peptídeo; b) retirada do excesso de PITC e tampão, por meio de lavagem; c) reação de clivagem em meio ácido anidro, para obter a ciclização do PTC-derivado, produzindo uma tiazolina, correspondente ao resíduo de aminoácido N-terminal, e um peptídeo de tamanho reduzido pela perda do resíduo N-terminal; d) extração da tiazolina resultante em solvente hidrofóbico para separá-la do peptídeo reduzido; e) conversão da tiazolina para uma forma mais estável, ou seja, na forma de feniltioiantoina (PTH), por meio de tratamento com ácido diluído.

Estes experimentos foram realizados no Centro de Seqüenciamento de Proteínas, Análise de Aminoácidos e Síntese de Peptídeos do Instituto de Química (USP-São Paulo).

### **3.8. Análise de aminoácidos das crotaminas nativa e irradiada**

As crotaminas nativa e irradiada foram submetidas à hidrólise ácida gasosa, segundo metodologia descrita por Moore & Stein (1954). Resumidamente, 5 nmoles de proteína foi hidrolisada em uma estação de trabalho "Pico-Tag Workstation" (Waters) em

presença de HCl 6N e fenol a 110°C por 24 horas. Após a hidrólise, o material foi diluído em tampão de amostra e submetido à análise de aminoácidos em um analisador automático 7300 (Beckman Instruments, Inc.). O sistema, originalmente concebido por Spackman et al. (1958), separa os diferentes aminoácidos por meio de cromatografia de troca iônica em resina de poliestireno sulfonado. A eluição ocorre por meio do aumento gradativo no pH e força iônica dos diferentes tampões. O processo de derivatização pós-coluna, realizado por meio da reação dos aminoácidos com ninhidrina, permite a detecção dos produtos em 440 ou 570 nm.

Estes experimentos foram realizados no Centro de Seqüenciamento de Proteínas, Análise de Aminoácidos e Síntese de Peptídeos do Instituto de Química (USP-São Paulo).

### **3.9. Espectrometria de massa das crotaminas nativa e irradiada**

Foram injetados 5  $\mu\text{L}$  das crotaminas nativa e irradiada, 400  $\mu\text{g/mL}$ , em um cromatógrafo líquido de alta performance (HPLC) conectado a uma coluna capilar de fase reversa C8 Vydac (250 mm x 180  $\mu\text{m}$ , tamanho da partícula de 5  $\mu\text{m}$ ), com fluxo de 2  $\mu\text{L/min}$  e com gradiente de 5 a 100% de fase móvel B em 60 minutos. As fases móveis A e B consistiram de 0,1 % de ácido fórmico e 90% de acetonitrila em 0,1% de ácido fórmico, respectivamente. A absorvância do eluente foi monitorada a 214 nm em um detector de UV. A saída do detector de UV, por sua vez, estava conectada a um espectrômetro de massa Finnigan TSQ 700, permitindo, assim, a injeção da amostra após a retirada do sal. Este aparelho é um triplo quadripolo no qual a amostra é ionizada por “electrospray” (U=3800 volts). A janela de detecção utilizada foi de 300 a 2000 M/z e o tempo de varredura foi de dois segundos. Estes experimentos foram realizados no U.S. Army Medical Institute of Infectious Diseases (Frederick, MD, USA).

## **4. Estudo farmacológico das crotaminas nativa e irradiada**

### **4.1. Teste de bioatividade das crotaminas nativa e irradiada**

A atividade da crotamina foi testada pelo método descrito por Straight et al. (1991), que consistiu na administração intraperitoneal de 50  $\mu\text{g}$  das crotaminas nativa ou irradiada em camundongos machos, adultos SWISS pesando de 18 a 22 g. Observou-se a paralisia das patas posteriores. O tempo de observação dos animais foi de 30 minutos.

## **4.2. Determinação da atividade tóxica das crotaminas nativa e irradiada**

A toxicidade foi avaliada pela determinação da dose letal 50% (DL<sub>50</sub>) das amostras das crotaminas nativa e irradiada e calculada de acordo com o método de Spermann-Kärber (WHO, 1981). Camundongos machos, adultos, SWISS, pesando de 20 a 25 g, distribuídos em 7 grupos de 5 animais cada, foram injetados por via intraperitoneal (0,2 mL por 20 g de animal) com diferentes doses das crotaminas nativa e irradiada. Anotou-se o número de óbitos 48 horas após as administrações. Os camundongos do grupo controle receberam solução de cloreto de sódio 0,15 M, que foi o veículo utilizado. Os fatores de diluição utilizados foram 1,5 e 1,3 para as crotaminas nativa e irradiada, respectivamente.

## **4.3. Biodistribuição da crotamina nativa**

### **4.3.1. Marcação da crotamina nativa com <sup>125</sup>I**

Utilizou-se para a marcação da crotamina o método da cloramina T (Hunter & Greenwood, 1962). A cloramina T é um agente oxidante, que em solução aquosa forma o ácido hipocloroso capaz de promover a oxidação do iodeto.

Em um tubo cônico “Eppendorf”, foram misturados 10 µL de solução de crotamina, 1 µg/µL, em tampão ácido fosfórico/fosfato de sódio 50 mM (pH 7,4); 20 µL de tampão ácido fosfórico/fosfato de sódio 300 mM (pH 7,4); 29,6 MBq de <sup>125</sup>I e 12 µL de cloramina T, 66,67 µg/mL. Agitou-se e, após 2,5 minutos, agitou-se novamente. Esperou-se 2,5 minutos e adicionaram-se 5 µL de metabissulfito de sódio, 0,2 mg/mL. Imediatamente após, adicionaram-se 200 µL de iodeto de sódio, 10 mg/mL. Retiraram-se três alíquotas de 3 µL do marcado, com ponteiros individuais. Lavaram-se as ponteiros na solução tampão para posterior testes de recuperação e rendimento. Este procedimento foi realizado em capela devido à volatilidade do <sup>125</sup>I.

#### **4.3.1.1. Purificação da crotamina nativa radioiodada**

A purificação da crotamina radioiodada foi feita por meio de filtração molecular em coluna de gel Sephadex G-50, equilibrada com tampão ácido fosfórico/ fosfato de sódio 50 mM, pH 7,4, usando-se a crotamina nativa como carreador. A eluição foi feita com o mesmo tampão, fluxo de 12 mL/h, coletando-se 2,0 mL por tubo em coletor de frações

(LKB) em câmara refrigerada a 4°C. Os tubos resultantes da eluição foram lidos em contador gama tipo poço (Oakfield Instruments Ltd) para identificação do pico da proteína radioiodada.

#### 4.3.2. Biodistribuição da crotamina nativa radioiodada

Foram utilizados 50 camundongos machos, adultos, SWISS, pesando  $37 \pm 3$  g, distribuídos em 10 grupos de 5 animais cada. Os camundongos receberam, por via intraperitoneal, solução de crotamina marcada com  $^{125}\text{I}$  com taxas de contagem de  $2,4 \times 10^6$  cpm contida em 100  $\mu\text{L}$ . Após intervalos de 0,08; 0,25; 0,5; 2; 3; 4; 8; 12 e 24 horas, os animais foram anestesiados com éter para a retirada de sangue do plexo orbital. Imediatamente após, foram retirados: cérebro, coração, pulmões, fígado, baço, rins, músculo esquelético e a tireóide juntamente com pequenas quantidades de tecidos circunvizinhos. A pesagem dos órgãos foi feita após acondicionamento em papel celofane com peso previamente conhecido. A radioatividade dos órgãos foi determinada em contador gama (Oakfield Instruments Ltd). Os valores, para cada órgão em cada tempo, foram apresentados como contagem por minuto (cpm). Para os órgãos que não alcançaram 1000 contagens, usou-se maior tempo de leitura até que acumulassem este valor. A radioatividade líquida de cada órgão foi calculada de acordo com a seguinte fórmula:

$$Ro = Co - (mo \times Vs \times \frac{Cs}{ms} \times ds) \quad (1)$$

Ro é a radioatividade líquida no órgão

Co é a cpm do órgão

mo é a massa do órgão

Vs é o volume de sangue contido no órgão (Altman & Dittmer, 1961)

Cs é a cpm do sangue

ms é a massa do sangue

ds é a densidade do sangue de camundongos, 1,057 g/mL (Altman & Dittmer, 1961)

Para a determinação das concentrações sanguíneas utilizou-se as medidas de radioatividade detectadas nas amostras sanguíneas e aplicou-se a seguinte fórmula:

$$Cs = \frac{M}{ms} \times ds \quad (2)$$

M é a medida da radioatividade em cpm

ms é a massa da amostra sanguínea

ds é a densidade do sangue de camundongos (Altman & Dittmer, 1960).

#### **4.3.3. Marcação fria da crotamina nativa**

Foram dissolvidos 1,2 mg de crotamina em 10  $\mu$ L de tampão ácido fosfórico/fosfato de sódio 50 mM, pH 7,4. Adicionou-se 20  $\mu$ L de tampão ácido fosfórico/fosfato de sódio 300 mM (pH 7,4); 1,7  $\mu$ L de iodeto de potássio, 1 mg/mL, e 12  $\mu$ L de cloramina T, 8 mg/mL. Agitou-se, esperou-se 2,5 minutos e agitou-se novamente. Esperou-se 2,5 minutos e adicionaram-se 5  $\mu$ L de metabissulfito de sódio, 24 mg/mL, e, imediatamente após, juntaram-se 200  $\mu$ L de iodeto de sódio, 1,2 g/mL. A solução foi diluída em tampão ácido fosfórico/fosfato de sódio 50 mM, pH 7,4, para uma concentração protéica de 0,9 mg/mL.

Foi feita uma falsa marcação, a qual consistiu na realização do procedimento acima descrito, contudo, sem a adição da crotamina.

#### **4.3.4. Efeito farmacológico da crotamina nativa iodada**

Camundongos adultos, machos, SWISS, pesando de  $30 \pm 2$  g, foram distribuídos em três grupos de cinco animais cada. Eles receberam 6,0 mg/kg (correspondente à uma  $DL_{50}$ ), por via intraperitoneal, de crotaminas nativa e marcada fria. Os animais controles receberam a solução obtida na falsa marcação. Anotou-se o tempo de início da paralisia das patas posteriores e o número de óbitos ocorridos 48 horas após a administração das soluções.

### **4.4. Biodistribuição da crotamina irradiada**

#### **4.4.1. Marcação com $^{125}\text{I}$ da crotamina irradiada**

Utilizou-se para a marcação da crotamina o método da cloramina T (Hunter & Greewood, 1962)

Em um tubo cônico “Eppendorf”, foram misturados 50  $\mu$ L de solução de crotamina irradiada 1  $\mu$ g/ $\mu$ L em tampão ácido fosfórico/fosfato de sódio 0,05 M (pH 7,4); 20  $\mu$ L de tampão ácido fosfórico/fosfato de sódio 300 mM (pH 7,4); 29,6 MBq de  $^{125}\text{I}$  e 12

$\mu\text{L}$  de cloramina T, 66,67  $\mu\text{g/mL}$ . Agitou-se e após 2,5 minutos agitou-se novamente. Esperou-se 2,5 minutos e adicionaram-se 5  $\mu\text{L}$  de metabissulfito de sódio, 0,2 mg/mL. Imediatamente após, adicionou-se 200  $\mu\text{L}$  de iodeto de potássio, 10 mg/mL. Retiraram-se três alíquotas de 3  $\mu\text{L}$  do marcado com ponteiros individuais. Lavaram-se as ponteiros no tampão para posterior testes de recuperação e rendimento. Este procedimento foi realizado em capela devido à volatilidade do  $^{125}\text{I}$ .

#### **4.4.1.1. Purificação da crotamina irradiada radioiodada**

A purificação da crotamina radioiodada foi feita por filtração molecular em coluna de gel Sephadex G-50, equilibrada com tampão ácido fosfórico/ fosfato de sódio 0,05 M, pH 7,4, usando-se crotamina irradiada como carreador.

A eluição foi feita com o mesmo tampão, fluxo de 12 mL/h, coletando-se 0,5 mL por tubo em coletor de frações (LKB) em câmara refrigerada a 4°C. Os tubos resultantes da eluição foram contados em contador gama tipo poço (Oakfield Instruments Ltd) para identificação do pico da proteína radioiodada.

#### **4.4.2. Biodistribuição da crotamina irradiada radioiodada**

Foram utilizados 50 camundongos adultos, machos, SWISS, pesando  $33 \pm 3$  g, distribuídos em 10 grupos de cinco animais cada. Os camundongos receberam, por via intraperitoneal, solução de crotamina irradiada marcada com  $^{125}\text{I}$  com taxas de contagem  $1,3 \times 10^6$  cpm, contida em 300  $\mu\text{l}$ . Após intervalos de 0,08; 0,25; 0,5; 1; 2; 3; 4; 8; 12 e 24 horas, os animais foram anestesiados com éter para a retirada de sangue do plexo orbital. Imediatamente após, foram retirados: cérebro, coração, pulmões, fígado, baço, rins, músculo esquelético e a tireóide juntamente com pequenas quantidades de tecidos circunvizinhos. A pesagem dos órgãos foi feita após acondicionamento em tubos de polietileno com pesos conhecidos. A radioatividade foi determinada em contador gama (Oakfield Instruments Ltd). Os valores, para cada órgão em cada tempo, foram apresentados como contagem por minuto (cpm). Para os órgãos que não alcançaram 1000 contagens, usou-se maior tempo de leitura até que acumulassem este valor. A radioatividade líquida de cada órgão e a concentração sanguínea foram calculadas como descrito no item 4.3.2.

## 5. Estatística

Os dados referentes à concentração protéica foram analisados pelo teste t de Student.

Os resultados dos experimentos de biodistribuição foram submetidos a uma análise de variância, segundo o modelo hierárquico, com dois critérios de classificação e teste F de significância. O primeiro critério de classificação utilizado foi o tratamento e o segundo foi o tempo de coleta das amostras. Após a análise de variância, a comparação que apresentava interesse, e que não foi possível ser feita devido à partição elegida, foi realizada por meio do teste de Tukey (Vieira, 1999).

As curvas de concentrações sanguíneas das crotaminas nativa e irradiada referentes ao estudo de biodistribuição foram ajustadas pelo método de regressão não-linear, baseado no algoritmo Levenberg-Marquardt, disponível no aplicativo Microcal Origin, versão 5.0.

O nível de significância adotado foi de 0,05.

## RESULTADOS

### 1. Purificação da crotamina

#### 1.1. Dosagem protéica do veneno total

A dosagem protéica do veneno total mostrou que 80% do veneno de *Crotalus durissus terrificus* é constituído de proteínas.

#### 1.2. Cromatografia de exclusão molecular

O perfil cromatográfico do veneno de *Crotalus durissus terrificus* revelou a presença de quatro frações, a saber: a fração 1, convulxina; fração 2, giroxina; fração 3, crotoxina e a fração 4, crotamina (FIG. 1).

#### 1.3. Cromatografia por troca iônica

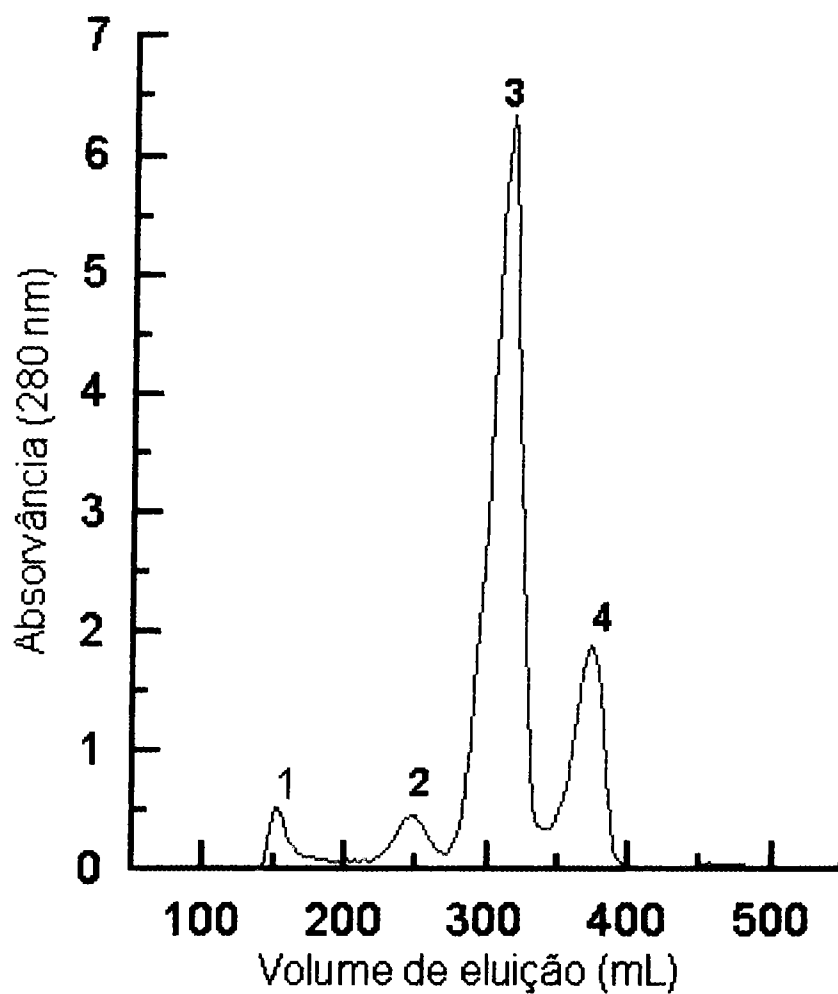
A crotamina, fração 4, foi recromatografada, por troca catiônica, obtendo-se dois picos. O primeiro pico, a eluição ocorreu no início do gradiente constituiu a fração não adsorvida. O segundo pico foi detectado com 1,2 M de NaCl e corresponde a crotamina (FIG. 2).

#### 1.4. Cromatografia líquida de exclusão molecular de alto desempenho (SE-HPLC)

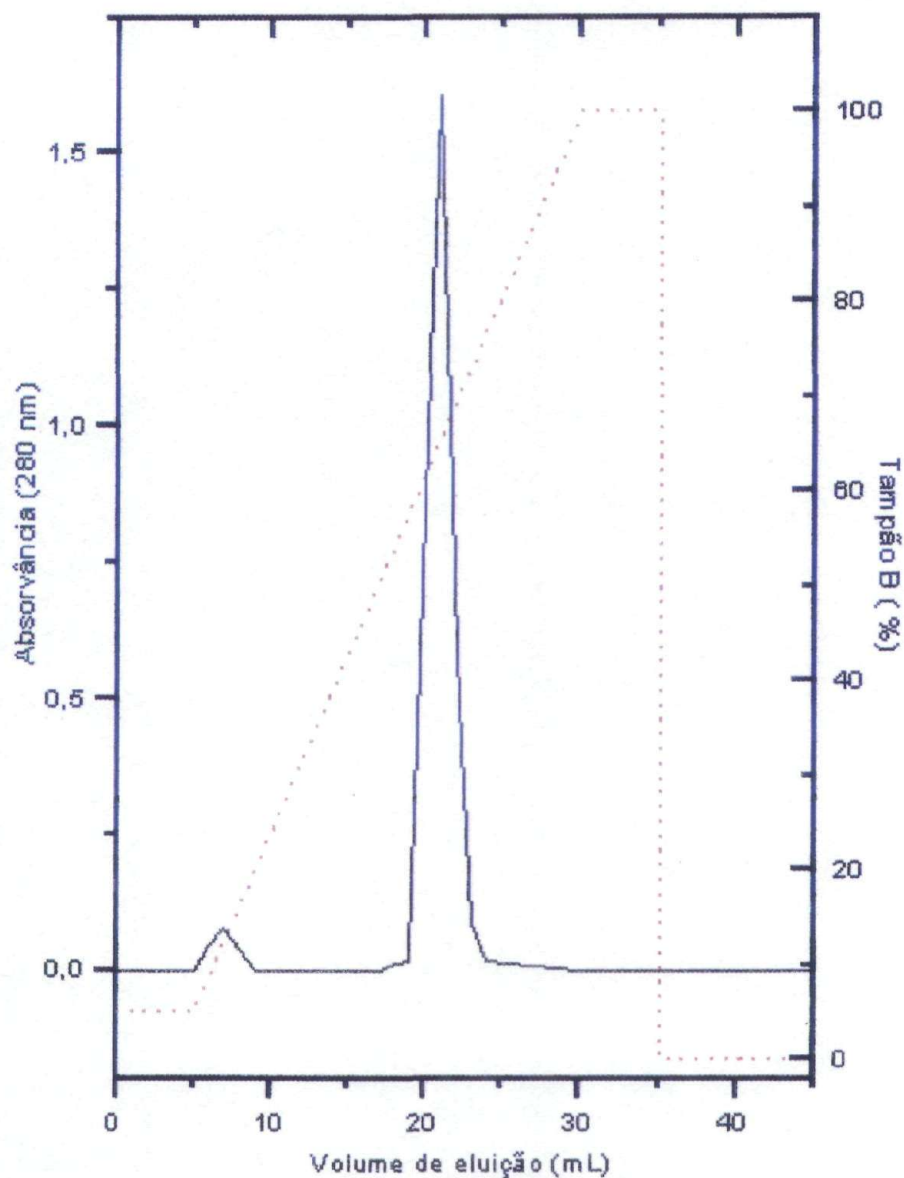
O perfil cromatográfico revelou um pico com 100% de área correspondente à crotamina (FIG. 3).

#### 1.5. Cromatografia líquida de alto desempenho sob fase reversa (HPLC-RP)

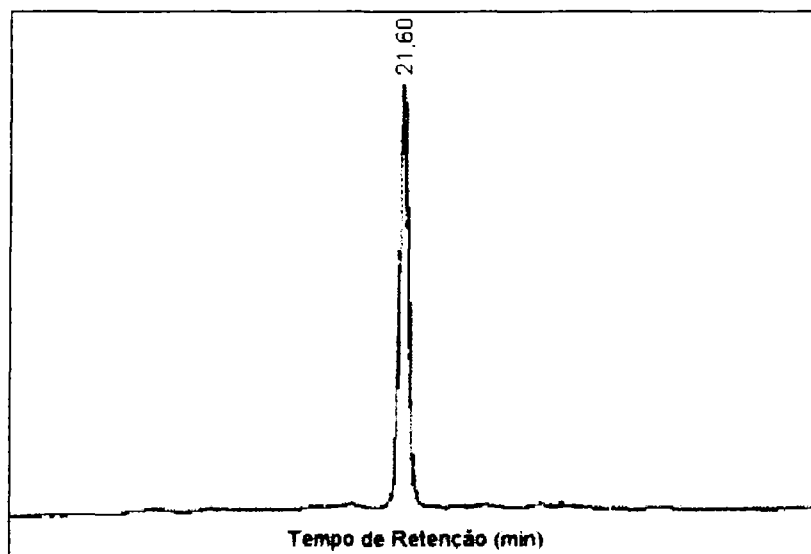
O perfil cromatográfico revelou um pico com 96,4% de área correspondente à crotamina (FIG. 4).



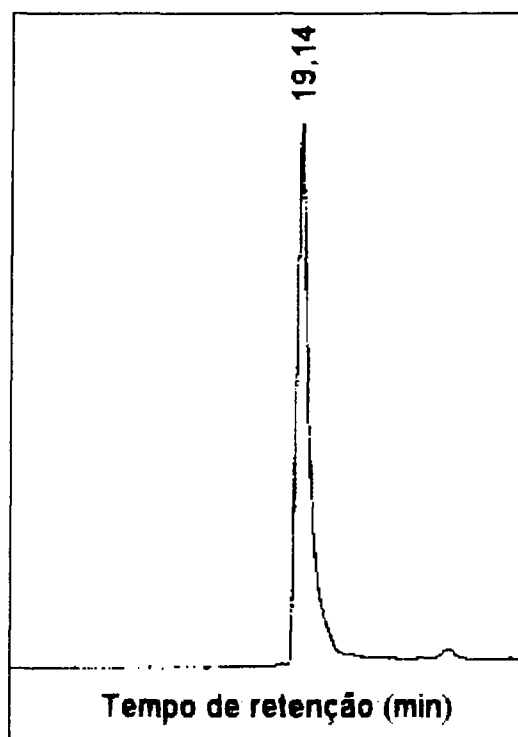
**Figura 1.** Cromatografia de exclusão molecular do veneno de *Crotalus durissus terrificus* em tampão ácido fórmico/formiato de amônio 100 mM, pH 3,0, em coluna Sephadex G-100 (2,5 x 85 cm). Taxa de fluxo: 0,2 mL/min. Temperatura: 4°C. Picos: 1 - convulxina; 2 - giroxina; 3 - crotoxina; 4 - crotamina.



**Figura 2.** Cromatografia por troca iônica da crotamina (fração 4) em coluna de 1 mL Resource S (6,4x30 mm, “bead size”: 15  $\mu$ m). Tampão A: ácido fosfórico/fosfato de sódio 25 mM, pH 7,8. Tampão B: Tampão A com NaCl 2 M, pH 7,8. Fluxo: 3,0 mL/min. O gradiente está indicado pela linha vermelha. O procedimento completo foi realizado à temperatura ambiente.



**Figura 3.** Cromatografia de exclusão molecular de alto desempenho de crotamina em tampão ácido carbônico/bicarbonato de amônio 50 mM, pH 7,0, em coluna de filtração em gel TOSO HAAS G2000 SW (7,5 mm x 60 cm). Taxa de fluxo: 1 mL/min. A proteína foi monitorada pela absorvância em 280 nm.



**Figura 4.** Cromatografia de alto desempenho sob fase reversa de crotamina em coluna  $\mu$ Boundapak C-18-Waters (3,9 x 300 mm), à 25°C, utilizando-se um gradiente linear de solvente A (0,04% ácido trifluoracético) para solvente B (acetonitrila/A 60:40 v/v). Taxa de fluxo de 1 mL/min. A proteína foi monitorada pela absorvância em 280 nm.

## 2. Dosagem protéica das crotaminas nativa e irradiada

Tabela 1. Concentração protéica das crotaminas nativa e irradiada

Amostras	Concentração (mg/mL)
Crotamina nativa	1,91 ± 0,055
Crotamina irradiada	1,90 ± 0,057

Os valores representam a média para n de 8 amostras; teste t de Student,  $p=0,76105$ ; as médias não são estatisticamente diferentes.

## 3. Espectro de absorção em UV das crotaminas nativa e irradiada

No espectro de absorção na região ultravioleta (FIG.5) pode-se observar um aumento na absorção na região de 230 a 350 nm da crotamina irradiada.

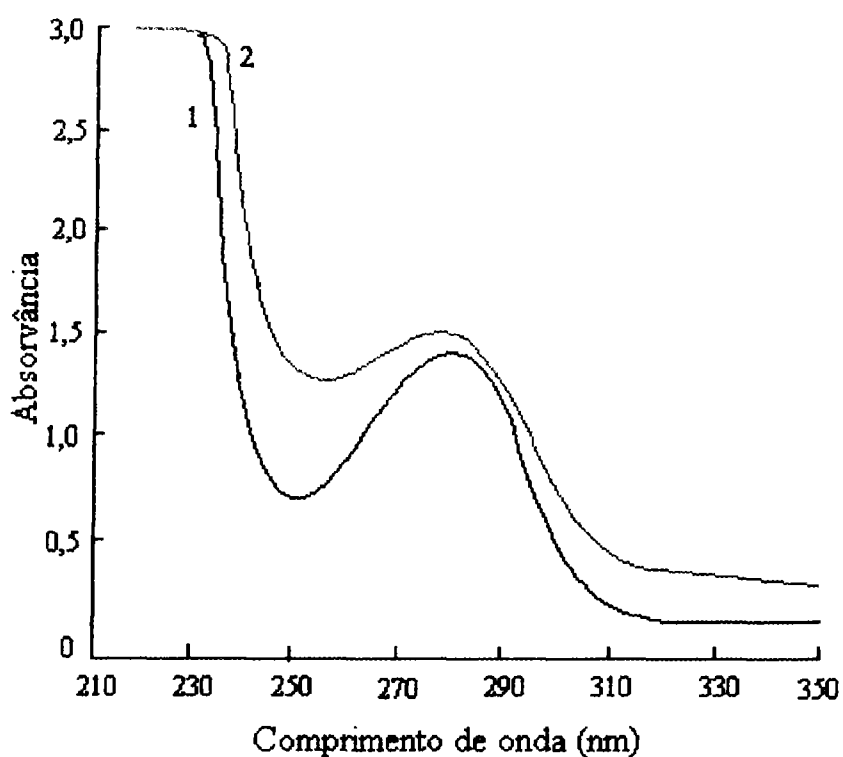
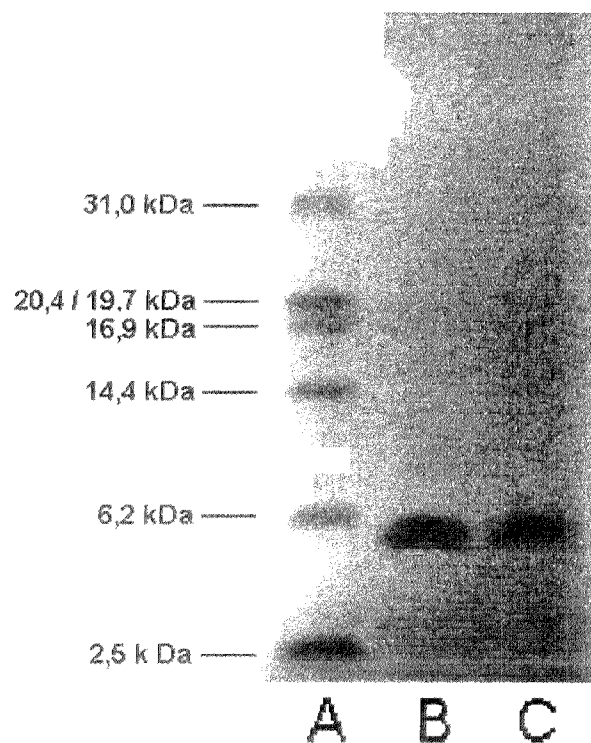


Figura 5. Curvas de absorvâncias de crotaminas nativa (1) e irradiada (2) na concentração de 0,5 mg/mL em cloreto de sódio 0,15 M.

#### 4. Eletroforese das crotaminas nativa e irradiada

Os perfis eletroforéticos das amostras das crotaminas nativa e irradiada não mostraram alterações como mostrado na FIG.6.



**Figura 6.** Eletroforese das crotaminas nativa e irradiada. A: padrões de peso molecular (Anidrase carbônica 31,0 kDa; Inibidor de tripsina de soja 20,7/19,7 kDa; Mioglobina cardíaca eqüina 16,9 kDa; Lisozima 14,4 kDa; Fragmento mioglobina (F2) 6,2 kDa; Fragmento mioglobina (F3) 2,5 kDa); B: crotamina nativa e C: crotamina irradiada.

#### 5. Seqüenciamento de aminoácidos das crotaminas nativa e irradiada

O seqüenciamento dos cinco resíduos de aminoácidos amino terminal das crotaminas nativa e irradiada foi: Y-K-Q-C-H.

## 6. Análise de aminoácidos das crotaminas nativa e irradiada

A TAB.2 mostra que a composição de aminoácidos das crotaminas nativa e irradiada foram idênticas.

**Tabela 2.** Análise de aminoácidos das crotaminas nativa e irradiada

Crotamina: YKQCHKKGGHCFPKEKICLPSSDFGKMDCRWRWKCKKGS

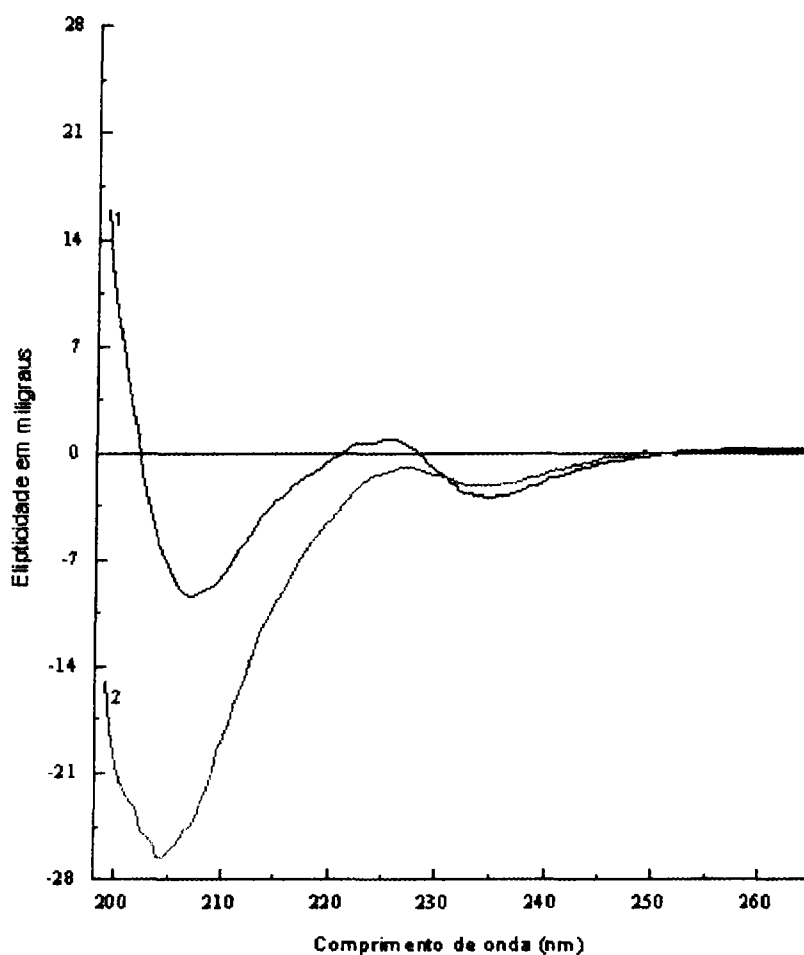
Aminoácido	Crotamina nativa	Crotamina irradiada	Crotamina
Tyr	1,1	0,9	(1)
Lys	8,7	9,9	(9)
Gln	2,4	2,6	(2)
CyS	1,9	2,4	(3)
Hys	2,0	2,0	(2)
Gly	5,1	6,6	(5)
Phe	2,0	2,0	(2)
Pro	3,9	3,3	(3)
Ile	1,4	1,6	(1)
Leu	1,0	1,0	(1)
Ser	2,5	2,4	(3)
Asp	2,4	3,0	(2)
Met	1,1	1,2	(1)
Arg	2,2	2,2	(2)
Trp	nd	nd	(2)

Valores normalizados em relação à leucina. A sequência da crotamina contém a ligação Cys-Leu (Laure, 1975). Esta ligação peptídica pode ser resistente à hidrólise por HCl, resultando em recuperações menores do que as esperadas de meia cistina e leucina.

Valores foram expressos como número de resíduos por mol de proteína; \*nd: não determinado. Valores entre parênteses foram retirados da sequência (Laure, 1975).

## 7. Dicroísmo Circular das crotaminas nativa e irradiada

O espectro do dicroísmo circular mostra a contribuição das ligações não peptídicas em torno de 220-250 nm resultando numa banda positiva a 225 nm e banda negativa a 235 nm, sendo que a ligação máxima aparece em torno de 198 nm e o mínimo aparece em 207 nm para a crotamina nativa. Para a crotamina irradiada, não houve a presença da banda positiva, sendo que a ligação mínima aparece em 204 nm (FIG.7).



**Figura 7.** Espectro de dicroísmo circular das crotaminas nativa (1) e irradiada (2), na concentração de 125  $\mu\text{g/mL}$ , em tampão de ácido acético/acetato de sódio 20 mM, pH 4,0.

### 8. Espectrometria de massa das crotaminas nativa e irradiada

A proteína nativa mostrou dois picos, sendo o principal com massa de 14244,4 Da (FIG.8). O segundo pico, cuja massa foi de 14150,1 Da, pode ser um trímero de isoforma. Todavia, a quantidade relativa deste pico foi irrisória quando comparada com o pico principal. A eluição da crotamina irradiada resultou em três picos, com tempo de retenção menor do que a crotamina nativa, os quais foram aplicados separadamente no espectrômetro de massa. O primeiro pico resultou em uma massa de 4882 Da, compatível com a estrutura primária da crotamina (FIG.9). O espectro do pico 2 foi complexo e a massa calculada foi de 4903 Da (FIG.10). O espectro do pico 3 apresentou ainda maior complexidade, o que prejudicou a sua análise.

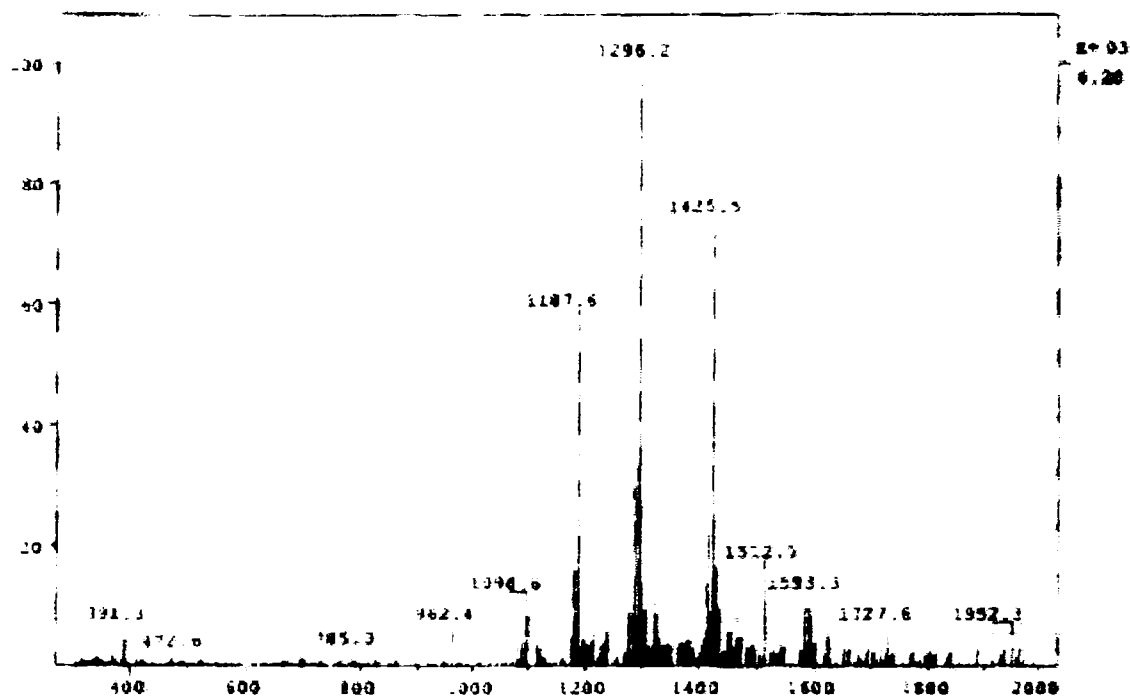


Figura 8. Espectro de massa da crotonamina nativa.

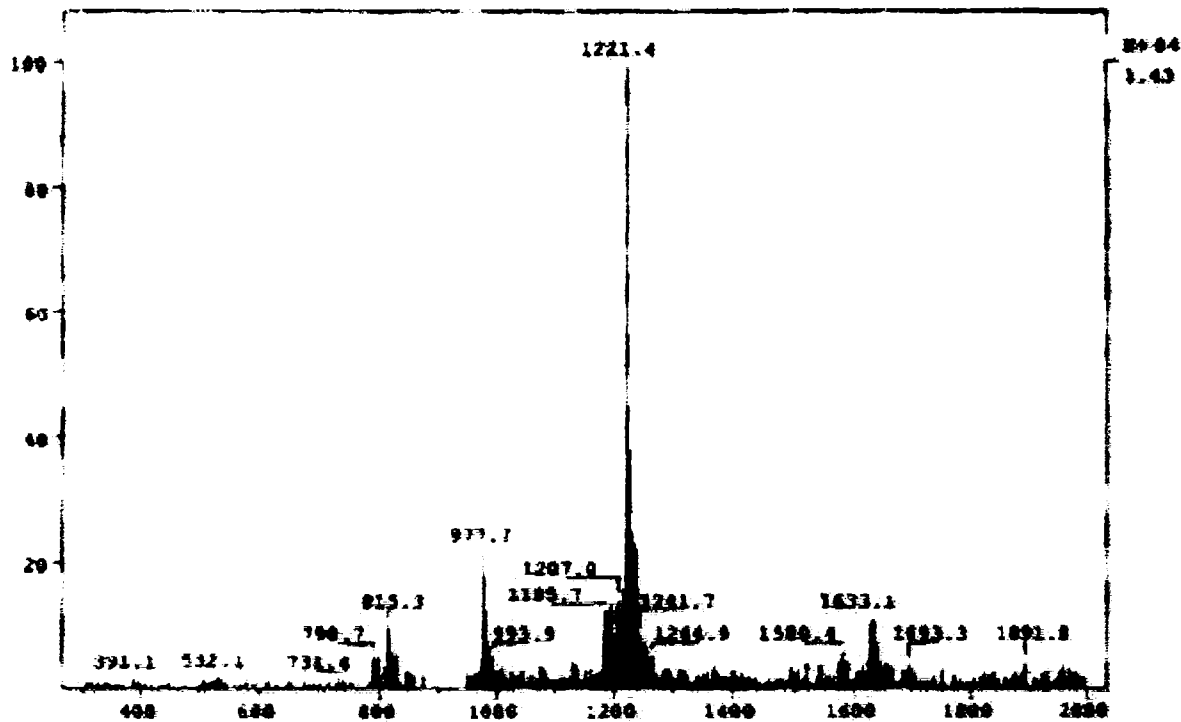


Figura 9. Espectro de massa da crotonamina irradiada, pico 1.

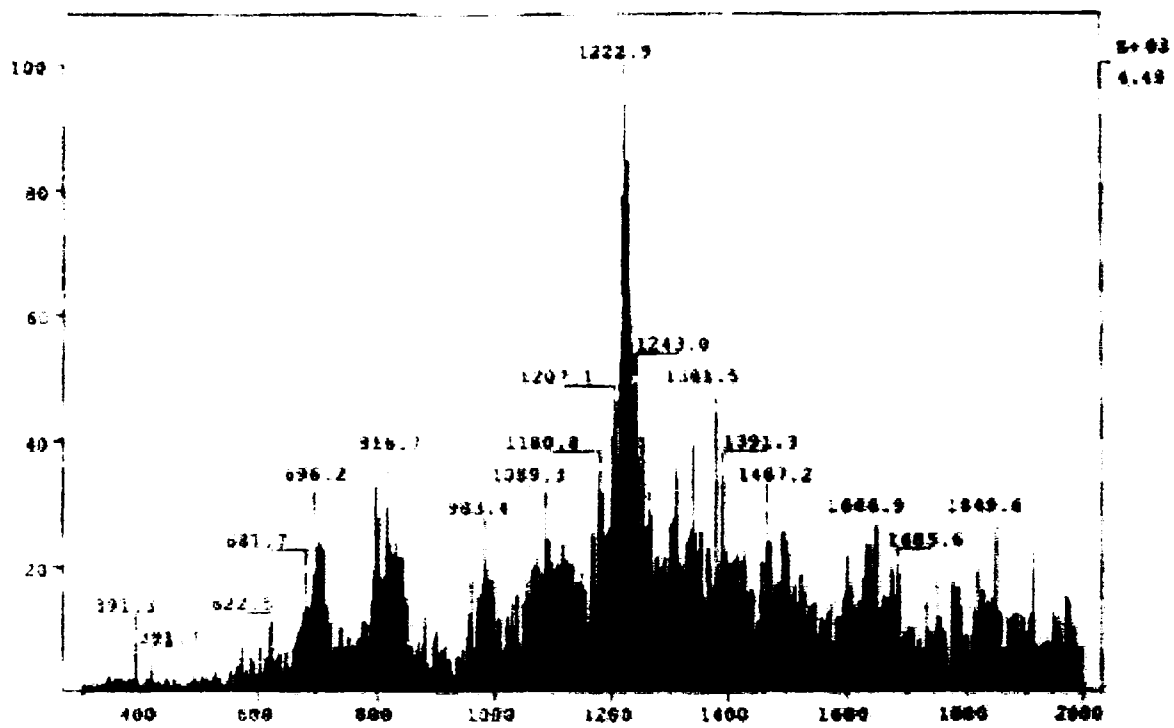


Figura 10. Espectro de massa da crotamina irradiada, pico 2.

### 9. Determinação da atividade tóxica das crotaminas nativa e irradiada

O valor da dose letal 50% (DL<sub>50</sub>) obtido para a crotamina nativa foi de 5,976 mg/kg, enquanto que para a crotamina irradiada foi de 11,549 mg/kg (TAB.3).

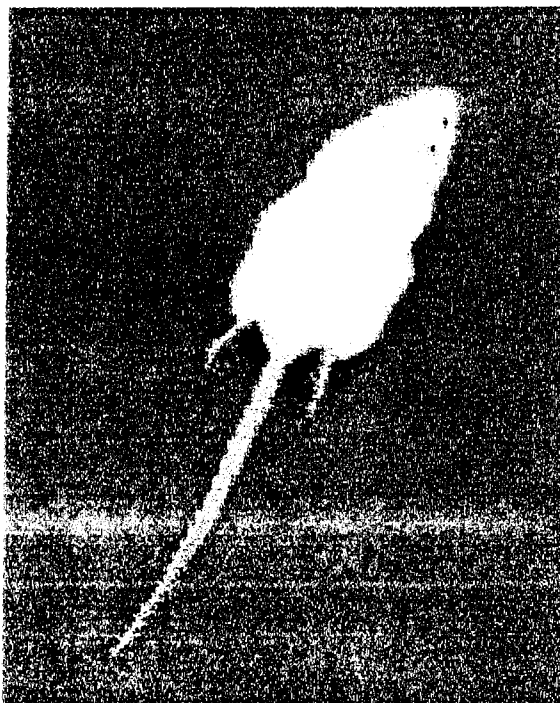
**Tabela 3.** DL<sub>50</sub> das crotaminas nativa e irradiada administradas intraperitonealmente em camundongos.

Crotamina	Doses (mg/kg)	% de mortalidade	DL <sub>50</sub> (mg/kg)	Limites fiduciais
Nativa	1,333	0	5,976	4,221-8,463
	2,000	0		
	3,000	0		
	4,500	60		
	6,750	40		
	10,125	80		
	15,187	100		
Irradiada	5,121	0	11,549	9,096-14,663
	6,657	0		
	8,654	40		
	11,250	40		
	14,625	60		
	19,012	100		
	24,716	100		

DL<sub>50</sub> calculada pelo método de Sperman-Kärber; n = 5 animais/grupo.

#### 10. Teste de bioatividade das crotaminas nativa e irradiada

A injeção intraperitoneal das crotaminas nativa ou irradiada provocou a paralisia das patas posteriores de camundongos (FIG 11).



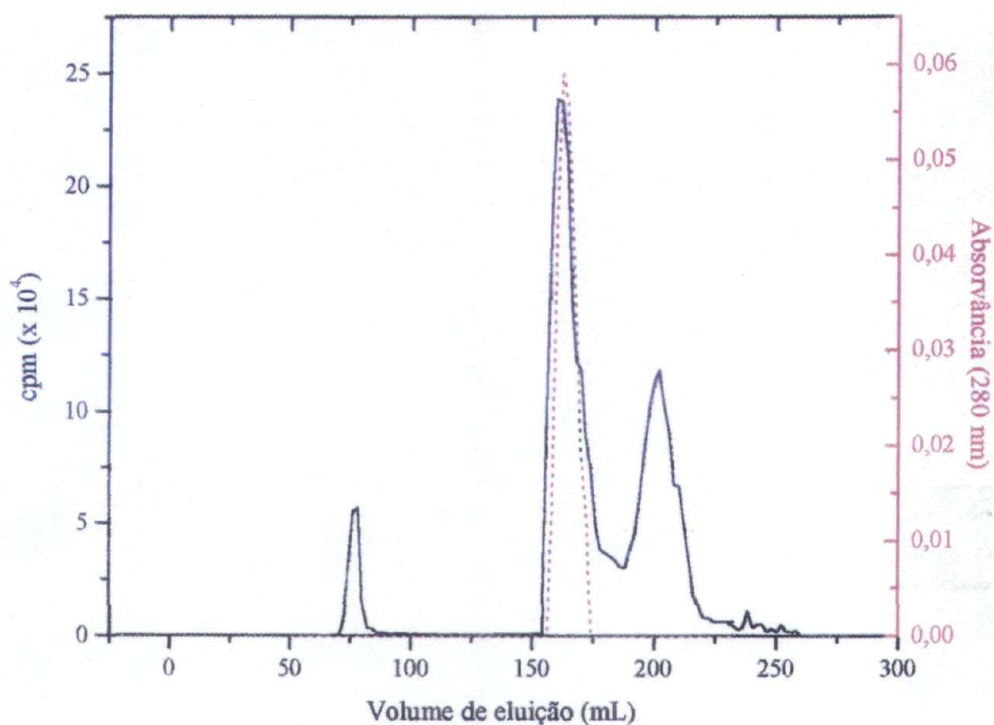
**Figura 11.** Efeito característico da crotamina, após aplicação intraperitoneal em camundongos.

#### 11. Marcação com $^{125}\text{I}$ da crotamina nativa

A marcação com  $^{125}\text{I}$  da crotamina nativa mostrou uma recuperação de radioatividade após a purificação de 53,5% e rendimento do mercado 47%.

### 11.1. Purificação da crotamina nativa radioiodada

Os perfis de eluição das crotamina nativa radioiodada e crotamina nativa em coluna de exclusão molecular em gel Sephadex G-50 mostraram que os picos da radioatividade e o protéico coincidiram (FIG.12).



**Figura 12.** Cromatografia de exclusão molecular de crotamina nativa marcada com <sup>125</sup>I (—) e crotamina nativa (--) em tampão ácido fosfórico/fosfato de sódio 50 mM, pH 7,4, em coluna Sephadex G-50 (2,5 x 47cm). Taxa de fluxo: 0,2 mL/min. Temperatura: 4°C.

## 12. Biodistribuição da crotamina nativa radioiodada

As curvas ajustadas aos dados obtidos de concentração sanguínea, corresponderam à combinação linear de dois termos exponenciais, cuja forma pode ser representada pela expressão:

$$Cs(t) = A_1 \times e^{-b_1 t} + A_2 \times e^{-b_2 t} \quad (3)$$

Os valores dos parâmetros  $A_1$  e  $A_2$ , bem como dos coeficientes exponenciais  $b_1$  e  $b_2$  para a crotamina nativa, calculados por meio do programa computacional, estão mostrados na TAB.4.

Foi realizado o teste F para a curva ajustada para a crotamina nativa e não houve diferença estatisticamente significante entre os dados experimentais obtidos e os valores ajustados.

**Tabela 4.** Valores dos parâmetros do ajuste da curva de concentração sanguínea de crotamina nativa radioiodada.

Parâmetro	Valor calculado	Desvio Padrão
A1	36593	5143
b1	0,102	0,032
A2	-29601	9436
b2	3,6	2,4

Considerando-se que a equação encontrada para a concentração sanguínea segue o modelo de um processo cinético de primeira ordem, determinou-se o tempo de concentração sanguínea máxima ( $t_{m\acute{a}x}$ ) por meio da equação abaixo (Cid, 1982):

$$t_{m\acute{a}x} = \frac{\ln b_2 / b_1}{b_2 - b_1} \quad (4)$$

A crotamina nativa foi rapidamente absorvida, pois dentro de 1 hora observou-se o pico máximo de concentração sanguínea, como mostrado pelas TAB.5 e a FIG. 13.

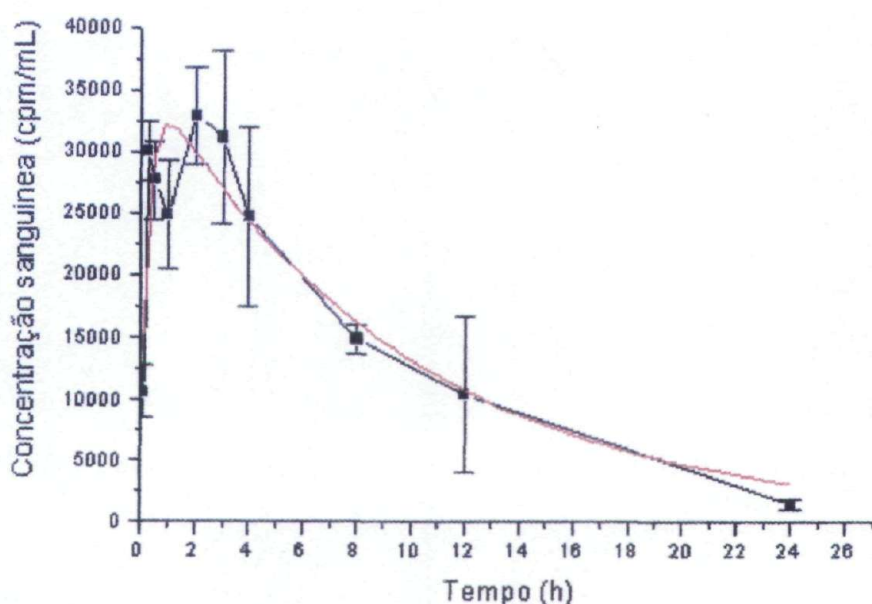
A TAB.6 mostra, em ordem decrescente, que fígado, rins, músculo esquelético apresentaram as maiores quantidades de crotamina nativa em todos os intervalos de tempo, enquanto que pulmões e baço mostraram as menores quantidades de crotamina nativa. No

cérebro não foi detectada crotamina nativa. As maiores quantidades teciduais de crotamina nativa foram detectadas cerca de 1 hora após a injeção.

**Tabela 5.** Concentração sanguínea de crotamina nativa radioiodada em camundongos, após administração, i.p., de  $2,4 \times 10^6$  cpm.

Tempo (h)	Animal # 1	Animal #2	Animal #3	Animal #4	Animal #5	Média $\pm$ DP
0,08	13943	9034	10136	11419	8643	10635 $\pm$ 2141
0,25	33614	29576	28792	30932	27371	30057 $\pm$ 2370
0,50	29338	22102	28190	29838	28926	27679 $\pm$ 3175
1,00	32061	20426	23584	22653	25657	24876 $\pm$ 4434
2,00	33076	30789	38350	29322	-	32884 $\pm$ 3958
3,00	31572	35673	27967	21252	39158	31124 $\pm$ 6944
4,00	26319	20237	24262	16878	35836	24706 $\pm$ 7210
8,00	15215	13697	13785	16523	15068	14858 $\pm$ 1167
12,00	21030	8559	4621	10095	7669	10395 $\pm$ 6271
24,00	2176	1387	1763	1219	1087	1526 $\pm$ 443

Resultados expressos em cpm/mL; DP - desvio padrão; n =4 - 5 animais; # - número do camundongo em cada tempo.



**Figura 13.** Concentração sanguínea de crotamina nativa radioiodada em diferentes intervalos de tempo, após administração i.p.. Os dados representam a média para 4 - 5 camundongos. A curva em vermelho representa o ajuste.

**Tabela 6.** Distribuição tecidual de crotamina nativa marcada com  $^{125}\text{I}$  em diferentes intervalos de tempo, após injeção intraperitoneal.

Tempo (h)	Fígado	Rins	Músculo esquelético	Baço	Pulmão	Cérebro
0,08	2,0 ± 1,1	1,2 ± 0,4	0,45 ± 0,17	0,72 ± 0,40	0,13 ± 0,09	0,019 ± 0,004
0,25	5,2 ± 1,5	3,3 ± 0,7	0,48 ± 0,18	0,67 ± 0,23	0,29 ± 0,04	0,010 ± 0,007
0,50	10,0 ± 2,0	5,1 ± 1,5	0,70 ± 0,04	0,63 ± 0,12	0,21 ± 0,06	0,008 ± 0,005
1,00	10,0 ± 4,0	4,8 ± 1,6	1,1 ± 0,4	0,23 ± 0,10	0,27 ± 0,07	0,013 ± 0,005
2,00	14,0 ± 6,0	6,3 ± 2,0	1,1 ± 0,1	0,17 ± 0,10	0,22 ± 0,12	0,013 ± 0,006
3,00	10,0 ± 2,0	5,9 ± 1,9	0,73 ± 0,20	0,26 ± 0,07	0,20 ± 0,07	0,019 ± 0,008
4,00	5,7 ± 2,2	3,6 ± 1,0	0,79 ± 0,15	0,16 ± 0,03	0,19 ± 0,04	0,021 ± 0,009
8,00	8,8 ± 2,2	1,1 ± 0,2	0,60 ± 0,06	0,11 ± 0,02	0,11 ± 0,03	0,010 ± 0,0015
12,00	5,2 ± 1,6	1,3 ± 0,3	0,28 ± 0,09	0,04 ± 0,01	0,05 ± 0,03	0,006 ± 0,0010
24,00	1,3 ± 0,5	0,24 ± 0,06	0,48 ± 0,15	0,014 ± 0,006	0,015 ± 0,003	0,002 ± 0,0017

Resultados expressos como média ± desvio padrão das porcentagens das doses injetadas; n= 4 - 5 camundongos.

### 13. Bioatividade da crotamina iodada

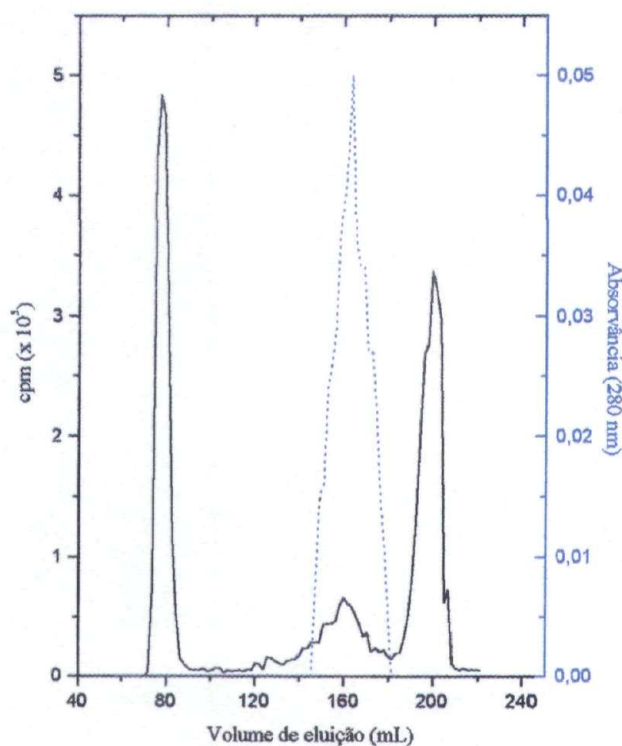
Observou-se que 80% dos camundongos injetados com crotamina nativa marcada com  $^{127}\text{I}$  apresentaram paralisia das patas posteriores 6 minutos após a injeção e 25% deles morreram após 48 horas.

### 14. Marcação com $^{125}\text{I}$ da crotamina irradiada

A marcação com  $^{125}\text{I}$  da crotamina irradiada mostrou uma recuperação da radioatividade após a purificação 68,7% e rendimento do marcado de 15%.

#### 14.1. Purificação da crotamina irradiada radioiodada

Os perfis de eluição das crotamina irradiada radioiodada e crotamina irradiada em coluna de exclusão molecular em gel Sephadex G-50 mostraram que os picos da radioatividade e o protéico coincidiram (FIG.14).



**Figura 14.** Cromatografia de exclusão molecular de: crotamina irradiada marcada com  $^{125}\text{I}$  (—) e crotamina irradiada (--) em tampão ácido fosfórico/fosfato de sódio 50 mM, pH 7,4, em coluna Sephadex G-50 (2,5 x 47 cm). Taxa de fluxo: 0,2 mL/min. Temperatura: 4°C.

### 15. Biodistribuição da crotamina irradiada

Da mesma forma que para a crotamina nativa, a curva ajustada aos dados obtidos de concentração sanguínea da crotamina irradiada corresponderam à combinação linear de dois termos exponenciais, seguindo a mesma representação.

Foi realizado o teste F para a curva ajustada para a crotamina irradiada e não houve diferença estatisticamente significativa entre os dados experimentais obtidos e os valores ajustados.

**Tabela 7.** Valores dos parâmetros de ajuste da curva de concentração sanguínea da crotamina irradiada.

Parâmetro	Valor calculado	Desvio Padrão
A1	59844	37873
b1	0,28	0,12
A2	-41805	36567
b2	0,98	0,71

Considerando-se que a equação encontrada para a concentração sanguínea também segue o modelo de um processo cinético de primeira ordem, determinou-se o tempo de concentração sanguínea máxima ( $t_{máx}$ ) da mesma forma que para a crotamina nativa.

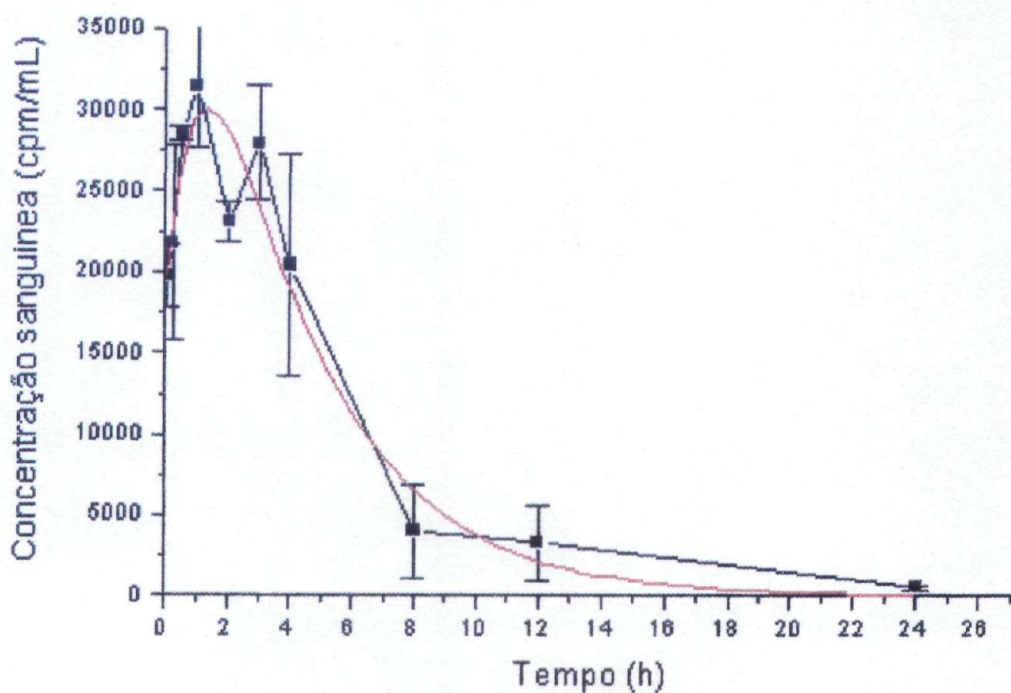
A crotamina irradiada foi rapidamente absorvida, atingindo concentração sanguínea máxima em 1,8 horas, como mostrado pelas TAB 8 e FIG 15.

A TAB.9 mostra, em ordem decrescente, que rins, fígado, músculo esquelético e sangue tiveram as maiores quantidades de crotamina irradiada em todos os intervalos de tempo, enquanto que pulmão, baço mostraram as menores quantidades de crotamina irradiada. A crotamina irradiada não foi detectada no cérebro. As maiores quantidades de crotamina irradiada nos tecidos foram detectadas próximos de 1 hora após a injeção.

**Tabela 8.** Concentração sanguínea de crotamina irradiada radioiodada em camundongos, após administração, i.p., de  $1,3 \times 10^6$  cpm.

Tempo (h)	Animal # 1	Animal #2	Animal #3	Animal #4	Animal #5	Média ± DP
0,08	18293	18422	18522	21294	22385	19783 ± 1918
0,25	23671	24158	27278	22493	11465	21813 ± 6049
0,50	28791	29131	28027	28103	28518	28514 ± 465
1,00	31186	25535	31032	33565	35365	31336 ± 3707
2,00	25401	22366	22423	22500	22835	23105 ± 1296
3,00	29547	31337	24438	23943	30507	27954 ± 3498
4,00	23372	12545	19371	30398	16455	20428 ± 6840
8,00	2222	8976	4185	3233	1617	4047 ± 2925
12,00	6623	1966	1624	3005	-	3305 ± 2289
24,00	607	624	387	446	666	546 ± 122

Resultados expressos em cpm/mL; DP - desvio padrão da média; =4 - 5 animais; # número do camundongo em cada tempo.



**Figura 15.** Concentração sanguínea de crotamina irradiada radioiodada em diferentes intervalos de tempo, após administração i.p.. Os dados representam a média e o desvio padrão para 4-5 camundongos. A curva em vermelho representa o ajuste.

**Tabela 9.** Distribuição tecidual de crotamina irradiada marcada com  $^{125}\text{I}$  em diferentes intervalos de tempo, após injeção intraperitoneal.

Tempo (h)	Fígado	Rins	Músculo esquelético	Baço	Pulmões	Cérebro
0,08	1,2 ± 0,7	1,0 ± 0,3	0,56 ± 0,18	0,47 ± 0,26	0,16 ± 0,04	0,008 ± 0,004
0,25	1,9 ± 0,3	4,9 ± 0,4	1,21 ± 0,23	0,53 ± 0,15	-	0,016 ± 0,007
0,50	1,4 ± 0,2	7,9 ± 1,3	0,75 ± 0,22	0,33 ± 0,04	0,20 ± 0,03	0,008 ± 0,005
1,00	2,4 ± 0,5	15,1 ± 2,3	0,81 ± 0,19	0,29 ± 0,08	0,20 ± 0,02	0,011 ± 0,005
2,00	2,2 ± 0,4	16,0 ± 0,8	0,56 ± 0,10	0,14 ± 0,02	0,18 ± 0,03	0,011 ± 0,006
3,00	2,3 ± 0,2	14,0 ± 1,4	0,73 ± 0,24	0,17 ± 0,03	0,16 ± 0,05	0,011 ± 0,008
4,00	2,3 ± 0,3	11,7 ± 1,3	0,64 ± 0,21	0,13 ± 0,04	-	0,012 ± 0,009
8,00	1,2 ± 0,3	7,3 ± 0,5	0,26 ± 0,07	0,047 ± 0,004	0,04 ± 0,01	0,0048 ± 0,0015
12,00	0,96 ± 0,19	5,9 ± 0,5	0,28 ± 0,09	0,05 ± 0,02	0,04 ± 0,02	0,0058 ± 0,0010
24,00	0,49 ± 0,07	2,82 ± 0,08	0,11 ± 0,01	0,017 ± 0,006	0,014 ± 0,004	0,0059 ± 0,0017

Resultados expressos como média ± desvio padrão das porcentagens das doses injetadas; n= 4- 5 camundongos.

## DISCUSSÃO

O fracionamento do veneno bruto de *Crotalus durissus terrificus* foi feito por cromatografia de exclusão molecular em gel Sephadex<sup>R</sup> G100 (FIG.1). Este fracionamento baseia-se no tamanho das moléculas dos componentes, onde, primeiramente, são eluídas as moléculas maiores, e permite a separação de quatro frações. Analisando-se o perfil cromatográfico da exclusão, observa-se que as frações 3 e 4, crotoxina e crotamina, foram as mais representativas. Um perfil de eluição similar ao observado na FIG.1 é obtido em todos os casos de veneno crotálico, exceto para venenos de cascavéis crotamina negativo, que não apresentam o pico 4 (Teno et al., 1990). A fração 1 contém a convulxina, uma toxina de alto peso molecular, capaz de induzir agregação plaquetária (Prado-Franceschi & Vital-Brazil, 1981); a fração 2 contém a giroxina, enzima com atividade similar à trombina (Barrio, 1961); a fração 3 contém crotoxina, uma neurotoxina potente (Slotta & Fraenkel-Conrat, 1938) e a fração 4 contém a crotamina (Gonçalves & Vieira, 1950).

Uma segunda etapa da purificação da crotamina foi realizada para a obtenção desta toxina com alto grau de homogeneidade (FIG.2). Sabendo-se que a crotamina é uma proteína básica, utilizou-se para esta fase a cromatografia por troca iônica empregando-se uma coluna catiônica em tampão ácido fosfórico/fosfato de sódio (Spencer et al., 1998). A análise da crotamina quanto ao seu grau de homogeneidade foi feita por meio de SE-HPLC (FIG.3), RP-HPLC em coluna analítica, empregando-se gradiente linear de acetonitrila/água contendo ácido trifluoroacético (FIG.4) e SDS-PAGE-glicina (dados não mostrados). Na eletroforese em SDS-PAGE-glicina obteve-se uma banda larga de crotamina devido às características estruturais inerentes à molécula. Esta toxina é um polipeptídeo formado por 42 resíduos de aminoácidos, constituído de dois lóbulos (Beltran & Mascarenhas, 1990) com resíduo de prolina central. O resíduo de prolina forma um eixo de rotação entre os dois aminoácidos adjacentes, resultando na banda larga (Aird, S. D., comunicação pessoal).

Adicionalmente, os cinco resíduos de aminoácidos da extremidade N-terminal foi confirmada por meio do seqüenciamento de aminoácidos nesta região.

Apesar da determinação da composição de uma proteína fornecer poucas informações estruturais específicas, optou-se pela análise de aminoácidos da crotamina porque é sabido que a irradiação de proteína é capaz de destruir aminoácidos, preferencialmente, os aromáticos. O método de hidrólise empregado (HCl 6 N a 110°C por

24 horas) ocasiona a degradação do triptofano, o que impossibilita sua detecção, ao passo que a asparagina e glutamina são convertidos quantitativamente em ácido aspártico e em ácido glutâmico, respectivamente. As proporções molares obtidas para cada aminoácido na crotamina apresentaram boa correlação entre os valores esperados e observados (TAB.2). A análise de aminoácidos também confirmou que a crotamina não possui os aminoácidos valina, treonina e alanina, demonstrando, assim, que a toxina estava pura.

Com relação à crotamina irradiada, procedeu-se ao seqüenciamento dos cinco resíduos de aminoácidos na região amino terminal na tentativa de se verificar a ocorrência de possíveis alterações da proteína. Similarmente ao que foi mostrado para a crotamina nativa, a seqüência de aminoácidos obtida foi: Y-K-Q-C-H. A análise de aminoácidos da crotamina irradiada também mostrou um perfil similar ao da crotamina nativa, indicando assim que a radiação gama não alterou a composição desta proteína.

As concentrações protéicas das amostras de crotamina nativa e irradiada não foram diferentes (TAB.1), evidenciando que na dose de radiação gama utilizada não houve perda do conteúdo protéico. Estes dados estão de acordo com os obtidos por Costa (1988).

A avaliação espectrofotométrica de absorção da crotamina irradiada na região ultravioleta mostrou um aumento na absorção na região de 230 a 350 nm, indicando uma maior exposição dos grupos cromóforos e isto, possivelmente, se deveu ao desdobramento das cadeias polipeptídicas (FIG.5). O espectro obtido com a crotamina irradiada foi similar aos descritos para venenos irradiados de *Crotalus durissus terrificus* (Murata, 1988), de serpentes indianas (Baride et al., 1980) e também de *Apis mellifera* (Costa et al., 1999). Frente à estes dados, poder-se-ia sugerir que o aumento de absorção na região ultravioleta causado pela radiação gama é um fenômeno inespecífico para proteínas irradiadas. Esta premissa é fortalecida pela observação de Barron & Finkeslstein (1952) que mostraram um aumento na absorção da luz ultravioleta na região de 220 a 250 nm para as soluções aquosas de albuminas irradiadas com raios X.

As proteínas, em geral, absorvem luz em comprimentos de onda situados entre 180 e 300 nm, devido à presença de cromóforos. Entre 250 a 300 nm, com pico máximo em 280 nm, a absorção deve-se, principalmente, aos grupos R dos aminoácidos aromáticos. Entre 190 e 200 nm, o espectro de uma proteína reflete a absorção das ligações peptídicas, sendo influenciada pela conformação do estado nativo da proteína (Smith et al.,1985). A avaliação das crotaminas nativa e irradiada em espectrofotometria de absorção em UV mostrou que não houve alteração da absorção na região de 200 a 220 nm, sugerindo, assim,

que a radiação gama não foi capaz de modificar a estrutura primária desta proteína, o que está de acordo com os resultados obtidos na análise de aminoácidos destas crotaminas.

Em relação à estrutura secundária, o espectro de dicroísmo circular da crotamina nativa na região de 190-260 nm (FIG.7) não se assemelha a qualquer espectro dos modelos padrões para conformação de polipeptídeos conhecidos (Cameron & Tu, 1977). No entanto, é muito semelhante ao espectro de dicroísmo circular obtido para a miotoxina a, toxina que difere da crotamina somente em três aminoácidos. Os espectros da crotamina e da miotoxina a entre a região 195 a 250 nm são muito similares, com leves diferenças na intensidade e posição das bandas (Cameron & Tu, 1978).

Como se pode observar no espectro de dicroísmo circular da crotamina nativa, a ligação peptídica máxima apareceu em torno de 198 nm e a mínima em 207 nm, tendo o máximo de ligação não peptídica em 225 nm e o mínimo em 235 nm (FIG.7). A presença dessas duas bandas não é devido às contribuições das ligações peptídicas, mas possivelmente, devido às cadeias laterais de tirosina e triptofano ou ambas. A ausência de uma forte banda negativa em 192 nm e de padrão duplo de bandas negativas em 204 e 224 nm excluem a conformação  $\alpha$ . Esses dados sugerem que a crotamina nativa, assim como a miotoxina a, não contém proporções significativas de  $\alpha$  hélice. Kawano et al. (1982) determinaram a estrutura secundária da crotamina por espectroscopia de Raman, mostrando segmentos em folha  $\beta$  e  $\alpha$ -hélice, com predominância da primeira forma. Resultados similares foram obtidos para a miotoxina a, por Bailey et al. (1979) que mostraram quantidades significativas de estruturas  $\beta$ , mas quantidades pequenas de  $\alpha$  hélice ou enrolamento ao acaso.

Houve uma leve diferença nos espectros das crotaminas nativa e irradiada (FIG.7). O espectro do dicroísmo circular da crotamina irradiada foi característico de proteína desnaturada e mostrou uma ampla negatividade sobre a região 198-245 nm, sugerindo, assim, uma conformação ao acaso.

As análises realizadas por espectrometria de massa para as crotaminas nativa e irradiada mostraram um pico principal de massa de 14244,4 Da. para a toxina nativa (FIG.8), cerca de 2,92 vezes a massa da crotamina nativa, sugerindo algum tipo de interação molécula-molécula que não foi alterada pela presença de acetoneitrila. O segundo pico, cuja massa foi de 14150,1 Da, pode ser um trímero de isoforma (FIG.9). Hampe, (1989) mostrou, por meio de análise espectrofotométrica, a polimerização da crotamina em concentrações de 10 a 40  $\mu\text{g/mL}$  e descreveu um equilíbrio entre monômeros, dímeros e

trímeros. Este modelo foi confirmado por eletroforese em gel de poliacrilamida (Hampe et al., 1990). Estudos realizados por Teno et al., (1990) mostraram que ocorreu alto nível de polimerização da crotamina o qual começou com a forma dimérica, chegando até formar hexâmero. Endo et al., (1989) utilizando espectroscopia de ressonância magnética nuclear (NMR), sugeriram a presença de dois estados conformacionais na crotamina em solução. A coexistência desses dois estados pode refletir leve isomerismo dos resíduos de prolina, modificações da estrutura covalente ou formação não usual de dímero.

Há dados na literatura mostrando a existência de múltiplas formas das miotoxinas pequenas no mesmo veneno. Aird et al., (1991) e Griffin & Aird (1990) reportaram múltiplas formas de miotoxina  $\alpha$  no veneno de um espécime de *Crotalus viridis viridis*. Recentemente, Nedelkov & Bieber (1997) demonstraram a existência de isômeros conformacionais de crotamina, miotoxina  $\alpha$  e miotoxina de *Crotalus viridis helleri*, usando eletroforese capilar e espectrometria de massa. Além disso, os resultados obtidos com o seqüenciamento e a clonagem de genes da crotamina indicaram a presença de variantes de crotamina em veneno de *Crotalus durissus terrificus* (Smith & Schmidt, 1990, Rádis-Baptista et al., 1999).

A eluição da crotamina irradiada resultou em três picos, com tempos de retenção menores do que os da toxina nativa. O primeiro pico resultou em uma massa de 4882 Da, que foi compatível com a estrutura primária da crotamina (FIG.9). Já para o pico 2, a massa calculada foi de 4903 Da e o espectro de massa foi complexo, dificultando a sua análise (FIG.10). Provavelmente, a irradiação aboliu a interação molécula-molécula e o produto irradiado seja formado por monômeros em vários estados de oxidação. Davies et al., (1987) mostraram que os radicais livres,  $\bullet\text{OH}$  e  $\bullet\text{OH} + \text{O}_2$ , formados na radiólise da água, afetaram as estruturas secundárias e terciárias da soroalbumina bovina e sugeriram que estas alterações foram conseqüentes de modificações oxidativas na estrutura primária da proteína.

O efeito tóxico da crotamina em camundongos, ilustrado na FIG.11, é caracterizado por indução instantânea de contratura muscular com paralisia tônica severa das patas traseiras. Esta paralisia tem sido atribuída à miotoxicidade da crotamina, responsável pela lesão de fibras musculares esqueléticas (Owby, 1988). Contudo, o mecanismo de ação envolvido ainda é pouco conhecido.

No que diz respeito à avaliação da  $DL_{50}$  da crotamina nativa, encontrou-se o valor de 6,0 mg/kg, após administração intraperitoneal em camundongos (TAB.3). Os valores descritos na literatura são muito variados. Após administração de crotamina, pela via

intraperitoneal em camundongos, foram obtidos os seguintes valores de DL<sub>50</sub>: 0,07 mg/kg (Moussatché et al., 1956 e Giglio et al., 1975); 0,80 mg/kg (Rogerio, 1978); 0,70 mg/kg (Nakazone, 1978) e 32,76 mg/kg (Mancin et al., 1998). Já os valores obtidos com o uso da via endovenosa foram: 3,4 mg/kg (Cheymol et al., 1971b), 4,0 mg/kg (Habermann & Cheng-Raude, 1975) e 1,5 mg/kg (Vital Brazil et al., 1979). O valor encontrado quando se utilizou a via subcutânea foi de 0,46 mg/kg (Mebs et al., 1983).

Além da via de administração, devem ser considerados outros fatores que podem interferir na determinação da DL<sub>50</sub>. O solvente pode influenciar a toxicidade da crotamina, como mostrado por Allen et al. (1986). Eles injetaram 6,3 mg/kg de crotamina em solução aquosa por via subcutânea, em camundongos, e observaram que esta dose não foi letal, enquanto que em solução de acetato de sódio, 0,4 mL, a DL<sub>50</sub> encontrada foi 1,26 mg/kg.

Já é sabido que as descrições das metodologias usadas nas determinações de DL<sub>50</sub> de toxinas são precárias, pois faltam informações tais como a linhagem do animal, o solvente usado, o volume de solução administrado (Aird & Kaiser, 1985). Na determinação da DL<sub>50</sub> de crotamina por Moussatché et al. (1956); Vital Brazil et al. (1979); Mebs et al. (1983); Cheymol et al. (1971b) estas informações foram omitidas. Assim sendo, há dificuldades na padronização de métodos usados para a determinação da DL<sub>50</sub>. Até a década de 80, os métodos usados para purificação de proteínas consistiam de resinas com baixo poder de resolução e era incomum a utilização de técnicas cruzadas e também a confirmação da pureza de proteínas pelo seqüenciamento de aminoácidos, como realizados no presente trabalho. Assim sendo, pode-se presumir que as crotaminas, mais recentemente, obtidas teriam maior grau de pureza e apresentariam menor toxicidade.

Já está bem descrito na literatura que a irradiação de venenos de serpentes e toxinas isoladas causam diminuição de toxicidade (Puranananda, 1972; Kankonkar et al., 1975; Gaitonde et al., 1975; Baride et al., 1980; Herrera et al., 1986; Guarnieri-Cruz et al., 1991; Hati et al., 1990; Murata et al., 1990; Souza-Filho et al., 1992. Murata, 1990; Nascimento et al., 1996; Clissa et al., 1999). Como pode ser observado na TAB.3, o valor da DL<sub>50</sub> da crotamina irradiada foi cerca de duas vezes maior do que o da nativa. Uma diminuição de toxicidade pela radiação gama de <sup>60</sup>Co, também de cerca de duas vezes, foi descrita para a crotaxina (Souza-Filho et al., 1992, e Nascimento et al., 1998). Veneno de *Apis mellifera* irradiado com radiação gama também mostrou diminuição da toxicidade de cerca de duas vezes (Costa, et al., 1999).

A partir da análise dos espectros das crotaminas nativa e irradiada obtidos no dicroísmo circular verificou-se mudança da sua estrutura secundária. Deste modo, poder-

se-ia atribuir a diminuição da toxicidade da crotamina irradiada à esta alteração estrutural. Ainda mais, a crotamina nativa apresentou conformação beta, prevalentemente, enquanto que a crotamina irradiada apresentou conformação ao acaso. Assim sendo, poder-se-ia aventar que esta alteração estrutural afetaria a interação da toxina com o tecido alvo e/ou diminuiria a sua habilidade em modificar o influxo de sódio.

A TAB.6 mostra os resultados da biodistribuição da crotamina nativa administrada intraperitonealmente, em diferentes intervalos durante 24 horas. Ela foi detectada, em ordem decrescente nos seguintes órgãos: fígado, rins, sangue, músculo esquelético. No decorrer das 24 horas, as quantidades de crotamina radioiodada vão diminuindo lentamente até a valores próximos da radiação de fundo. Deve-se ressaltar que a radioatividade encontrada nestes órgãos deve-se à presença de crotamina radioiodada e não à de radioiodo livre, porque o controle feito com a tireóide mostrou que as taxas de contagem são baixas nas primeiras horas, atingindo um pico máximo próximo de doze horas após administração e não detectada taxas de contagens apreciáveis nos pulmões.

A quantidade de crotamina nativa radioiodada detectada mostrou que ela foi rapidamente absorvida, pois dentro de 1 hora após a sua administração foi observado um pico máximo sanguíneo de radioatividade (FIG.13). As quantidades de crotamina nativa radioiodada sanguínea diminuíram rapidamente entre 4 a 8 horas e depois lentamente, entre 8 e 24 horas, até atingir valores próximos da radiação de fundo. À partir destes dados pode-se sugerir que houve metabolismo e/ou eliminação da crotamina nativa dentro de 24 horas.

A quantidade de crotamina nativa radioiodada detectada no fígado, entre 30 e 60 minutos, foi três vezes maior do que a sanguínea e, embora as quantidades hepáticas tenham sido maiores do que as sanguíneas durante as 24 horas, os seus perfis foram similares. Assim, pode-se fortemente sugerir que a crotamina nativa radioiodada tenha metabolismo hepático.

A radioatividade da crotamina nativa foi detectada nos rins em quantidades cerca de 50% maior do que no sangue, entre 0,5 e 4 horas, e cerca de 50% menor do que no fígado durante as 24 h. Este perfil pode sugerir que a crotamina nativa radioiodada e/ou um possível metabólito esteja sendo eliminado pelos rins, não podendo ser descartado metabolismo renal. Não se pode descartar que a radioatividade detectada nos rins possa ser atribuída à presença de  $^{125}\text{I}$  livre. Contudo, isto é pouco provável, uma vez que o perfil da radioatividade renal foi similar ao do sangue e também ao do fígado.

O músculo esquelético apresentou a crotamina nativa radioiodada em quantidades cerca de 300% menores do que as do sangue, entre 15 minutos a 6 horas. Após este período,

as quantidades detectadas no músculo diminuíram lentamente. O perfil muscular das quantidades de crotamina nativa radioiodada foi similar ao sanguíneo. A presença de crotamina nativa radioiodada na musculatura esquelética confirma que a radioatividade detectada deve-se à crotamina porque foi mostrado que crotamina nativa iodada induziu severa paralisia das patas posteriores dentro de 15 minutos após a administração intraperitoneal.

A crotamina nativa radioiodada foi detectada nos pulmões, baço e coração em quantidades muito menores do que a detectada no músculo esquelético, o que poderia indicar afinidade da crotamina por músculo esquelético.

No cérebro, a radioatividade detectada foi similar à radiação de fundo. Este fato é importante porque coloca em dúvida sugestões existentes na literatura de que a crotamina seja capaz de atravessar a barreira hematoencefálica e exercer efeitos no sistema nervoso central (Haberman & Cheng-Raude, 1975 e Mancin et al., 1998).

A crotamina é uma proteína constituída de 42 aminoácidos, possuindo uma tirosina na posição N-terminal. A marcação da crotamina com  $^{125}\text{I}$ , poderia interferir na sua atividade, uma vez que o método baseia-se na iodação do resíduo tirosina desta toxina. Dados da literatura sugerem que a iodação da tirosina aboliu a toxicidade da toxina E, a qual é homóloga da crotamina. (Allen et al., 1996). Assim sendo, no presente trabalho utilizou-se a dose de 6 mg/kg ( $\text{DL}_{50}$ ) de crotamina marcada com  $^{127}\text{I}$  e observou-se que 80% dos camundongos apresentaram paralisia das patas posteriores e 25% dos animais morreram dentro de 48 horas. Assim, demonstrou-se que a iodação da tirosina N-terminal não comprometeu a atividade da crotamina.

A TAB.9 mostra os resultados da biodistribuição da crotamina irradiada administrada intraperitonealmente, em diferentes intervalos durante 24 horas. A radioatividade foi detectada, em ordem decrescente nos: rins, sangue, fígado e músculo esquelético. No decorrer das 24 horas, as quantidades de crotamina irradiada radioiodada vão diminuindo lentamente até alcançar valores próximos da radiação de fundo. A radioatividade encontrada nestes órgãos deve-se à presença de crotamina irradiada radioiodada e não exclusivamente ao radioiodo livre, porque o controle feito com a tireóide mostrou taxas de contagem apreciáveis após a sexta hora, e taxas de contagem muito baixas nos pulmões, semelhante ao perfil observado com crotamina nativa radioiodada.

Similarmente ao ocorrido com a crotamina nativa, a quantidade detectada de crotamina irradiada radioiodada mostrou que ela foi rapidamente absorvida, pois dentro de 1,8 horas após a sua administração foi observado um pico máximo sanguíneo de

radioatividade (FIG. 15). As quantidades de crotamina irradiada radioiodada no sangue diminuíram rapidamente entre 4 a 5 horas e depois lentamente entre 8 e 24 horas, até atingir valores próximos do radiação de fundo, sugerindo a ocorrência de metabolismo e/ou eliminação da toxina irradiada dentro de 24 horas.

O perfil de biodistribuição da crotamina irradiada radioiodada no fígado mostrou que a radioatividade foi detectada em quantidades cerca de 50% menor do que a do sangue durante as primeiras 4 horas, sendo que, posteriormente, houve superposição dos perfis até às 24 horas. Isto sugere que a crotamina irradiada apresente metabolismo hepático, embora menor do que a nativa. Possivelmente, este fato se deva à modificação estrutural induzida pela radiação gama, como mostrado pelo espectro de dicroísmo circular.

A radioatividade detectada nos rins foi maior do que a sanguínea durante as 24 horas. Este perfil pode sugerir que a crotamina irradiada radioiodada e/ou um seu possível metabólito esteja sendo eliminado pelos rins. Não se pode descartar que esteja ocorrendo metabolismo renal. Ainda mais, pode-se sugerir que a radioatividade renal possa ser atribuída à crotamina irradiada radioiodada, e não exclusivamente ao iodo livre, uma vez que o seu perfil foi similar ao obtido para o sangue e fígado.

Os dados acima sugerem que a crotamina irradiada possivelmente tenha sido mais rapidamente metabolizada e eliminada do que a nativa, o que poderia justificar a menor toxicidade desta proteína.

A crotamina irradiada radioiodada foi detectada no músculo esquelético e o seu perfil foi similar ao da nativa. A distribuição da crotamina irradiada para o músculo esquelético corrobora com a observação de que a toxina irradiada foi capaz de induzir paralisia de patas posteriores de camundongos, quando injetada intraperitonealmente.

Similarmente à crotamina nativa, a irradiada radioiodada foi detectada nos pulmões, baço e coração em quantidades muito pequenas, mas no cérebro a radioatividade detectada foi similar à radiação de fundo, o que sugere uma afinidade da crotamina irradiada por músculo esquelético.

## CONCLUSÕES

O método de purificação utilizado para o isolamento da crotamina foi adequado, uma vez que os métodos para avaliação da homogeneidade da proteína mostrou crotamina pura.

A radiação gama não alterou a concentração protéica, não induziu a formação de agregados e fragmentos e não modificou a composição da crotamina.

A radiação gama alterou o espectro de absorção ultravioleta e provocou discreta alteração na estrutura secundária da crotamina.

Os resultados de espectrometria de massa sugeriram que a radiação gama alterou a interação molécula-molécula e induziu modificações oxidativas na crotamina.

A radiação gama atenuou a toxicidade da crotamina em cerca de duas vezes. O valor da dose letal a 50% (DL<sub>50</sub>) obtido em camundongos, por via i.p., para a crotamina nativa foi 6,00 mg/kg, enquanto que, para a crotamina irradiada foi 11,55 mg/kg.

A mudança da estrutura secundária da crotamina induzida pela radiação gama, mostrada pelo dicroísmo circular, poderia ser responsável pela diminuição da toxicidade.

A radiação gama não aboliu a atividade biológica da crotamina, ou seja, paralisia das patas posteriores de camundongos.

A iodação da tirosina N-terminal da crotamina nativa não aboliu a atividade biológica da mesma.

O estudo de biodistribuição da crotamina nativa mostrou que ela foi rapidamente absorvida, com pico de concentração sanguínea máxima em 1 hora. Também sugeriu que ela teve metabolismo hepático e eliminação e/ou metabolismo renal e que o músculo esquelético foi o órgão eletivo de ação da toxina.

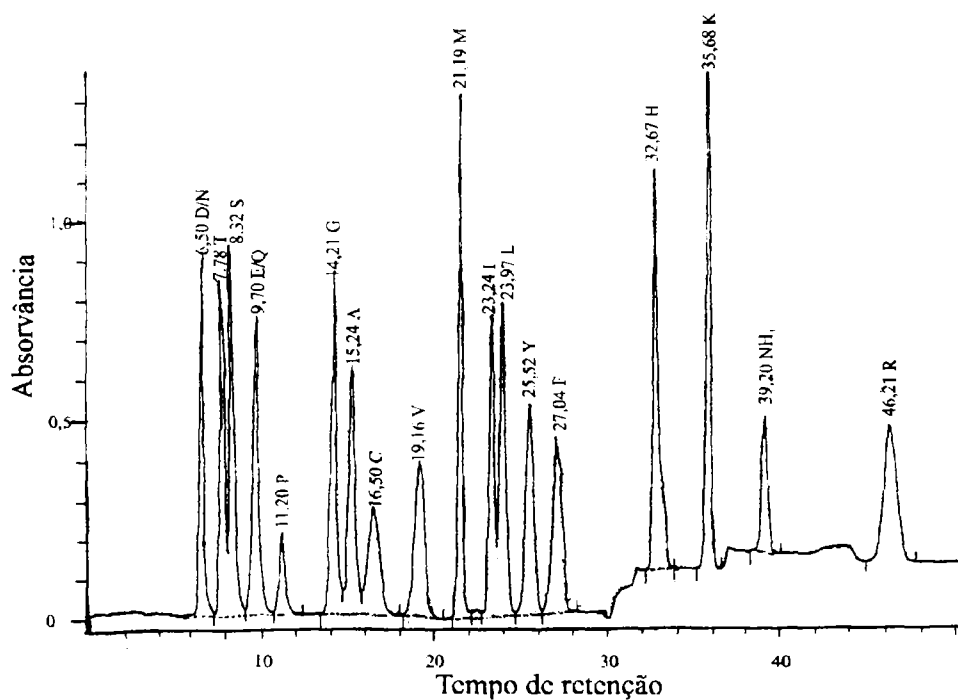
A crotamina não atravessou a barreira hematoencefálica, uma vez que no cérebro foram detectadas taxas de contagem de radiação de fundo.

O estudo de biodistribuição da crotamina irradiada mostrou que ela foi rapidamente absorvida, com pico de concentração sanguínea máxima em 1,8 horas. Também sugeriu que ela teve metabolismo hepático e eliminação e/ou metabolismo renal.

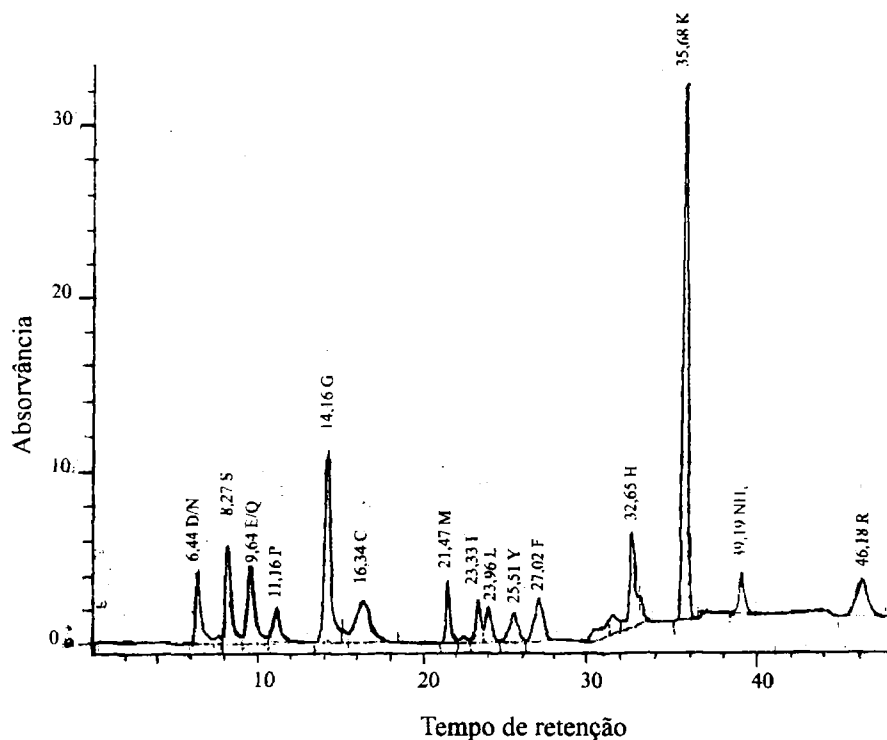
A menor toxicidade da crotamina irradiada poderia ser explicada por ter havido metabolismo e eliminação mais rápidos do que da crotamina nativa.

Similarmente à crotamina nativa, a crotamina irradiada teve afinidade por músculo esquelético e não atravessou a barreira hematoencefálica.

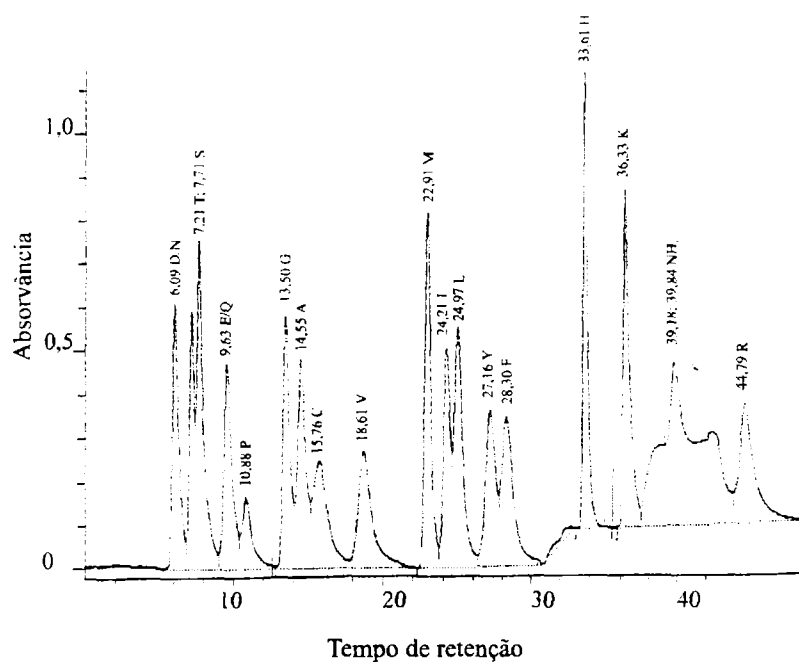
## APÊNDICES



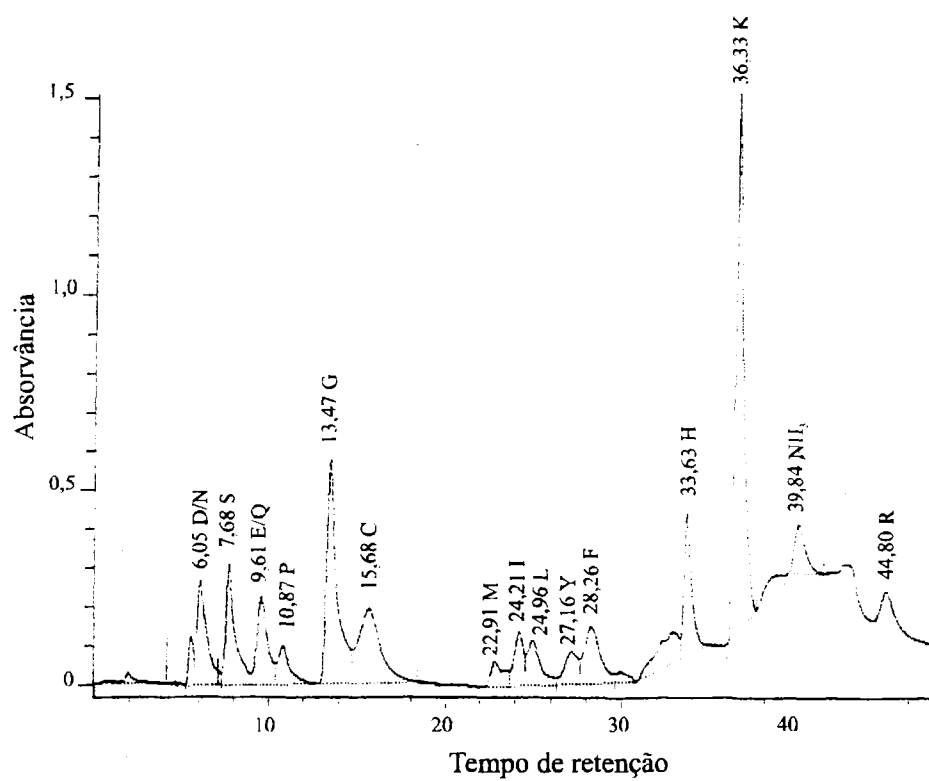
Apêndice 1. Análise de aminoácidos de crotonina nativa. 6 nmoles de padrões.



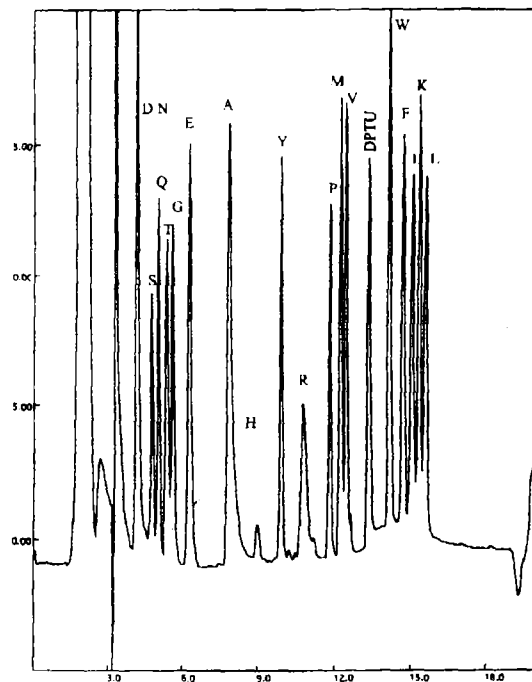
Apêndice 2. Análise de aminoácidos da crotonina nativa. 5 nmoles de crotonina nativa.



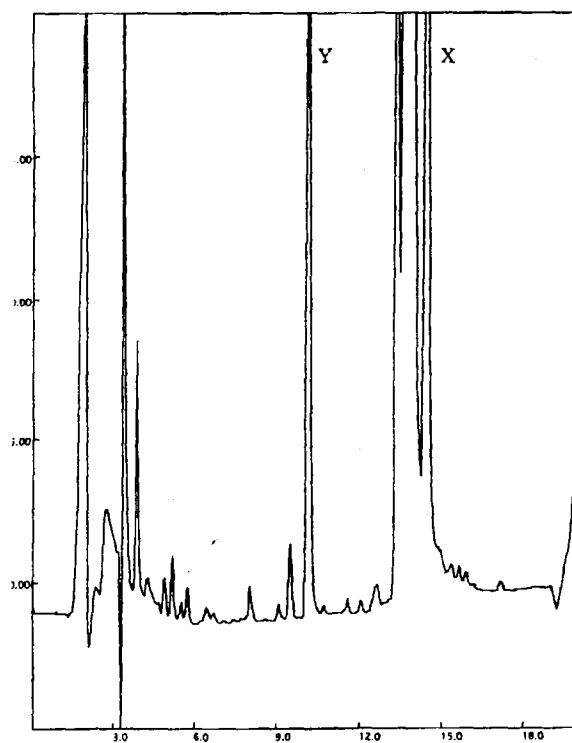
**Apêndice 3.** Análise de aminoácidos da crotamina irradiada. 6 nmoles de padrões.



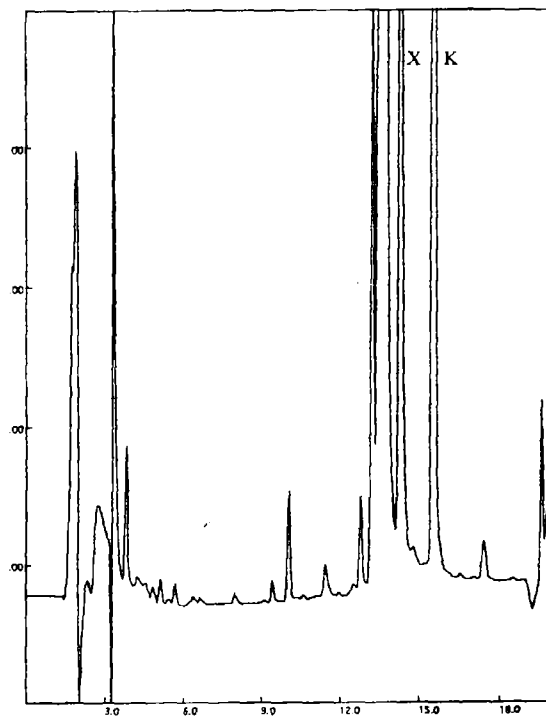
**Apêndice 4.** Análise de aminoácidos da crotamina irradiada. 5 nmoles de crotamina irradiada.



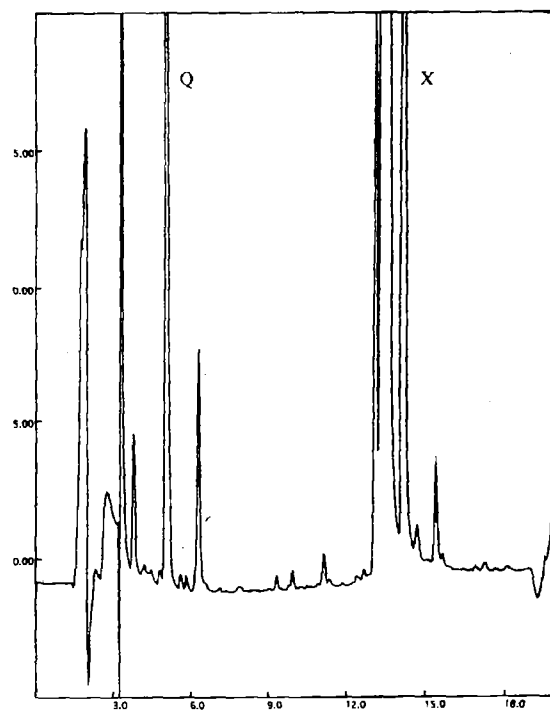
**Apêndice 5.** Seqüenciamento de aminoácidos da crotonina nativa. 450 pmoles. Padrões.



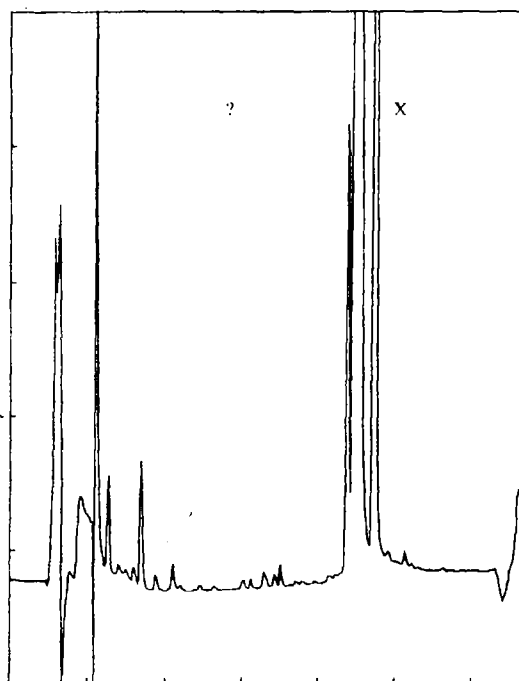
**Apêndice 6.** Seqüenciamento de aminoácidos da crotonina nativa. 450 pmoles. Resíduo 1



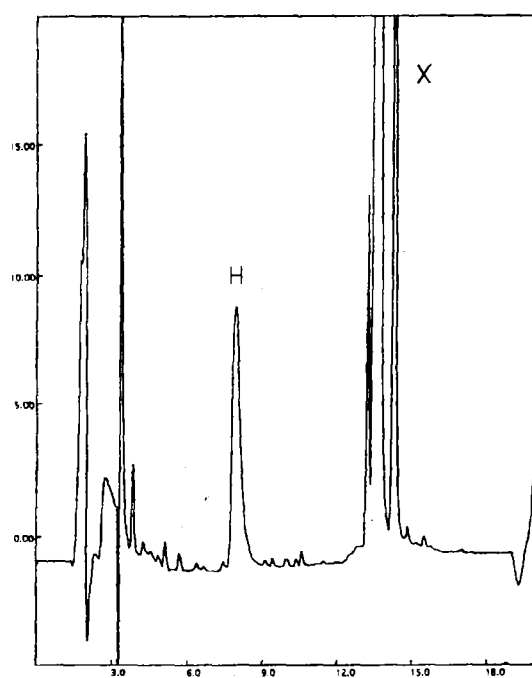
**Apêndice 7.** Seqüenciamento de aminoácidos da crotamina nativa. 450 pmoles. Resíduo 2.



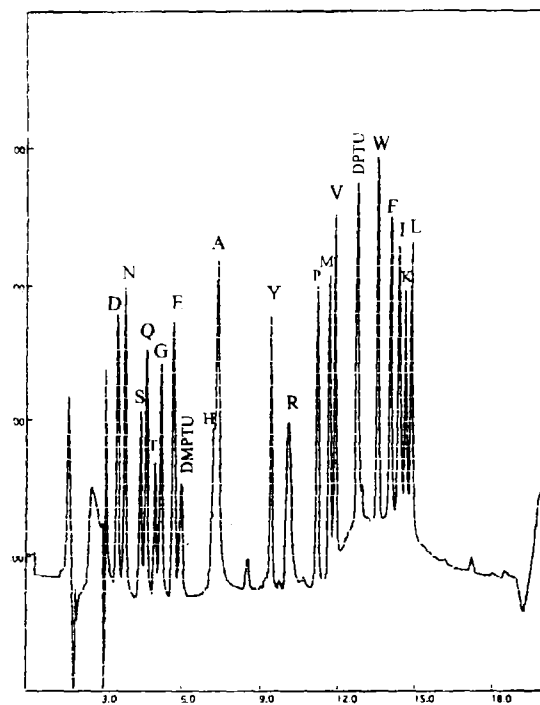
**Apêndice 8.** Seqüenciamento de aminoácidos da crotamina nativa. 450 pmoles. Resíduo 3.



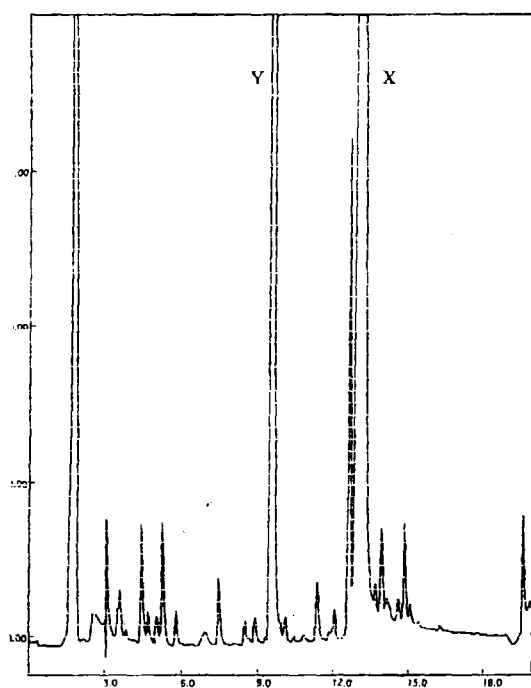
**Apêndice 9.** Seqüenciamento de aminoácidos da crotonamina nativa. 450 pmoles. Resíduo 4.



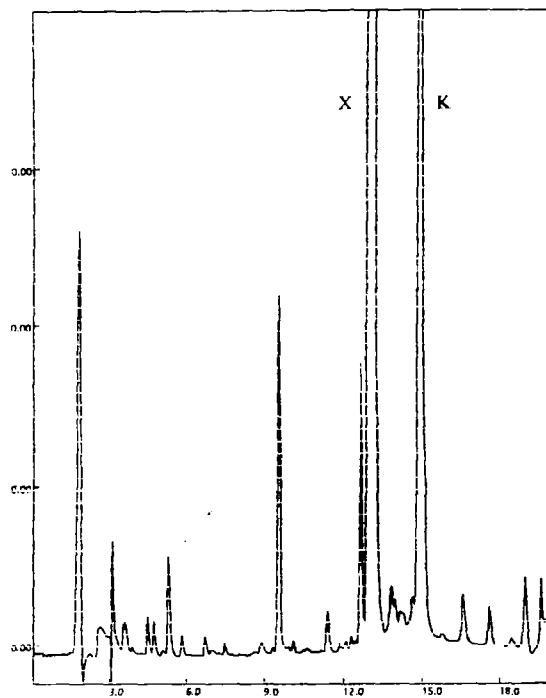
**Apêndice 10.** Seqüenciamento de aminoácidos da crotonamina nativa. 450 pmoles. Resíduo 5.



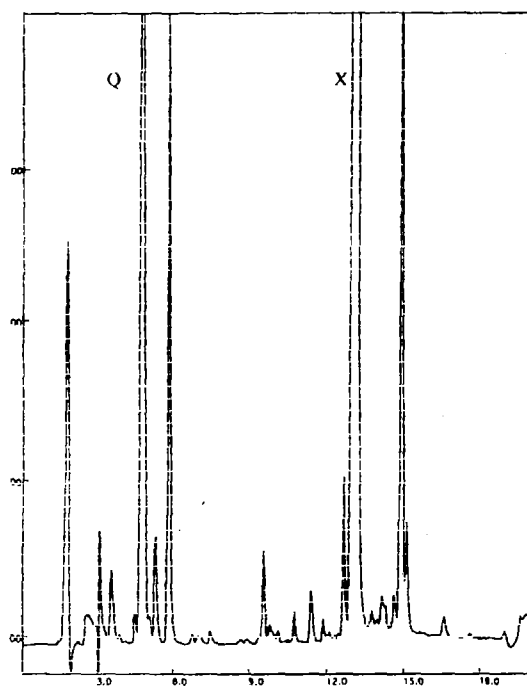
**Apêndice 11.** Seqüenciamento de aminoácidos da crotonina irradiada. 450 pmoles. Padrões.



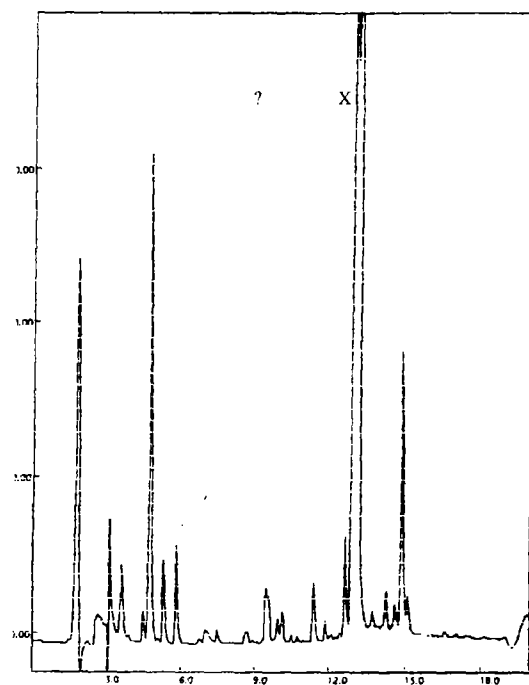
**Apêndice 12.** Seqüenciamento de aminoácidos da crotonina irradiada. 450 pmoles. Resíduo 1.



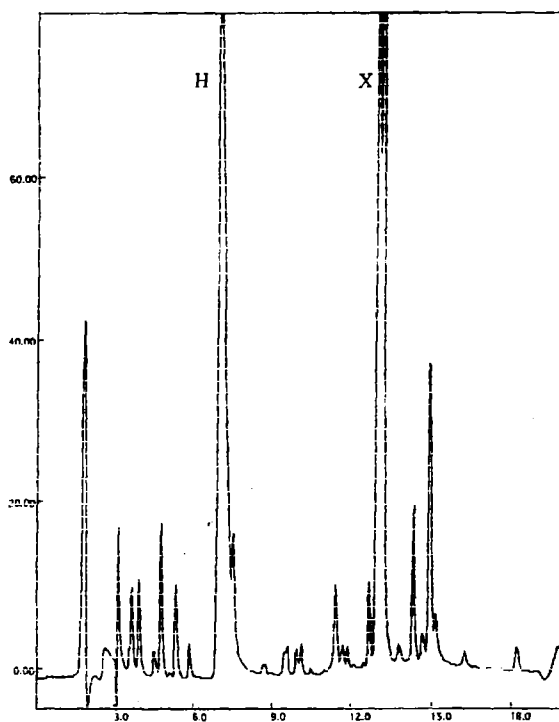
**Apêndice 13.** Seqüenciamento de aminoácidos da crotamina irradiada. 450 pmoles. Resíduo 2.



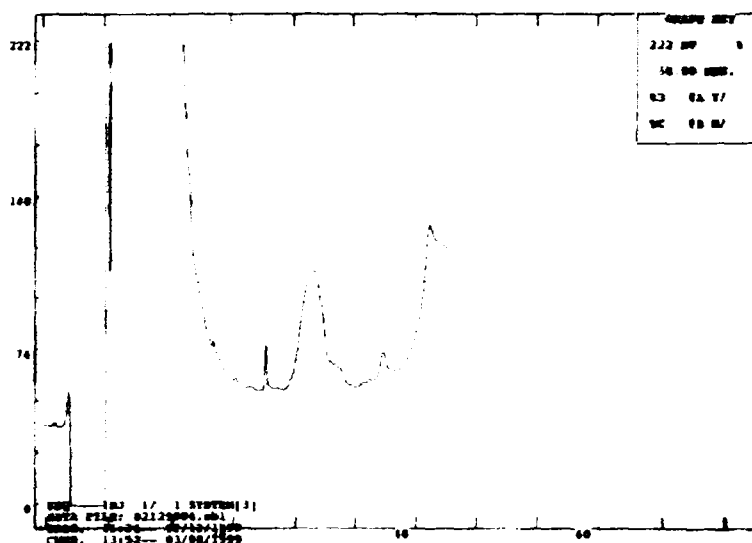
**Apêndice 14.** Seqüenciamento de aminoácidos da crotamina irradiada. 450 pmoles. Resíduo 3.



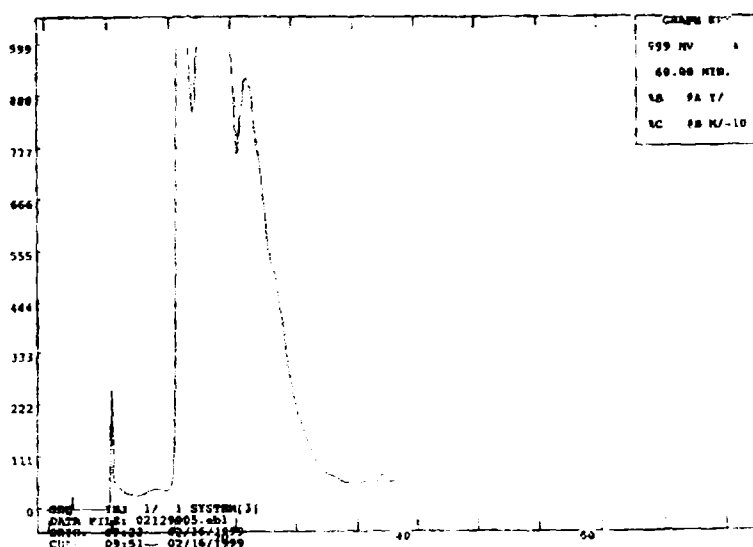
**Apêndice 15.** Seqüenciamento de aminoácidos da crotamina irradiada. 450 pmoles. Resíduo 4.



**Apêndice 16.** Seqüenciamento de aminoácidos da crotamina irradiada. 450 pmoles. Resíduo 5.



**Apêndice 17.** Cromatografia de alto desempenho, sob fase reversa, de crotonamina nativa, 400  $\mu\text{g/mL}$ , em C8 Vydac (250 mm x 180  $\mu\text{m}$ ), utilizando-se gradiente de 5 a 100% de solvente A (ácido fórmico 0,1%) para solvente B (90% de acetonitrila em ácido fórmico 0,1%). Fluxo: 2  $\mu\text{L/min}$ . A proteína foi monitorada pela absorvância em 214 nm.



**Apêndice 18.** Cromatografia de alto desempenho, sob fase reversa, de crotonamina irradiada, 400  $\mu\text{g/mL}$ , em C8 Vydac (250 mm x 180  $\mu\text{m}$ ), utilizando-se gradiente de 5 a 100% de solvente A (ácido fórmico 0,1%) para solvente B (90% de acetonitrila em ácido fórmico 0,1%). Fluxo: 2  $\mu\text{L/min}$ . A proteína foi monitorada pela absorvância em 214 nm.

**Apêndice 19.** Radioatividade total, nos órgãos, após administração de  $2,4 \times 10^6$  cpm de crotamina nativa radioiodada, i.p., em camundongos.

Tempo (h)	Fígado	Rins	Músculo esquelético	Baço	Pulmões	Cérebro
0,08	50743 ± 28184	29376 ± 10096	11046 ± 4153	17763 ± 9877	3118 ± 2207	459 ± 207
0,25	129662 ± 36670	81663 ± 17604	11929 ± 4538	16598 ± 5715	7179 ± 1046	256 ± 113
0,50	248659 ± 58966	126287 ± 37552	17253 ± 971	15728 ± 2880	5172 ± 1565	205 ± 117
1,00	256735 ± 91852	119336 ± 39386	27418 ± 11128	5585 ± 2483	6671 ± 1697	319 ± 95
2,00	341175 ± 153116	155870 ± 49893	27488 ± 1516	4154 ± 2557	5446 ± 3073	334 ± 127
3,00	250018 ± 60316	145255 ± 47237	18115 ± 5064	6336 ± 1655	5059 ± 1728	462 ± 86
4,00	141990 ± 53881	88545 ± 25596	19708 ± 3776	4022 ± 740	4602 ± 1096	518 ± 105
8,00	219311 ± 55113	28129 ± 4778	14757 ± 1549	2612 ± 423	2616 ± 745	256 ± 90
12,00	128796 ± 39049	31304 ± 8425	6848 ± 2135	964 ± 264	1193 ± 637	137 ± 65
24,00	32527 ± 12798	5863 ± 1410	11989 ± 3705	355 ± 158	369 ± 86	58 ± 24

Dados expressos em cpm como média ± desvio padrão, n = 4-5 camundongos.

**Apêndice 20.** Radioatividade total, nos órgãos, após administração de  $1,3 \times 10^6$  cpm de crotamina irradiada radioiodada, i.p., em camundongos.

Tempo (h)	Fígado	Rins	Baço	Músculo	Pulmões	Cérebro
0,08	15543 ± 8468	12953 ± 3375	6041 ± 3291	7227 ± 2303	2056 ± 460	104 ± 56
0,25	23971 ± 3770	63161 ± 5116	6842 ± 1947	15660 ± 2974	-	206 ± 86
0,50	18695 ± 3145	101592 ± 17147	4217 ± 540	9720 ± 2832	2597 ± 342	102 ± 63
1,00	31027 ± 6776	194433 ± 29047	3790 ± 1037	10428 ± 2510	2608 ± 292	143 ± 70
2,00	27968 ± 4890	206019 ± 10404	1747 ± 245	7218 ± 1254	2383 ± 339	146 ± 72
3,00	29195 ± 3119	179759 ± 17754	2133 ± 359	9402 ± 3124	2124 ± 585	142 ± 101
4,00	29170 ± 3972	150569 ± 17410	1686 ± 568	8296 ± 2719	-	159 ± 112
8,00	15567 ± 3518	94126 ± 6655	608 ± 57	3311 ± 842	559 ± 141	62 ± 19
12,00	12434 ± 2404	76306 ± 6342	600 ± 252	3561 ± 1097	459 ± 275	75 ± 13
24,00	6365 ± 934	36344 ± 1001	223 ± 80	1473 ± 145	187 ± 51	76 ± 22

Dados expressos em cpm como média ± desvio padrão, n = 4-5 camundongos.

**Apêndice 21:** Porcentagem da dose injetada, no sangue total, após administração de  $2,4 \times 10^6$  cpm de crotamina nativa radioiodada, i.p., em camundongos.

Tempo (h)	% #1	% #2	% #3	% #4	% #5	Média ± DP
0,08	1,57	0,97	1,12	1,36	1,03	1,2 ± 0,3
0,25	3,84	3,36	3,49	3,23	3,33	3,5 ± 0,2
0,50	3,35	2,55	3,49	3,13	3,27	2,9 ± 0,4
1,00	3,82	2,11	2,70	2,59	2,58	2,8 ± 0,6
2,00	3,69	4,48	2,90	3,28	-	3,6 ± 0,7
3,00	3,39	3,58	3,16	2,38	3,93	3,3 ± 0,6
4,00	2,64	2,10	2,78	1,77	3,84	2,6 ± 0,8
8,00	1,74	1,56	1,88	1,71	1,58	1,7 ± 0,1
12,00	0,90	0,50	1,07	0,84	0,35	0,7 ± 0,3
24,00	0,24	0,15	0,20	0,14	0,12	0,17 ± 0,05

# número do camundongo em cada tempo. DP – desvio padrão

**Apêndice 22.** Porcentagem da dose injetada, no sangue total, após administração de  $1,3 \times 10^6$  cpm de crotamina irradiada radioiodada, i.p., em camundongos.

Tempo (h)	% #1	% #2	% #3	% #4	% #5	Média ± DP
0,08	3,70	3,72	3,74	3,29	4,30	3,7 ± 0,4
0,25	4,71	4,81	5,43	4,48	2,28	4,3 ± 1,2
0,50	6,51	6,59	6,34	6,45	6,36	6,4 ± 0,1
1,00	6,77	6,74	7,68	7,29	5,54	6,8 ± 0,8
2,00	4,92	4,88	4,95	5,03	4,94	4,9 ± 0,1
3,00	5,88	6,24	4,86	4,77	6,07	5,6 ± 0,7
4,00	5,22	2,80	4,32	6,78	3,67	4,6 ± 1,5
8,00	0,50	2,03	0,95	0,73	0,37	0,9 ± 0,7
12,00	1,46	0,43	0,36	0,66	-	0,7 ± 0,5
24,00	0,13	0,13	0,08	0,13	0,09	0,11 ± 0,03

# número do camundongo em cada tempo. DP – desvio padrão

Causa	GL	SQ	QM	F
Tratamento	1	65,829	65,829	3,706
Tempo	18	319,707	17,761	44,645*
Resíduo	78	31,031	0,397	
Total	97	416,568		

\* estatisticamente significantes,  $p \leq 0,05$ .

**Apêndice 23.** Porcentagem da dose injetada, nos rins, após administração de  $2,4 \times 10^6$  cpm de crotamina nativa radioiodada, i.p., em camundongos.

Tempo (h)	% #1	% #2	% #3	% #4	% #5	Média $\pm$ DP
0,08	1,490	0,900	0,790	1,730	1,000	1,2 $\pm$ 0,4
0,25	4,340	3,180	3,080	2,390	3,480	3,3 $\pm$ 0,7
0,50	3,450	5,970	5,760	3,520	6,760	5,1 $\pm$ 1,5
1,00	4,590	2,650	7,090	5,170	4,550	4,8 $\pm$ 1,6
2,00	7,701	4,067	8,251	5,121	0,000	6,3 $\pm$ 2,0
3,00	6,340	4,579	3,524	6,347	8,496	5,9 $\pm$ 1,9
4,00	3,431	4,764	3,480	2,006	4,172	3,6 $\pm$ 1,0
8,00	0,933	1,401	1,265	1,056	1,017	1,1 $\pm$ 0,2
12,00	0,943	1,536	1,708	1,008	1,116	1,3 $\pm$ 0,3
24,00	0,309	0,256	0,153	0,220	0,244	0,24 $\pm$ 0,06

# número do camundongo em cada tempo. DP – desvio padrão

**Apêndice 24.** Porcentagem da dose injetada, nos rins, após administração de  $1,3 \times 10^6$  cpm de crotamina irradiada radioiodada, i.p., em camundongos.

Tempo (h)	% #1	% #2	% #3	% #4	% #5	Média $\pm$ DP
0,08	0,960	1,261	0,933	1,242	0,625	1,0 $\pm$ 0,3
0,25	4,536	4,945	4,854	4,608	5,538	4,9 $\pm$ 0,4
0,50	7,946	9,289	7,005	6,133	9,003	7,9 $\pm$ 1,3
1,00	15,860	18,552	12,768	13,694	14,488	15,1 $\pm$ 2,2
2,00	16,778	15,846	16,356	16,216	14,657	16,0 $\pm$ 0,8
3,00	12,218	14,536	12,706	15,050	15,164	14,0 $\pm$ 1,4
4,00	13,210	11,337	12,164	9,574	12,075	11,7 $\pm$ 1,3
8,00	7,475	7,952	7,360	7,161	6,535	7,3 $\pm$ 0,5
12,00	6,508	6,027	5,325	5,800	-	5,9 $\pm$ 0,5
24,00	2,777	2,913	2,830	2,858	2,710	2,82 $\pm$ 0,08

# número do camundongo em cada tempo. DP – desvio padrão.

Causa	GL	SQ	QM	F
Tratamento	1	763,52174	763,52174	9,664*
Tempo	18	1422,12754	79,00709	47,067*
Resíduo	79	132,60915	1,67860	
Total	98	2318,25843		

\* estatisticamente significante,  $p \leq 0,05\%$ .

**Apêndice 25.** Porcentagem da dose injetada, no fígado após administração de  $2,4 \times 10^6$  cpm de crotamina nativa radioiodada, i.p., em camundongos:

Tempo (h)	% #1	% #2	% #3	% #4	% #5	Média $\pm$ DP
0,08	3,827	2,476	1,040	1,256	1,632	2,0 $\pm$ 1,1
0,25	7,64	5,605	4,569	3,956	4,371	5,2 $\pm$ 1,5
0,50	13,522	10,074	10,746	7,267	8,524	10,0 $\pm$ 2,0
1,00	12,756	6,849	12,017	14,186	5,953	10,0 $\pm$ 4,0
2,00	18,827	6,574	10,640	18,987	-	14,0 $\pm$ 6,0
3,00	8,477	9,316	14,198	8,201	10,214	10,0 $\pm$ 2,0
4,00	4,355	4,715	7,896	3,459	8,202	5,7 $\pm$ 2,2
8,00	7,851	5,809	9,507	11,842	9,207	8,8 $\pm$ 2,2
12,00	6,0777	4,976	7,412	3,808	3,694	5,2 $\pm$ 1,6
24,00	2,0596	1,249	0,978	0,959	-	1,3 $\pm$ 0,5

# número do camundongo em cada tempo

**Apêndice 26.** Porcentagem da dose injetada, no fígado, após administração de  $1,3 \times 10^6$  cpm de crotamina irradiada radioiodada, i.p., em camundongos

Tempo (h)	% #1	% #2	% #3	% #4	% #5	Média $\pm$ DP
0,08	1,007	1,126	1,047	2,305	0,539	1,2 $\pm$ 0,7
0,25	1,873	1,519	1,927	2,293	1,678	1,9 $\pm$ 0,3
0,50	1,485	1,098	1,348	1,568	1,747	1,4 $\pm$ 0,2
1,00	3,000	1,598	2,655	2,519	2,255	2,4 $\pm$ 0,5
2,00	2,541	2,475	1,687	1,856	2,282	2,2 $\pm$ 0,4
3,00	2,490	2,328	2,480	1,979	2,039	2,3 $\pm$ 0,2
4,00	2,734	2,154	2,394	1,980	2,044	2,3 $\pm$ 0,3
8,00	1,322	1,594	1,076	1,176	0,865	1,2 $\pm$ 0,3
12,00	0,757	1,127	0,856	1,115	-	0,96 $\pm$ 0,19
24,00	0,421	0,466	0,574	0,567	0,438	0,49 $\pm$ 0,07

# número do camundongo em cada tempo. DP – desvio padrão.

Causa	GL	SQ	QM	F
Tratamento	1	761,49263	761,493	20,851*
Tempo	18	657,37600	36,521	9,909*
Resíduo	77	283,79597	3,686	
Total	96	1702,66459		

\* estatisticamente significantes,  $p \leq 0,05$ .

**Apêndice 27.** Porcentagem da dose injetada, no músculo esquelético, após administração de  $2,4 \times 10^6$  cpm de crotamina nativa radioiodada, i.p., em camundongos

Tempo (h)	% #1	% #2	% #3	% #4	% #5	Média ± DP
0,08	0,593	0,649	0,396	0,317	0,272	0,45 ± 0,17
0,25	0,222	0,620	0,373	0,526	0,665	0,48 ± 0,18
0,50	0,724	0,638	0,688	0,689	0,740	0,70 ± 0,04
1,00	1,410	1,350	1,373	1,050	0,345	1,1 ± 0,4
2,00	1,162	1,140	1,109	1,023	-	1,1 ± 0,1
3,00	0,684	0,995	0,881	0,499	0,594	0,73 ± 0,20
4,00	0,916	0,633	0,854	0,940	0,630	0,79 ± 0,15
8,00	0,680	0,523	0,561	0,635	0,576	0,60 ± 0,06
12,00	0,2244	0,3564	0,1999	0,2175	0,3823	0,28 ± 0,09
24,00	0,5239	0,6307	0,2756	0,5035	-	0,48 ± 0,15

# número do camundongo em cada tempo. DP – desvio padrão.

**Apêndice 28.** Porcentagem da dose injetada, no músculo esquelético, após administração  $1,3 \times 10^5$  cpm de crotamina irradiada radioiodada, i.p., de em camundongos.

Tempo (h)	% #1	% #2	% #3	% #4	% #5	Média ± DP
0,08	0,758	0,727	0,379	0,395	0,542	0,56 ± 0,18
0,25	1,198	1,428	0,996	0,980	1,468	1,21 ± 0,23
0,50	1,089	0,543	0,604	0,846	0,685	0,75 ± 0,22
1,00	0,975	0,732	0,869	0,506	0,959	0,81 ± 0,19
2,00	0,453	0,453	0,638	0,633	0,621	0,56 ± 0,10
3,00	1,150	0,702	0,648	0,593	0,551	0,73 ± 0,24
4,00	0,690	0,512	0,427	0,611	0,976	0,64 ± 0,21
8,00	0,207	0,366	0,262	0,240	0,209	0,26 ± 0,07
12,00	0,366	0,223	0,328	0,187	-	0,28 ± 0,09
24,00	0,112	0,126	0,124	0,099	0,109	0,11 ± 0,01

# número do camundongo em cada tempo. DP – desvio padrão.

Causa	GL	SQ	QM	F
Tratamento	1	0,11406	0,11406	0,266
Tempo	18	7,70750	0,42819	12,611*
Resíduo	77	2,61456	0,03396	
Total	96	10,43612		

\* estatisticamente significantes,  $p \leq 0,05$ .

**Apêndice 29.** Porcentagem da dose injetada, no baço, após administração, de  $2,4 \times 10^6$  cpm de crotamina nativa radioiodada, i.p., em camundongos.

Tempo (h)	% #1	% #2	% #3	% #4	% #5	Média ± DP
0,08	0,719	0,443	0,601	1,395	0,424	0,72 ± 0,40
0,25	0,58	0,572	0,533	1,080	0,581	0,67 ± 0,23
0,50	0,542	0,542	0,570	0,727	0,790	0,63 ± 0,12
1,00	0,331	0,329	0,138	0,203	0,125	0,23 ± 0,10
2,00	0,209	0,244	0,269	0,070	0,045	0,17 ± 0,10
3,00	0,287	0,356	0,233	0,190	0,212	0,26 ± 0,07
4,00	0,207	0,170	0,127	0,160	0,147	0,16 ± 0,03
8,00	0,125	0,081	0,098	0,104	0,118	0,11 ± 0,02
12,00	0,0287	0,046	0,051	0,041	0,027	0,04 ± 0,01
24,00	0,0048	0,019	0,021	0,012	0,015	0,014 ± 0,006

# número do camundongo em cada tempo. DP – desvio padrão.

**Apêndice 30.** Porcentagem da dose injetada, no baço, após administração de  $1,3 \times 10^6$  cpm de crotamina irradiada radioiodada, i.p., em camundongos.

Tempo (h)	% #1	% #2	% #3	% #4	% #5	Média ± DP
0,08	0,472	0,342	0,217	0,891	0,420	0,47 ± 0,26
0,25	0,422	0,746	0,364	0,601	0,519	0,53 ± 0,15
0,50	0,302	0,347	0,321	0,387	0,278	0,33 ± 0,04
1,00	0,402	0,291	0,212	0,341	0,222	0,29 ± 0,08
2,00	0,140	0,140	0,102	0,148	0,147	0,14 ± 0,02
3,00	0,192	0,124	0,170	0,152	0,188	0,17 ± 0,03
4,00	0,201	0,142	0,092	0,121	0,097	0,13 ± 0,04
8,00	0,046	0,045	0,055	0,046	0,044	0,047 ± 0,004
12,00	0,072	0,033	0,051	0,030	-	0,05 ± 0,02
24,00	0,016	0,019	0,027	0,010	0,015	0,017 ± 0,006

# número do camundongo em cada tempo. DP – desvio padrão.

Causa	GL	SQ	QM	F
Tratamento	1	0,15530	0,15530	0,594
Tempo	18	4,70681	0,26149	14,714*
Resíduo	79	1,40395	0,01777	
Total	98	6,26606		

\* estatisticamente significantes,  $p \leq 0,05$ .

**THIS PAGE IS MISSING  
IN THE  
ORIGINAL DOCUMENT**

**Apêndice 33.** Porcentagem da dose injetada, no cérebro, após administração de  $2,4 \times 10^6$  cpm de crotamina nativa radioiodada, i.p., em camundongos.

Tempo (h)	% #1	% #2	% #3	% #4	% #5	Média ± DP
0,08	0,011	0,0310	0,0120	0,0160	0,0230	0,019 ± 0,008
0,25	0,006	0,0090	0,0120	0,0080	0,0170	0,010 ± 0,005
0,50	0,015	0,0093	0,0079	0,0073	0,0019	0,008 ± 0,005
1,00	0,011	0,0090	0,0110	0,0180	0,0160	0,013 ± 0,004
2,00	0,017	0,0060	0,0110	0,0140	0,0190	0,013 ± 0,005
3,00	0,016	0,0190	0,0160	0,0240	0,0180	0,019 ± 0,003
4,00	0,028	0,0190	0,0190	0,0220	0,0170	0,021 ± 0,004
8,00	0,008	0,0160	0,0070	0,0100	0,0100	0,010 ± 0,004
12,00	0,0077	0,0037	0,0066	0,0078	0,0019	0,006 ± 0,003
24,00	0,0025	0,0024	0,0014	0,0016	0,0038	0,002 ± 0,001

# número do camundongo em cada tempo. DP – desvio padrão.

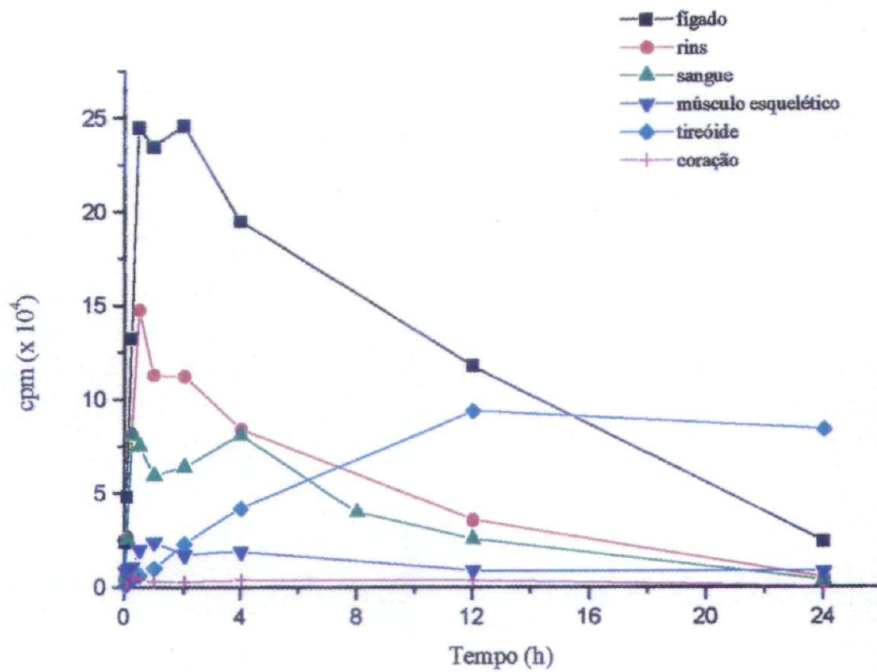
**Apêndice 34.** Porcentagem da dose injetada, no cérebro após administração de  $1,3 \times 10^6$  cpm de crotamina irradiada radioiodada, i.p., em camundongos.

Tempo (h)	% #1	% #2	% #3	% #4	% #5	Média ± DP
0,08	0,007	0,014	0,005	0,011	0,003	0,008 ± 0,004
0,25	0,014	0,010	0,010	0,021	0,025	0,016 ± 0,007
0,50	0,006	0,003	0,014	0,012	0,004	0,008 ± 0,005
1,00	0,007	0,008	0,021	0,009	0,011	0,011 ± 0,005
2,00	0,006	0,009	0,021	0,011	0,010	0,011 ± 0,006
3,00	0,023	0,005	0,007	0,009	-	0,011 ± 0,008
4,00	0,013	0,012	0,004	0,007	0,026	0,012 ± 0,009
8,00	0,005	0,007	0,005	0,004	0,003	0,005 ± 0,002
12,00	0,005	0,006	0,007	0,006	-	0,006 ± 0,001
24,00	0,004	0,005	0,006	0,007	0,008	0,006 ± 0,002

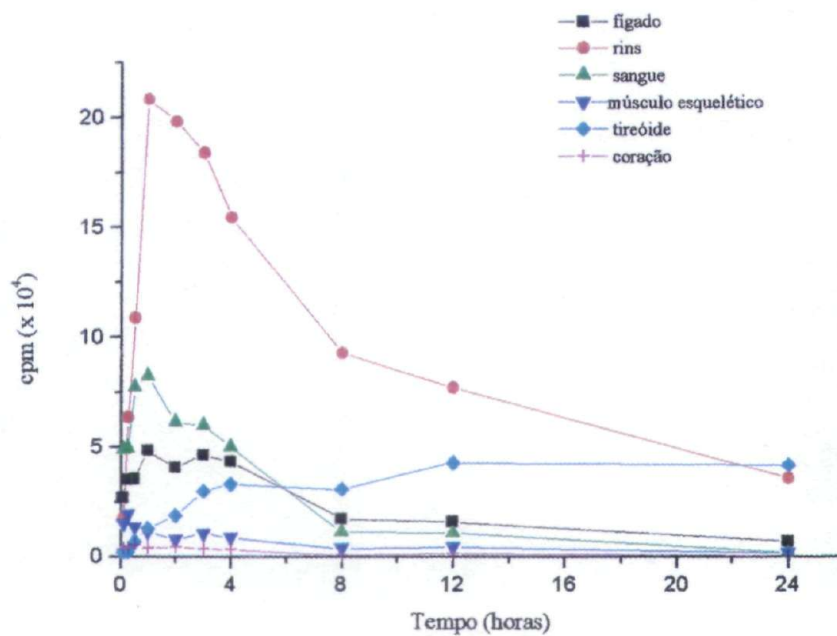
# número do camundongo em cada tempo. DP – desvio padrão.

Causa	GL	SQ	QM	F
Tratamento	1	0,00017	0,00017	1,412
Tempo	18	0,00217	0,00012	4,882 <sup>*a</sup>
Resíduo	78	0,00193	0,00002	
Total	97	0,00426		

\* estatisticamente significantes,  $p \leq 0,05$ ; <sup>a</sup> teste Tukey.- não significativa ao nível de 5%.



**Apêndice 35.** Distribuição tecidual de crotamina nativa radioiodada em diferentes intervalos de tempo, após injeção intraperitoneal. Os dados são mostrados como média para  $n = 4 - 5$  camundongos.



**Apêndice 36.** Distribuição tecidual de crotamina irradiada radioiodada em diferentes intervalos de tempo, após injeção intraperitoneal. Os dados são mostrados como média para  $n = 4-5$  camundongos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AIRD, S.D. & KAISER, I.I. Toxicity assays. **Toxicon**, v.23, p.11-13, 1985.
- AIRD, S.D., KRUGGEL, W.G. & KAISER, I.I. Multiple myotoxin sequences from the venom of a single prairie rattlesnake (*Crotalus viridis viridis*). **Toxicon**, v.49, p.265-8, 1991.
- ALLEN, H.R., TUCKER, R.K. & GEREN, C.R. Potenciation of the toxicity of basic peptides from rattlesnake venoms by sodium acetate. **Toxicon**, v.24, p.553-8, 1986.
- ALLEN, H.R., MERCHANT, M.L., TUCKER, R. K. et al. Characterization and chemical modification of E toxin isolated from timber rattlesnake (*Crotalus horridus horridus*) venom. **J. Nat. Toxins**, v.5, p. 409-27, 1996.
- ALTMAN, P., DITTMER, D. editores **Blood and other body fluids**. Washington, D.C, Dittmer, 1961.
- ANDERSON, P.C. Snake bites (editorial) **South Med. J.**, v.87, p.673-4, 1994
- AZEVEDO-MARQUES, M.M., HERING, S.E. & CUPO, P. Evidence that *Crotalus durissus terrificus* (South American rattlesnake) envenomation in humans causes myolysis rather than hemolysis. **Toxicon**, v.25, p.1163-8, 1987.
- BAILEY, G.S., LEE, J. & TU, A.T. Conformational analysis of myotoxin a (muscle degenerating toxin) of prairie rattlesnake venom. Predictions from amino acid sequence, circular dichroism and Raman spectroscopy. **J. Biol. Chem.**, v.254, p.8922-26, 1979.
- BARIDE, R. M., JAIN, S.D. & GAITONDE, B.B. Biochemical studies on the toxoids of venoms of poisonous Indian snakes. **Indian J. Med. Res.**, v.72, p.571-6, 1980.
- 
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**:referências bibliográficas. Rio de Janeiro, 1989, 19 p.
- NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE. **List of journals indexed in Index Medicus**. Washington, 1989, 198 p.

- BARRIO, A. & VITAL BRAZIL, O. Neuro muscular action of the *Crotalus terrificus terrificus* (Laur.) poisons. **Acta Physiol. Latinoamericana**, v.1, p.291-308, 1951.
- BARRIO, A. Gyroxin, a new neurotoxin of *Crotalus terrificus terrificus* venom. **Acta Physiol. Latinoamericana**, v.11, p.224, 1961.
- BARRON, E.S.G. & FINKELSTEIN, P. Studies on the mechanism of action of ionizing radiations. X. Effect of X-rays on some physicochemical properties of proteins. **Arch. Biochem. Biophys.**, v.41, p.212-32, 1952.
- BELL, J.D. & BILTONEN, R.C. The temporal sequence of events in the activation on phospholipase A<sub>2</sub> by lipid vesicles. **J. Biol. Chem.**, v.264, p.194-200, 1989.
- BELTRAN, J.R., MASCARENHAS, Y.P., CRAIEVICH, A. F. et al. SAXS study of structure and conformational changes of crotamine. **Biophys. J.**, v.47, p.33-5, 1985.
- BELTRAN, J.R., MASCARENHAS, Y.P. SAXS study of the snake toxin  $\alpha$ -crotamine. **Eur. Biophys.**, v.17, p.325-9, 1990.
- BIEBER, A.L, McPARLAND, R.H., BECKER, R.R. Amino acid sequences of myotoxins from *Crotalus viridis concolor* venom. **Toxicon**, v.25, p.677-80, 1987.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, v.72, p.248-56, 1976.
- BUTLER, J., LAND, E.J. & SWALLOW, A.J. Chemical mechanisms of the effects of high energy radiation on biological systems. **Radioat. Phys. Chem.**, v.24, p. 273-82, 1984.
- CANSDALE, G.S. **West African snakes**. Longman, Essex VK, 1981.
- CAMERON, D.L. & TU, T. Characterization of miotoxin  $\alpha$  from prairie rattlesnake (*Crotalus viridis viridis*). **Biochemistry**, v.16, p.2546-53, 1977.
- CAMERON, D.L. & TU, T. A.chemical and functional homology of miotoxin  $\alpha$  from prairie rattlesnake venom and crotamine from South American rattlesnake venom. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.532, 147-54, 1978.
- CHANG, C.C. & TSENG, K. H. Effect of crotamine, a toxin of South American rattlesnake venom, on the sodium channel of murine skeletal muscle. **Br. J. Pharmacol.**, v.63, p.551-9, 1978.
- CHEYMOL, J., GONÇALVES, J.M., BOURILLET, F. et al. Effects neuromusculaires des venins deux varietes de *Crotalus durissus terrificus*. **Archs. Int. Pharmacodyn.**, v.179, p. 40-55, 1969.

- CHEYMOL, J., GONÇALVES, J.M., BOURILLET, F. et al. Action neuromusculaire comparée de la crotamine et du venin de *Crotalus durissus terrificus* var *crotaminus*./I./ Sur préparations neuromusculaire in situ. **Toxicon**, v. 9, p.279-86, 1971a.
- CHEYMOL, J., GONÇALVES, J.M., BOURILLET, F. et al. Action neuromusculaire comparée de la crotamine et du venin de *Crotalus durissus terrificus* var *crotaminus*./II./ Sur préparations isolées. **Toxicon**, v.9, p.287-89, 1971b.
- CID, E.C. **Introduccion a la farmacocinetica**. OAS, Washington, Ed. Chesneau , E., 1982.
- CLISSA, P.B., NASCIMENTO, N. , ROGERO, J.R. Toxicity and immunogenicity of *Crotalus durissus terrificus* venom treated with different doses of gamma rays. **Toxicon**, v. 37, 1131-41, 1999.
- COSTA, T.A. **Efeitos da radiação ionizante na crotamina do veneno de *Crotalus durissus terrificus***. São Paulo: IPEN, 1988. 88p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Nuclear) - IPEN, Universidade de São Paulo, 1988.
- COSTA, H., BONI-MITAKE, M., SOUZA, C.F. et al. Effects of gamma radiation on bee venom: preliminary studies. In: CONGRESSO GERAL DE ENERGIA NUCLEAR, VII, Belo Horizonte **Anais...** Associação Brasileira de Energia Nuclear, 1999, 4 p.
- DAVIES, K.J.A. & DELSIGNORE, M. Protein damage and degradation by oxigen radicals. III Modification of secondary and tertiary structure. **J. Biol. Chem.**, v.262, p.9908-13,1987.
- DEGN, L.L., SEEBART, C.S. & KAISER, I.I. Specific binding of crotoxin to brain synaptosomes and synaptosomal membranes. **Toxicon**, v.29, p.973-88, 1991.
- DOS SANTOS, M.C., MORHY, L., FERREIRA, L.C.L. et al. Purification and properties of a crotamine analog from *Crotalus durissus ruruima* venom. **Toxicon**, v.31, p. 166, 1993.
- EDMAN, P. Method for determination of the amino acid sequence in peptides. **Acta Chem. Scand.**, v.4, p.283, 1950.
- ENDO, T. OYA, M , OZAWA, H. et al. A proton nuclear magnetic resonance study on the solution structure of crotamine. **J. Protein Chem.**, v.8, p.807-15, 1989.
- ENGLE, C.M., BECKER, R.R., BAILEY, T. et al. Characterization of two myotoxic proteins from venom of *Crotalus viridis concolor*. **J. Toxicol. - R ev.**, v.2, p.267-83, 1983.

- FOX, J.W., ELZINGA, M. & TU, A.T. Amino acid sequence and disulfide bond assignment of myotoxin  $\alpha$  isolated from the of prairie rattlesnake (*Crotalus viridis viridis*). **Biochemistry**, v.18, p.678-84, 1979.
- GAITONDE, B.B., KANKONKAR, S.R. Preparation of cobra (*Naja naja*) venom toxoid using gamma-radiations. Part I. **Bull. Haffkine Inst.**, v.32, p.111-13, 1975.
- GALLACCI, M., NUNES, E.C., MOREIRA, E.G. et al. Reduction of crotoxin-induced neuromuscular blockade by gamma radiation. **Toxicon**, v.36, p.941-5, 1998.
- GARRISON, W.M. Reaction mechanisms in the radiolysis of peptides, polipeptides, and proteins. **Chem. Rev.**, v.87, p.381-398, 1987.
- GIGLIO, J.R. Analytical studies on crotoamine hydrochloride **Anal. Biochem.**, v.69, p.207-21, 1975.
- GONÇALVES, J. M. & POLSON, A. The electrophoretic analysis of snake venoms. **Arch. Biochem.**, v.13, p. 253-9, 1947.
- GONÇALVES, J. M. & VIEIRA, L.G. Estudos sobre venenos de serpentes brasileiras. / I. / Análise eletroforética. **An. Acad. Bras. Cienc.**, v. 22, p.141-9, 1950.
- GRIFFIN, P. R. & AIRD, S. D. A new small myotoxin from the venom of the prairie rattlesnake (*Crotalus viridis viridis*). **FEBS Lett.**, v.274, p.43-7, 1990.
- GUARNIERI-CRUZ, M.C., MURATA, Y., SOUZA Fo, et al. Attenuation of *Bothrops jararaca* venom by ionizing radiation. **Toxicon**, v. 28, p. 92, 1990.
- HABERMAN, E. & CHENG-RAUDE, D. Central neurotoxicity of apamine, crotoamin, phospholipase A and  $\alpha$ -amanitin. **Toxicon**, v.13, p. 465-73, 1975.
- HAMPE, O.G., GONÇALVES, J.M. Optical rotatory dispersion of crotoamine: effect of denaturants. **Polymer**, v.17, p.638-9, 1976.
- HAMPE, O.G., JUNQUEIRA, N. O. & VOZARI-HAMPE, M.M. Polyacrylamide gel electrophoretic studies on the self-association of crotoamine conformation: characterization and molecular dimension of  $n$ mer species. **Electrophoresis**, v.11, p.475-78, 1990.
- HAMPE, O.G. Model studies of crotoamine self-association. **Braz. J. Med, Biol. Res.**, v.22, p.17-24, 1989.
- HAMPE, O.G., VOZARI-HAMPE, M.M. & GONÇALVES, J.M. Crotoamine conformation: effect of pH and temperature. **Toxicon**, v.16, p.453-60, 1978
- HATI, R.N., MANDAL, M. & HATI, A.K. Active immunization of rabbit with gamma irradiated russell's viper venom as a toxoid against viper venom. **Toxicon**, v.28, p.895-902, 1990.

- HERRERA, E., YARLEQUE, A., & CAMPOS, S. Gamma radiation effect on biological activity and enzymatic properties of snake venoms. *Lachesis muta* and *Bothrops atrox*. **Inf. Nucl.**, v.31, p.1-14, 1986.
- HUNKAPILLER, M.W. Gas phase sequence analysis of proteins/peptides. In: Protein/peptide sequence analysis: **Current Methodologies**. CRC Press, p. 87-117, 1988.
- HUNTER, W.M. & GREENWOOD, F.C. Preparation of iodine-131 labelled human growth hormone of high specific activity. **Nature**, v.194, p.495-6, 1962.
- IYANIMURA, T.T. Snake venom constituents: biochemistry and toxicology (Part 1). **Vet. Hum. Toxicol.**, v.33, p.468-74, 1991.
- JORGE, M.T. & RIBEIRO, L.A. Epidemiologia e quadro clínico do acidente por cascavel sul-americana (*Crotalus durissus*). **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v.34, p.347-54, 1992.
- JURECKI, B.A. Venomous snake bites in the United States. **J. Fam. Pract.** v.25, p.386-92, 1987.
- KANKONKAR, S.R., KANKONKAR, R.C. & GAITONDE B.B., et al. Irradiated cobra (*Naja naja*) venom for biomedical applications. In: Radioesterilization of medical products. IAEA-SM, p.253-62, 1975.
- KAWANO, Y.; LAURE, C.J. & GIGLIO, J.R. Laser Raman study on crotoamine. **Biochem. Biophys. Acta**, v.705, p.20-5, 1982.
- KEMPER, E.S. Damage to proteins due to the direct action of ionizing radiation. **Q. Rev. Biophys.**, v.26, p.27-48, 1993.
- LAURE, C.J. Die Primärstruktur des Crotoamins. **Hoppe-Seyle Z. Physiol. Chem.**, v.356, p.213-5, 1975.
- LOMBA, M.G. **Estudos sobre a distribuição e excreção da crotoxina-<sup>131</sup>I em cães**. Campinas, UNICAMP 1969. Tese (Doutorado) -, Instituto Central de Biologia - UNICAMP, 1969.
- LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A L. et al. Protein measurement with the folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.**, v.193, p.265-75, 1951.
- MAEDA, N., TAMIYA, N., PATTABHIRAMAN, T. R. et al.. Some chemical properties of the venom of the rattlesnake, *Crotalus viridis helleri*. **Toxicon**, v.16, p.431-41, 1978.

- MANCIN, A.C., SOARES, A. A., ANDRIÃO-ESCARSO, S. H. et al. The analgesic activity of crotamine, a neurotoxin from *Crotalus durissus terrificus* (South American rattlesnake) venom: a biochemical and pharmacological study. **Toxicon**, v.36, p.1927-37, 1998.
- MATAVEL, A.C.S., FERREIRA-ALVES, D.L., BEIRÃO, P.S.L. et al. Tension generation and increase in voltage-activated Na<sup>+</sup> current by crotamine. **Europ. J. Pharmacol.**, v.348, p.167-73, 1998.
- MC GEER, L.P. & MC GEER, E.G. Kainic acid: neurotoxins breakthrough C.R.C. **Crit. Rev. Toxicol.**, v.10, p.1, 1986.
- MEBS, D., EHRENFELD, M. & SAMEJIMA, Y. Local necrotizing effect of snake venoms on skin and muscle: relationship to serum creatine kinase. **Toxicon**, v.21, p.393-8, 1983.
- MILLER, G.L. Protein determination for large numbers of samples. **Anal. Chem.**, v.31, p.1-6, 1959.
- MOORE, S. & STEIN, W.H. The free amino acids of blood plasma. **J. Biol. Chem.**, v.211, p.907-13, 1954.
- MOREIRA, V.M.T.S., LANDUCCI, E.T., OLIVEIRA-FILHO, B. et al. Efeitos da injeção intrahipocampal da crotoxina. In. CONGRESSO BRASILEIRO DE NEUROCIÊNCIAS E COMPORTAMENTO. XVI, 1992, Caxambu. **Resumos...** Ribeirão Preto: Braz. J. Med. Biol.Res., 1992a. p.21.
- MOREIRA, V.M.T.S., LANDUCCI, E.T., OLIVEIRA-FILHO, B. et al. Efeitos da injeção intrahipocampal da crotamina. In. CONGRESSO BRASILEIRO DE NEUROCIÊNCIAS E COMPORTAMENTO. XVI, 1992, Caxambu. **Resumos...** Ribeirão Preto: Braz. J. Med. Biol.Res., 1992b. p.21
- MOREIRA, E. G., NASCIMENTO, N., ROGERO, J.R. et al. Gabaergic-benzodiazepine system is involved in crotoxin-induced anxiogenic effect. **Pharmacol.Biochem. Behav.**, v.65, p.7-13, 2000.
- MOUSSATCHE, S., GONÇALVES, J.M., VIEIRA, G.D. et al. Pharmacological actions of two proteins from brazilian rattlesnake venom. In: **Venoms**, p.275. Buckley, E.E. and Porges, N. eds.. Washigton, 1956.
- MURATA, Y. **Efeitos da radiação gama no veneno de *Crotalus durissus terrificus***. São Paulo, USP, 1988. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Nuclear) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, USP, 1988.

- MURATA, Y., NISHIKAWA, A. K., NASCIMENTO, N. et al. Gamma irradiation reduces the toxic activities of *Crotalus durissus terrificus* venom but does not affect their immunogenic activities. **Toxicon**, v. 28, p. 93, 1990.
- MYERS C.W. & DALY, J.W. Preliminary evaluation of skin toxins and vocalizations in taxonomic and evolution by studies of poison-dart frogs (Dendrobatidae) **Bull. Amer. Museum Nat. Hist.**, v.153, p.175, 1976.
- NAKAZONE, A. K. **Aspectos imunoquímicos da crotoxina e suas subunidades**. São Paulo, USP, 1978. (Tese de Doutorado) - Instituto de Química, USP, 1978.
- NASCIMENTO, N., SPENCER, P.J., ANDRADE JR, H.F., et al. Effects of gamma radiation on snake venoms. **Radiat. Phys. Chem.** v.52, p.665-69, 1998.
- NASCIMENTO, N., SEEBART, C.S., FRANCIS, B. et al. Influence of ionizing radiation on crotoxin: biochemical and immunological aspects. **Toxicon**, v.34, p.123-31, 1996.
- NEDELKOV, D. & BIEBER, A., L. Detection of isoforms and isomers of rattlesnake myotoxins by capillary electrophoresis and matrix-assisted laser desorption time-of-flight mass spectrometry. **J. Chromatogr. A**, v.781, p.429-34, 1997.
- OWNBY, C.L., AIRD, S.D., & KAISER, I.I. Physiological and immunological properties of small myotoxins from the venom of the midget faded rattlesnake (*Crotalus viridis concolor*). **Toxicon**, v.26, p.319-323, 1988.
- PURANANANDA, C. Studies on effects of radiation on snake venoms with special aspects on their sterilization. **IAEA**, R-661-F, 1972.
- PELLEGRINI FILHO, A. **Contribuição ao estudo da ação da crotamina no músculo esquelético**. Campinas: UNICAMP, 1976. (Tese de Doutorado). Faculdade de Ciências Médicas, Universidade de Campinas, 1976.
- PELLEGRINI FILHO, A., VITAL-BRAZIL, O., FONTANA, M.D. et al. The action of crotamine on skeletal muscle: an electrophysiological study. In: ROSENBERG, P. ed. **Toxins: animal plant and microbiol.**, London, Pergamon, 1978 apud
- PRADO-FRANCESCHI & VITAL-BRAZIL, O. Convulxin, a new toxin from the venom of the South American rattlesnake *Crotalus durissus terrificus*. **Toxicon**, v.19, p.875-7, 1981.
- RÁDIS-BAPTISTA, G., OGUIURA, N., HAYASHI, M.A.F. et al. Nucleotide sequence of crotamine isoform precursors from a single South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*). **Toxicon**, v.37, p.973-84, 1999.

- RIVIÈRE, G., CHOUMET, V., AUDEBERT, F. et al. Effect of antivenom on venom pharmacokinetics in experimentally envenomed rabbits: toward an optimization of antivenom therapy. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 281, p. 1-8, 1997.
- ROGERO, J.R. **Toxinas do veneno de *Crotalus durissus terrificus*. Interação proteína-proteína e cinética de troca isotópica hidrogênio-trício**. São Paulo, USP, 1978 (Tese de Doutorado). Instituto de Química, USP, 1978.
- ROGERO, J.R. & NASCIMENTO, N. Atenuação da toxicidade de venenos ofídicos por meio da radiação ionizante. **Biotecnologia ciência e desenvolvimento**. v.2, p.24-6, 1997.
- SAMEJIMA, Y., AOKI, Y. & MEBS, D. Amino acid sequence of a myotoxin from venom of the eastern diamondback rattlesnake (*Crotalus adamanteus*). **Toxicon**, v.29, p.461-8, 1991.
- SCHÄGGER, H. & von JAGOW, G. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. **Anal. Biochem.**, v.166, p.368-79, 1987.
- SCHENBERG, S. Geographical pattern of crotoamine distribution in the same rattlesnake subspecies. **Science**, v.129, p.1361, 1959.
- SILVEIRA, U.S., DINIZ, M.R.V., SANTOS, S.M. Distribuição geográfica das serpentes de *Crotalus durissus* variedade crotoamina positiva nos Estados de Mato Grosso e Mato Grosso do Sul. **Mem Inst Butantan.**, v.52 (sup.68), p.68, 1990.
- SLOTTA, C.H. & FRAENKEL-CONRAT, H.L. Estudos químicos sobre os venenos ofídicos. IV. Purificação e cristalização do veneno da cobra cascavel. **Mem Inst. Butantan**, v.12, p.505-12, 1938.
- SMITH, L. A. & SCHMIDT, J. J. Cloning and nucleotide sequences of crotoamine genes. **Toxicon**, v.28, p.575-85, 1990.
- SMITH, E.L., HILL, R.L., LEHMAN, R.I. et al. **Bioquímica: aspectos gerais**. p.51 Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 7 ed., 1985.
- SOUZA-FILHO, J.N., GUARNIERI-CRUZ, M.C., MURATA, Y. et al. Detoxification of the crotoxin complex by gamma radiation. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v.25, p.103-13, 1992.
- SPACKMAN, D.H., STEIN, W.H. & MOORE, S. Automatic recording apparatus for use in the chromatography of amino acids. **Anal. Chem.**, v.30, p.1190, 1958.
- SPENCER, P.J., AIRD, S.D., BONI-MITAKE, M. et al. A single step purification of bothropstoxin-1. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v.31, p.1125-7, 1998.

- STADTMAN, E.R. Oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins by radiolysis and by metal-catalyzed reactions. **Ann. Rev. Biochem.**, v.62, p. 797-821, 1993.
- STRAIGHT, R.C., GLENN, J.L., WOLT, T.B. et al. Regional differences in content of small basic peptide toxins in the venoms of *Crotalus adamanteus* and *Crotalus horridus*. **Comp. Biochem. Physiol.**, v.100B, p.551-8, 1991.
- TENO, A. M., VIEIRA, C. A., SANTORO, M.M. et al. Interchain disulfide bonds in crotamine self-association. **J. Biochem**, v.107, p.821-25, 1990.
- TOCKER, J.E., DURHAM, S.K., WELTON, A. F. et al. Phospholipase A2-induced pulmonary and hemodynamic responses in the guinea pig. **Am. Rev. Resp. Dis.**, v.142, p. 1193-99, 1990.
- UTAISINCHAROEN, P., BAKER, B. & TU A.T. Binding of myotoxin  $\alpha$  to sarcoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase: a structural study. **Biochemistry**, v.264, p.8211-6, 1991.
- VIEIRA, S. **Estatística experimental**. São Paulo, Ed. Atlas, 2 ed, 1999.
- VITAL BRAZIL, O. **La défense contre l'ophidisme**, Pocaí Weiss & Cia, 1914.
- VITAL BRAZIL, O., FRANCESCHI, J.P. & WAISBICH, E. P. Pharmacology of crystalline crotoxin. I. Toxicity. **Mem. Inst. Butantan**, v.32, p.973, 1966a.
- VITAL BRAZIL, O., FRANCESCHI, J.P. & WAISBICH, E. P. Pharmacology of crystalline crotoxin. II. Neuromuscular blocking action. **Mem. Inst. Butantan**, v.33, p.991-2, 1966b.
- VITAL BRAZIL, O. Neurotoxins from South American rattlesnake venoms. **J. Formoson Med. Assoc.**, v.71, p.394-400, 1972.
- VITAL BRAZIL, O., EUGENIO A.G.B. & LASZLO, G.M. Origem da paralisia respiratória causada pela crotoxina. **Ciência e Cultura** v.25, p.1165-9, 1973.
- VITAL BRAZIL, O., PRADO-FRANCHESI, J.P.; LAURE, C. J. Repetitive muscle responses induced by crotamine. **Toxicon**, v.17, p.61-7, 1979.
- VITAL BRAZIL, O. Venenos ofídicos neurotóxicos. **Rev. Ass. Med. Bras.**, v. 26, p.212-8, 1980.
- VITAL BRAZIL, O. Pharmacology of crotamine. **Mem. Inst. Butantan**, v. 52 (supl.), p.23-4, 1990.
- VOLPE, P., DAMIANI, E., MAURER, A et al. Interaction of myotoxin  $\alpha$  with the  $\text{Ca}^{+2}$ -ATPase of skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. **Arch. Biochem. Biophys.**, v.246, p.90-7, 1986.

**WHO Progress in characterization of venoms and standardization of antivenoms.**

WHO Offset Publ. 58, p. 21-23, 1981.



***instituto de pesquisas energéticas e nucleares***

**Travessa "R", nº 400 - Cidade Universitária - Butantã**

**São Paulo - CEP.: 05508-900**

**Tel.: (011) 816-9000 - Fax.: (011) 212-3546**

**<http://www.ipen.br>**

O ipen é uma autarquia vinculada à Secretaria de Ciência, Tecnologia e Desenvolvimento Econômico do Estado de São Paulo, gerida técnica, administrativa e financeiramente pela Comissão Nacional de Energia Nuclear e associada à Universidade de São Paulo para fins de ensino de Pós-Graduação.