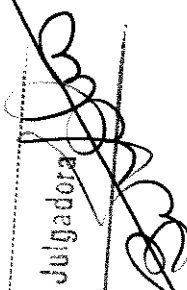


Purificação e caracterização de uma proteína (SIII-3rp) do veneno de Bothrops alternatus que se liga ao fator de von Willebrand (vWF)

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas para obtenção do título de Doutor em Ciências na área de Bioquímica.

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo (a) candidato José Camillo Novello e aprovada pela (omissão Julgadora) 

24/08/95

ORIENTADOR
Prof. Dr. BENEDITO DE OLIVEIRA FILHO
Depto de Bioquímica
UNICAMP

CAMPINAS - SP

1995

JOSÉ CAMILLO NOVELLO



FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA CENTRAL DA UNICAMP

N857p Novello, José Camillo
Purificação e caracterização de uma proteína (SIII-3rp)
do veneno de Bothrops alternatus que se liga ao fator de von
Willebrand (vWF) / José Camillo Novello. -- Campinas, SP :
[s.n.], 1995.

Orientador : Benedito de Oliveira Filho.
Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Campinas.
Instituto de Biologia.

1. Venenos. 2. Proteínas. 3. Hemostase. I. Oliveira
Filho, Benedito de. II. Universidade Estadual de Campinas.
Instituto de Biologia. III. Título.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual de Campinas pelo estímulo ao Professor na formação profissional através do incentivo às atividades científicas e didáticas.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Ao Fundo de Auxílio ao Ensino e Pesquisa (FAEP-UNICAMP)

Ao Prof. Dr. Benedito Oliveira, Prof. Titular do Departamento de Bioquímica do Instituto de Biologia da UNICAMP, a quem devemos nossa introdução na atividade de pesquisa.

Ao aluno Válder R. C. Gimenez pelo auxílio durante a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Edson Antunes e à Pós Graduanda Sissi Mendonça pela realização dos experimentos de agregação plaquetária.

Aos colegas do Departamento de Bioquímica que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

ÍNDICE

RESUMO.....	01
SUMMARY.....	02
INTRODUÇÃO.....	03
MATERIAL E MÉTODOS.....	14
RESULTADOS.....	31
DISCUSSÃO.....	51
BIBLIOGRAFIA.....	58

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 01.....	06
FIGURA 02.....	07
FIGURA 03.....	24
FIGURA 04.....	32
FIGURA 05.....	33
FIGURA 06.....	37
FIGURA 07.....	38
FIGURA 08.....	39
FIGURA 09.....	40
FIGURA 10.....	43
FIGURA 11.....	44
FIGURA 12.....	46
FIGURA 13.....	47
FIGURA 14.....	48
FIGURA 15.....	49
FIGURA 16.....	50
FIGURA 17.....	53
TABELA 1.....	45

ABREVIATURAS

ACF	ADJUVANTE COMPLETO DE FREUND
ADP	ADENOSINA DIFOSFATO
CAPS	ÁCIDO 3-CICLOHEXALAMINO -1 PROPANO SULFONICO
DAB	DIAMINO BENZIDINA
DEAE	DIETIL AMINO ETIL
DTT	DITIOREITOL
EDTA	ÁCIDO ETILENO DIAMINO TETRACÉTICO
GP	COMPLEXO GLICOPROTEICO DE PLAQUETAS
KDA	KILODALTON
M	MOLAR
PAGE	ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA
PM	MASSA MOLECULAR
PTH	FENILTIOHIDANTOINA
PVDF	DIFLUORETO DE POLIVINILDILENO
PRP	PLASMA RICO EM PLAQUETAS
PPP	PLASMA POBRE EM PLAQUETAS
SDS	DODECIL SULFATO DE SÓDIO
TEMED	N-N-N-N- TETRAMETILENO DIAMINA
TFA	ÁCIDO TRIFLUOROACÉTICO
TRIS	TRIS HIDROXIMETIL AMINO METANO
vWF	FATOR DE VON WILLEBRAND

ABREVIÇÕES PARA AMINOÁCIDOS

AMINOÁCIDOS	ABREVIÇÃO TRÊS LETRAS	SÍMBOLO UMA LETRA
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
TREONINA	Thr	T
TRIPTOFANO	Trp	W
TIROSINA	Tyr	Y
VALINA	Val	V

RESUMO

Botrocetina é uma coaglutinina de plaqueta descrita no veneno de *Bothrops jararaca*. Foi sugerida como um substituto para a ristocetina como medidor da interação entre o complexo GPIb-IX e o fator de von Willebrand (vWF). (Read et al., 1978). Botrocetina de uma e duas cadeias foram descritas no veneno de *B. jararaca* (Fujimura et al., 1991a). A Botrocetina de duas cadeias apresenta alta homologia na sua sequência de aminoácidos com a albogreguina-B (isolada do veneno de *Trimeresurus albolabris*), que aglutina plaquetas diretamente por se ligar à GPIb-IX de membranas de plaqueta em um sítio próximo ou idêntico ao do vWF (Peng et al., 1991).

Neste trabalho descrevemos a purificação e isolamento de uma proteína (SIII-3rp) do veneno de *Bothrops alternatus*, através de filtração em gel, cromatografia de troca iônica e HPLC em cromatografia de fase reversa em coluna C18. A proteína purificada que inibia a ligação de ristocetina ao vWF, apresentava uma única banda (28 kDa) em condições não desnaturantes quando submetida a PAGE-SDS 12,5%; após redução com DTT 0,1M foi observada uma banda com 15kDa. Microsequenciamento automático da proteína SIII-3rp foi realizado em um sequenciador automático Applied Biosystems Modelo 477 com fase de pulso líquido. A sequência N-terminal obtida foi DCPSDWSPYEG, e apresentava uma homologia de 82% com os primeiros onze resíduos das cadeias α e β da botrocetina heterodimérica.

SUMMARY

Botrocetin is a platelet coagglutin described in *Bothrops jararaca* venom suggested as a substitute for ristocetin as a mediator of the interaction between GPIb-IX complex and the von Willebrand factor (vWF) that lead to platelet agglutination (Read et al., 1978). A single chain and a two chain botrocetin were described in *B. jararaca* venom (Fujimura et al., 1991a). Two chain botrocetin is highly homologous in its aminoacid sequence to alboaggregin-B (isolated from the venom of *Trimeresurus albolabris*) a protein which directly agglutinates platelets by binding to a site on platelet membrane GPIb-IX close to or identical with the site for vWF binding (Peng et al., 1991).

In this work we report the purification and isolation of a protein (SIII-3rp) from *Bothrops alternatus* venom, through procedures of gel filtration, ion-exchange chromatography and HPLC reverse phase chromatography with a C18 column. The purified protein which inhibits the ristocetin binding to vWF, presented a single band (28 kDa) in non denaturing conditions in 12,5% PAGE-SDS; after reduction with 0,1M DTT, a 15kDa band was observed. Automatic microsequencing of this protein was performed on a Applied Biosystem 477 automatic model sequencer with liquid phase pulse. The N-terminal sequence obtained DCPSDWSPYEG presented 82% homology to the first eleven residues of the α and β chains of the heterodimeric botrocetin.

1. INTRODUÇÃO

As plaquetas são fragmentos celulares encontrados no sangue de mamíferos. Elas "inspecionam" os pequenos vasos, o endotélio vascular e respondem à qualquer quebra na continuidade do endotélio, sendo ativadas instantaneamente e se agregam no sítio de injúria vascular. As plaquetas podem se tornar ativas quando estimuladas por diversos agonistas. Estes podem ser compostos de pequena massa molecular, tais como ADP, ácido araquidônico, serotonina e epinefrina; enzimas, como a trombina e tripsina; lipídeos, como o fator de agregação plaquetária (PAF); e ionóforos, como A23187 (Zucker, 1989). Estes agonistas iniciam uma série de eventos celulares comprometendo a plaqueta com a aderência à superfícies estranhas (adesão), formação de pseudopodes e mudança da forma de disco para esfera (mudança de forma), aderência de uma célula à outra (agregação), e a liberação de várias substâncias (secreção). Estes processos são acompanhados pela exposição de receptores para moléculas adesivas presentes na circulação sanguínea, tais como o fibrinogênio e o fator de von Willebrand que levam à formação do tampão plaquetário, conhecido como trombo, que reduz ou interrompe a perda de sangue no local de injúria. As plaquetas contribuem significativamente para a integridade da parede vascular e ajudam no processo de recuperação da lesão vascular (Vargaftig et al., 1981; George et al., 1985; Peerschke, 1985; Westwicki et al., 1985; Holmsen, 1986; Colman, 1986; Leung & Nachman,

1986; Morose & Hoyer, 1986; Phillips & Shuman, 1986; Packham & Mustard, 1986; Niewiarowski, 1987; Derenleau, 1987; Jamieson 1988; Hawiger, 1989). Em adição ao trombo, as plaquetas uma vez ativadas facilitam a ação dos fatores de coagulação. As plaquetas ativadas tem um papel importante na fase inicial de desencadeamento da coagulação. Elas também constituem uma superfície necessária aos vários passos de ativação da coagulação (Tracy & Mann 1986a, b; Ganz et al., 1986).

Por causa de sua grande importância, aberrações na função normal de plaquetas podem causar desordens trombóticas ou hemorragia. Na trombose, causas desconhecidas podem resultar na formação espontânea de agregados suficientemente grandes para bloquear a circulação (Derenleu, 1987). As plaquetas no sangue agregam sob condições adversas ou dano vascular *in vivo*, ou por agregação controlada *in vitro*. As plaquetas são excelentes modelos para análise de interações célula-célula e célula-substrato (Plow et al., 1987).

O fator de von Willebrand é uma glicoproteína multimérica que circula no sangue formando um complexo não covalente com o fator de coagulação VIII e favorece a adesão plaquetária ao subendotélio. A ligação de vWF ao complexo de glicoproteína Ib (GPIb) de plaqueta é um passo essencial para reprodução *in vitro* desse fenômeno (Weiss & Hoyer, 1973; Sadler, 1991). (Figuras 1 e 2)

O fator de von Willebrand tem uma subunidade com peso molecular de 275000 consistindo de 2050 resíduos de aminoácidos (Titani et al., 1986) e circula no plasma como uma série de multímeros ligados por pontes dissulfeto em um intervalo de peso molecular de 1×10^6 a $> 10 \times 10^6$ (Girma et al., 1987).

Ele é sintetizado em células endoteliais (Jaffe et al., 1973) e megacariócitos e estocado em grânulos α de plaquetas (Nachman et al., 1977)

A ligação entre vWF e GPIb-IX está localizada em uma região de massa molecular de 52/48 kDa que foi obtida através de digestão triptica do vWF reduzido e alquilado e que se mostrou como uma única banda de massa molecular de 46 kDa após deglicolização. Os fragmentos de 52, 48 e 46 kDa possuem o mesmo N-terminal: VTLNPSDPEHCQ que se estendem do resíduo Val 499 ao resíduo Lys 728 e apresentam a mesma capacidade de se ligar à proteína GPIb-IX. Estes resultados sugeriram que a conformação nativa do vWF não é necessária para a formação do complexo vWF-GPIb-IX (Fujimura et al., 1986). Porém Andrews et al (1989b) verificaram que o fragmento nativo do vWF é um homodímero com uma ponte dissulfeto entre Cys 509 e Cys 695 e esta conformação seria necessária para expressão da função de ligação a GPIb-IX.

O reconhecimento de superfícies endoteliais danificadas para adesão plaquetária requer oligômeros de vWF de alta massa molecular (Zimmerman & Ruggeri, 1982).

Uma grande parte do conhecimento a respeito do vWF derivou de análises imunológicas. Anticorpos contra vWF demonstraram que vWF e fator VIII são distintos (Zimmerman & Edginton, 1973).

Anticorpos monoclonais foram preparados contra vWF humano e bovino (Meyer et al., 1984; Katzmann et al., 1981); estudos iniciais descreveram a distribuição dos epítomos no vWF humano e a identificação de regiões responsáveis por suas funções (Meyer et al., 1984).

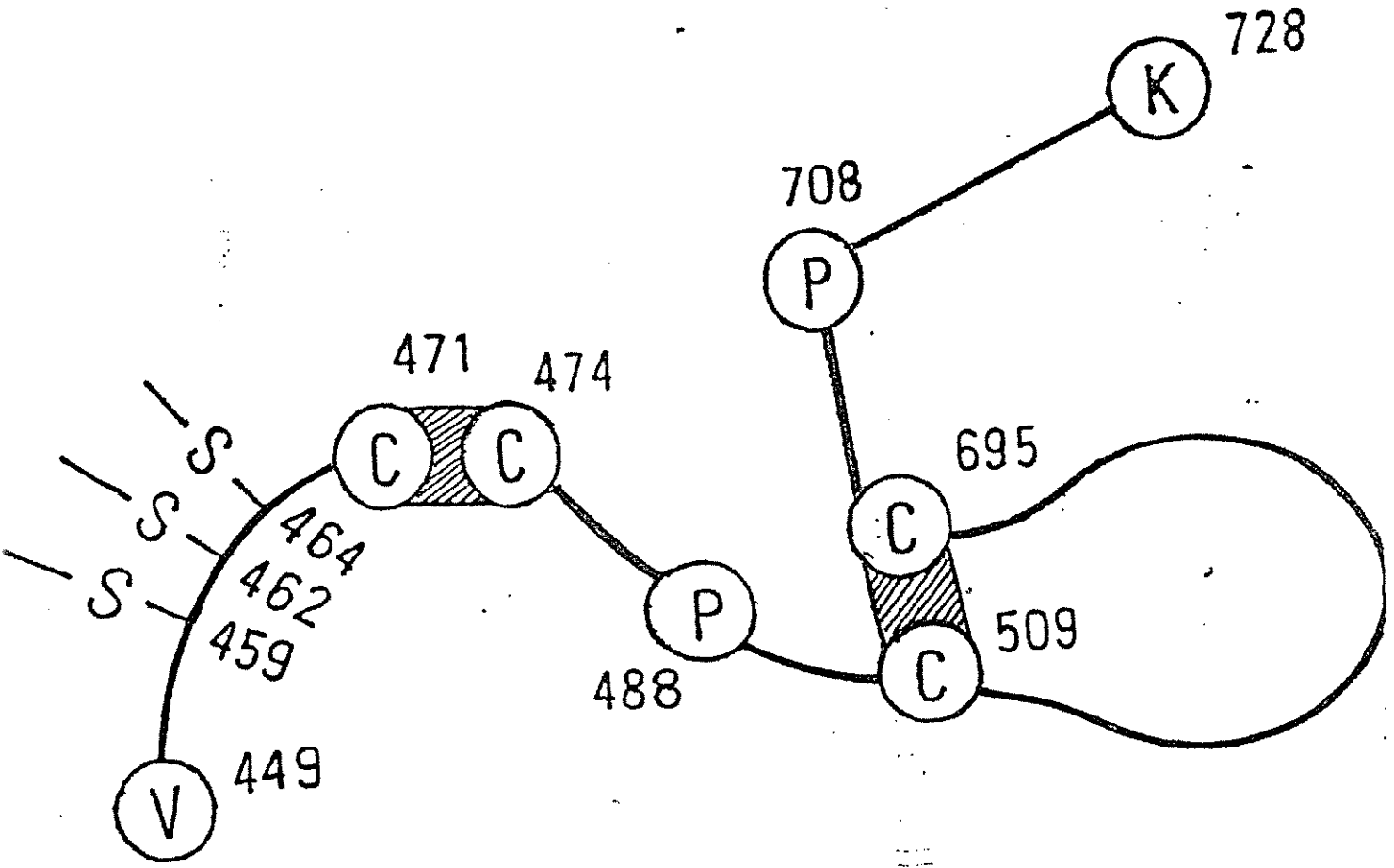


FIGURA 01 - Representação esquemática do domínio de ligação na GP Ib do vWF. Fragmento tríptico do vWF entre os resíduos 449 e 728 é representado esquematicamente com seus 7 resíduos de cisteína. O presente modelo é baseado na suposição hipotética que estes resíduos formam 2 pontes intracadeia, promovendo a base para proximidade espacial de duas pequenas sequências (extendendo-se entre os resíduos 474 e 488 e 695 e 708) envolvidas na ligação à GP Ib. Neste modelo, cada sub-unidade de vWF deveria ter um sítio potencial de ligação à GP Ib (Mohri et al., 1988).

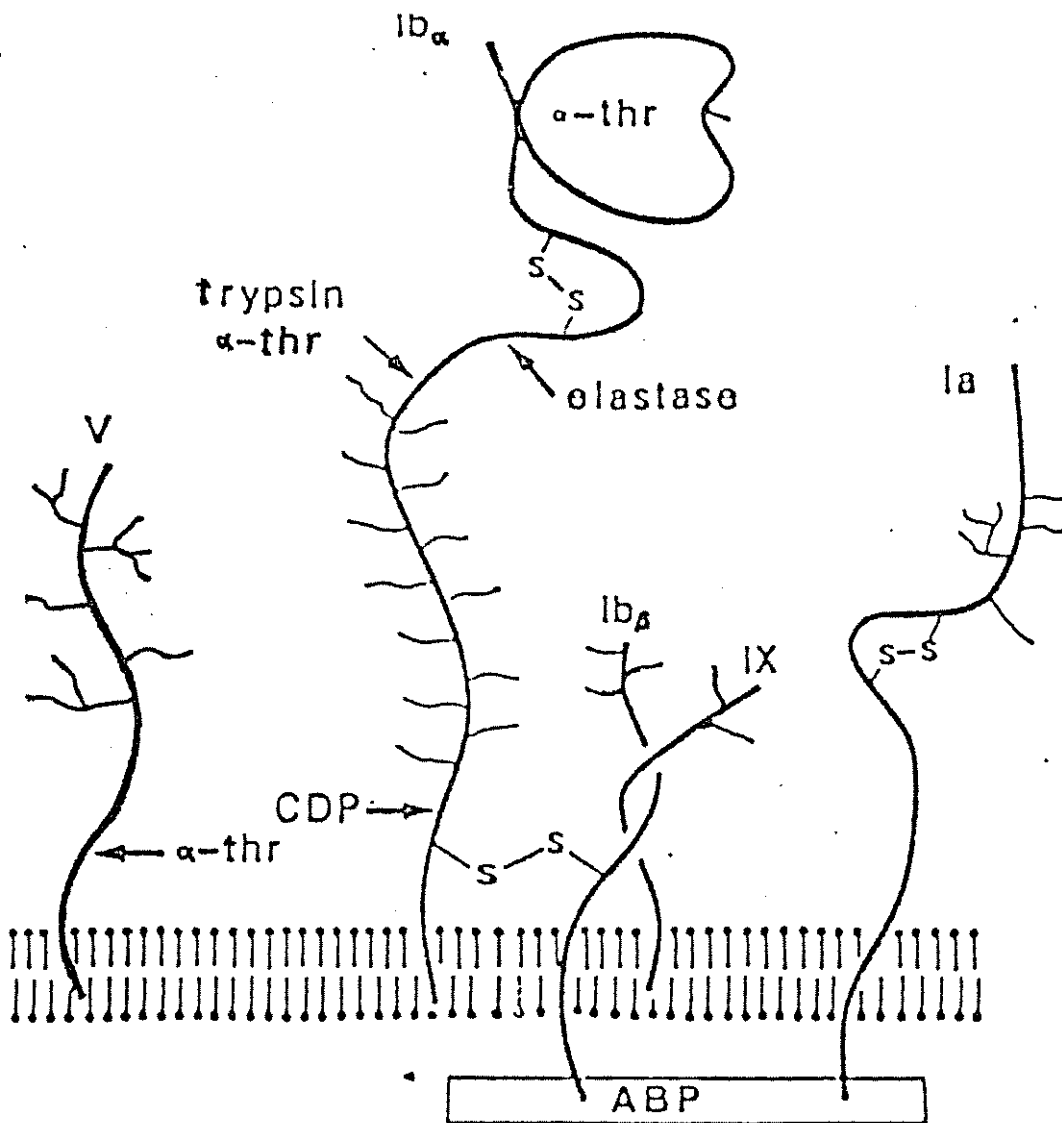


FIGURA 02 - Estrutura da glicoproteína de membrana de plaqueta humana Ib, Ia e V. CDP: Protease dependente de cálcio. α thr: Trombina α . ABP: Proteína de ligação à actina. Setas indicam o sítio de clivagem enzimática (Berndt et al., 1986).

Mohri et al. (1988) demonstraram que a ligação do vWF ao complexo GPIb envolve duas regiões não contíguas da molécula, cada uma constituída de 15 resíduos e, separadas em uma sequência linear de 205 resíduos e mantidas em proximidade espacial por pontes dissulfeto (Figura 1).

O complexo glicoproteico Ib de plaquetas é constituido de uma proteína intrínseca de membrana identificada como um receptor plaquetário que promove a adesão do fator VIII e vWF à plaquetas no subendotélio (Bernt, & Caen, 1984). O complexo glicoproteico Ib é um heterodímero que contém a glicoproteína Ib (PM=170.000) e a glicoproteína IX (PM=22.000). Existem entre 20.000 a 25.000 cópias do complexo por plaqueta. A GPIb é constituída por duas unidades ligadas por pontes dissulfeto; glicoproteína $Ib\alpha$ (PM=135.000) e glicoproteína $Ib\beta$ (PM=25.000). $GPIb\alpha$ é formado por 610 resíduos de aminoácidos sendo 29 resíduos no segmento transmembrana e aproximadamente 100 resíduos no domínio intracelular (Andrews et al., 1989a) (Figura 2). Durante a lise plaquetária, na ausência de inibidores de protease, $GPIb\alpha$ é clivada por uma protease dependente de cálcio que libera glicocalicina, um polipeptídeo solúvel com massa molecular de 140 kDa, originário da parte N-terminal da molécula. A digestão de glicocalicina com tripsina libera um polipeptídeo altamente glicosilado denominado macroglicopeptídeo com uma massa molecular de 118 kDa e um pequeno fragmento com massa molecular de 45 kDa. O fragmento de 45 kDa inclui a porção amino terminal de $GPIb\alpha$ e contém os sítios de ligação para o vWF (Titani et al., 1987) e trombina (Okumura et al., 1978). $GPIb$ contém uma grande quantidade de carboidratos, que estão presentes tanto em $GPIb\alpha$ como $GPIb\beta$ (Judson et al., 1982). $GPIb$ forma um complexo macromolecular com

GPIX e filamentos de actina através da interação com uma proteína de ligação de actina (Fox, 1985). Tanto a GPIb α e GPIb β foram sequenciadas através da técnica de cDNA e apresentaram alta homologia a nível filogenético (Lopez et al., 1987).

Na circulação normal o vWF não se liga ao receptor plaquetário GPIb. Esta interação "*in vitro*" é estudada usando ristocetina, um antibiótico glicopeptídico isolado de *Nocardia lurida*, que mimetiza os constituintes ativos de vasos expostos e causa a ligação de vWF à plaquetas humanas (Bernt & Caen, 1984), e vem sendo utilizada em testes de laboratório para se diagnosticar distúrbios do vWF.

A interação do fator de von Willebrand com o complexo GPIb-IX é crítica no processo de adesão plaquetária ao subendotélio exposto. O antibiótico ristocetina tem sido largamente utilizado para reproduzir este evento "*in vitro*" (Ruggeri et al., 1983).

Asialo vWF se liga ao receptor GPIb na ausência de ristocetina ou qualquer outro modulador e induz agregação plaquetária de uma maneira considerada próxima à interação "*in vivo*" de vWF com plaquetas. ADP e trombina também induzem a ligação do vWF a plaquetas, porém esta interação envolve um receptor localizado em GPIIb/IIIa.

O vWF bovino aglutina plaquetas humanas diretamente sem a necessidade de ristocetina. Aglutinação de plaquetas humanas por vWF bovino é inibida por anticorpos contra a glicoproteína Ib. (Tobelem et al, 1976).

Plaquetas de indivíduos com síndrome de Bernard-Soulier são deficientes de glicoproteína Ib e não aglutinam plaquetas por vWF bovino ou humano (Caen et al., 1976).

Os venenos de serpentes são proteínas e polipeptídeos que induzem vários sintomas farmacológicos na vítima. Centenas de toxinas proteicas tem sido purificadas de venenos e o mecanismo pelos quais elas induzem efeitos farmacológicos estão sendo investigados (Lee, 1979; Harris, 1986; Pirkle e Markland, 1988). Estas proteínas são ferramentas úteis para se compreender os eventos moleculares na fisiologia normal. Várias proteínas de veneno interferem na coagulação sanguínea e agregação plaquetária (Kini e Evans, 1990; Ouyang et al., 1992). As proteínas que atuam sobre a agregação plaquetária impedem a função plaquetária normal por iniciar, potenciar ou inibir a agregação plaquetária. Estas proteínas são um grupo heterogêneo com propriedades físicas e químicas diversas. Elas são proteínas ou glicoproteínas com massa moleculares entre 5000 kDa a 100.000 kDa. Algumas são enzimas, como a fosfolipase A2 (PLA2), proteinases, nucleotidasas; outras são proteínas não enzimáticas. Elas interferem na função plaquetária normal por vários mecanismos.

Read et al. (1978) analisando uma série de venenos purificaram parcialmente uma substância do veneno de ***Bothrops jararaca*** que tinha a propriedade de promover aglutinação plaquetária em presença de vWF. Eles sugeriram seu uso em substituição à ristocetina e deram o nome de botrocetina. A botrocetina reage com um largo espectro de formas multiméricas de vWF e induz aglutinação dependente de vWF em várias espécies animais. O ensaio biológico da botrocetina é baseado na observação de que a razão de agregação plaquetária sob condições padrão com uma quantidade padrão de vWF é dependente da concentração de botrocetina (Brinkhous et al., 1981). Brinkhous et al. (1983) e Howard et al. (1984) relataram várias diferenças

funcionais entre ristocetina e botrocetina. Ambas induzem a ligação do vWF a GPIb (Read et al., 1983; Howard et al., 1984; Fujimura et al., 1987). O efeito cofator de botrocetina e ristocetina é dependente de um domínio funcional da molécula nativa de vWF localizado no fragmento tríptico de 52/48 kDa entre os resíduos Val499 e Lys728 (Fujimura et al., 1987). Fujimura et al. (1991a) observaram que os sítios de ligação da ristocetina e botrocetina na região 52/48 kDa do vWF não eram idênticos, através da utilização de peptídeos sintéticos e anticorpos monoclonais.

A botrocetina tem sido usada para se analisar o vWF plasmático (Brinknous & Read, 1989). Read et al., (1989) propuseram que a botrocetina participa em uma reação em dois passos causando uma aglutinação plaquetária dependente de vWF. Primeiramente é formado um complexo botrocetina-vWF que é o agente aglutinante ativo. Em uma segunda fase o complexo se liga à GPIb e serve como uma ponte para formar aglutinação plaquetária. vWF, GPIb e botrocetina precisam estar presentes para a estabilidade da aglutinação plaquetária, o que poderia sugerir que um complexo ternário deve ser formado.

A estrutura química da botrocetina conduziu a resultados contraditórios, Read et al. (1989) relataram que a botrocetina purificada através de cromatografia de troca iônica apresentava uma única banda de 26,5 kDa por SDS-PAGE. Andrews et al. (1989a) caracterizaram a preparação de botrocetina purificada sem atividade biológica que era composta por um dímero de 25 kDa ligado por pontes dissulfeto e subunidades de 14 e 14,5 kDa. Fujimura et al. (1991b) purificaram 2 formas de botrocetina, uma com 28 kDa antes da redução e 32 kDa após redução com DTT, e outra formada de duas cadeias; com 27 kDa antes da redução e 15/14,5 kDa após redução. A forma de

duas cadeias se mostrou 30 vezes mais ativa em promover a ligação do vWF a GPIb.

O mesmo grupo (Usami et al., 1993) descreveu a sequência completa da botrocetina de duas cadeias e a localização das pontes dissulfeto intra e inter cadeias.

Zingali et al. (1993) isolaram do veneno de *B. jararaca* uma proteína com as mesmas características da botrocetina com relação à massa molecular, número de cadeias polipeptídicas e sequência NH₂-terminal, porém com atividade de se ligar e inibir α trombina, e portanto com atividade de inibir a agregação plaquetária, a qual foi denominada "botropsjaracina". Andrews et al. (1989), no processo de purificação de botrocetina, descreveram a presença de um análogo de botrocetina nativo, com as mesmas características estruturais e sequência N-terminal homóloga. Zingali et al. (1993) propuseram que este análogo da botrocetina poderia ser a "botropsjaracina".

Ozeki et al (1994) purificaram do veneno de *B. jararaca* uma lectina do tipo C que se liga a galactose. Esta proteína é um homodímero composto por duas subunidade de 14 kDa. A sequência N-terminal de 55 resíduos mostrou 37% de identidade com botrocetina. Mostrou uma atividade hemaglutinante dependente de Ca²⁺ e não induziu agregação plaquetária na presença ou ausência de Ca²⁺ e vWF, também não inibiu agregação plaquetária induzida por botrocetina e vWF.

Na espécie *Trimeresurus albolabris*, que como o gênero *Bothrops* também pertence à família Viperidae, foi isolada uma proteína, Alboagreguina-B, que promove à agregação plaquetária por se ligar diretamente ao complexo GPIb. Esta proteína apresenta características químicas e de sequência de

aminoácidos com alta homologia à botrocetina (Peng et al., 1991; Yoshida et al., 1993).

Read et al (1978) demonstraram que a atividade de coagulinina está presente em vários venenos do genero *Bothrops* . Até o presente foi isolada e caracterizada uma proteína, botrocetina, do veneno de *B.jararaca* (Andrews et al., 1989a; Fujimura et al., 1991b & Usami et al., 1993). Outras proteínas relacionadas estruturalmente a botrocetina, bothropsjaracina, (Zingalli et al., 1993) e uma lectina C (Ozeki et al., 1994) também foram isoladas do veneno de *B.jararaca*.

A utilização de outros venenos do genero *Bothrops* se tornaria interessante para se comparar a evolução filogenética desta classe de proteínas, como também aumentar o conhecimento do mecanismo de ação a nível de reconhecimento de sítios moleculares no fator de von Willebrand e na membrana de plaquetas que desencadeiam a reação de agregação ainda não totalmente explicados e de importância fundamental no processo de hemostasia.

O veneno de *B. alternatus*, apesar do número expressivo de indivíduos e acidentes no Brasil, dentro dos venenos botrópicos é um dos menos estudados.

Na literatura, somente uma fosfolipase foi isolada e caracterizada quimicamente (Neisenbon et al., 1986). Desta maneira este modelo se torna muito interessante para estudos de interação estrutura-função de proteínas biologicamente ativas no processo de hemostasia.

O objetivo deste trabalho foi o isolamento e caracterização de proteínas do veneno de *B. alternatus* (**urutú**) com atividades biológicas no sistema de agregação plaquetária.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 VENENO

O veneno total de *Botrophi alternatus* utilizado, foi obtido da Enzifarma.

2.2 PREPARO DE ANTÍGENOS

Como antígeno foi utilizado veneno total de *Botrophi alternatus*.

O adjuvante foi preparado segundo Freund (1965). Em um almofariz foram emulsificadas 15g de lanolina em 85ml de Nujol; adicionou-se então 100mg de BGG. O veneno total de *B.alternatus* foi dissolvido em solução salina 0,15 M. Esta mistura foi homogeneizada no adjuvante de Freund, preparado como acima descrito, de modo a se obter concentração final de 1mg antígeno/ml.

2.3 IMUNIZAÇÃO DOS ANIMAIS E ANTISOROS

Coelhos "outbreak" receberam duas injeções de veneno total em adjuvante completo de Freund (ACF) nos plexos plantares em intervalos de 15 dias. As amostras de sangue foram coletadas após 15 dias e o antisoro foi titulado por ELISA e estocado a -20°C .

Nos estudos de imunodifusão e imunoeletroforese foi utilizado soro de cavalo anti veneno botrópico produzido pelo Instituto Butantã, Lote nº 8206.

2.4 IMUNODIFUSÃO

A dupla difusão em gel de ágar (Ouchterlony, 1956) foi realizada em ágar 1% em solução salina 0,15M, sobre lâmina de microscópio. O gel foi perfurado e o material aplicado. Após 24 horas de reação a lâmina foi lavada em solução salina 0,20M por 48 horas, seca e posteriormente corada em negro de amido 0,1%. A descoloração da lâmina foi realizada em solução contendo metanol - ácido acético - H_2O na proporção = 2:1:2 (v/v).

2.5 IMUNOELETROFORESE

A imunoeletroforese (Grabar & Williams 1953) foi realizada em gel de ágar 1%. O ágar fundido (15 ml) foi colocado sobre duas lâminas de vidro de

25 x 75 mm dispostas em suporte de plástico. Os poços e as canaletas foram impressos no ágar gelificado utilizando-se um impressor metálico.

A eletroforese foi realizada em tampão veronal pH 8,6, 0,05 M, utilizando-se fonte estabilizadora Beckman Duostat e corrente de 30 mA/lâmina durante 100 minutos.

Após a aplicação dos antisoros, as lâminas foram colocadas em câmara úmida por 24 horas. A lavagem foi feita em solução salina fisiológica. As lâminas foram secas e coradas com negro de amido 0,1%. A descoloração foi realizada em solução contendo metanol ácido acético-H₂O na proporção = 2:1:2 (v/v).

2.6 ELISA

Placas de poliestireno para microtitulação (Immunulon-2: Dynatech. Chantilly, VA) foram cobertas com veneno ou frações de 0,2 a 4µg/100 µl/poço), em tampão NaHCO₃ 0,1M, pH 9,6 durante 12 horas. As placas foram bloqueadas por 1 hora à temperatura ambiente com TBS contendo 1% BSA. A reação imunológica foi detectada com aplicação de soro de coelho anti-veneno de *B. alternatus* ou soro de cavalo anti-veneno Botrópico em diluições crescentes. Soro cabra anti IgG de coelho conjugada à peroxidase ou soro de coelho anti IgG de cavalo conjugado à peroxidase foram utilizados como 2º anticorpo Ambos anti-soros foram diluídos em TBST (Tris 20mM, contendo pH 8,0, NaCl 150mM, Tween 20 0,01%) e incubados por 1 hora à temperatura ambiente. Após esta etapa as placas foram lavadas 3 vezes com TBST. A

reação foi desenvolvida por 20 minutos com 0,1mg/ml TMB (Sigma) terminada com H₂SO₄ 1M. A intensidade de coloração foi quantificada em leitor Multi Scan a 450nm (Rostagno et al, 1991).

2.7 ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA

A eletroforese em gel de poliacrilamida foi realizada seguindo-se o descrito por Laemmli (1970).

As placas de poliacrilamida foram feitas de modo descontínuo, apresentando gel de concentração de 5% e gel de corrida de 12,5% ou um gradiente de concentração de 10 a 15%. As placas foram preparadas utilizando-se uma solução de acrilamida estoque (Bio Rad Labs. Richmond, Cal.) a 30% e N-N-metileno-bisacrilamida (Bio Rad Labs. Richmond, Cal.) a 0,8%, ambas dissolvidas em água deionizada pelo sistema Milli-Q (Millipore-Waters Corporation) filtradas em papel de filtro (Whatman nº1) e mantidas a 4°C em um frasco ambar. O gel de concentração a 5% foi preparado utilizando-se tampão Tris-HCl 0,125M, pH 6,8 e o gel de corrida foi feito utilizando-se o tampão Tris-HCl 0,3M, pH 8,8. Em ambos os géis foram colocados 0,1% (p/v) de SDS e polimerizados com 0,1% v/v de N-N-N-N-Tretametilediamina (TEMED) e 0,01%ml de Persulfato de amônio.

A eletroforese PAGE-SDS foi realizada em um sistema duplo de placas "SE 250 mighty small II da Hoefer" ou em um sistema de eletroforese "Mini Protean II da Bio-Rad".

As amostras foram padronizadas para conterem de 5µg a 50µg de proteínas. As amostras foram dissolvidas no tampão (Tris-HCl 0,08M, pH 6,8M contendo 2% de SDS; 10% de glicerol e 0,1% de azul de bromofenol). As amostras foram reduzidas com DTT, cuja concentração final foi 0,1M. Foram utilizados marcadores Pharmacia (Electrophoresis Calibration Kit LMW). A eletroforese foi realizada em tampão de corrida (Tris-HCl 0,025M, pH 8,3 contendo glicina 0,192M e SDS 0,1%) a 100 v/constantas.

O gel foi retirado do sistema de placas e corado com solução de Comassie Blue 0,1% em ácido acético, metanol e água na proporção de 1:4:5 (v/v) durante 3 horas. Em seguida foi descorado em solução de ácido acético glacial, metanol e água deionizada na proporção de 1:4:5 (v/v). Algumas placas também foram coradas por nitrato de prata 12mM revelado com carbonato de sódio 0,28M (Merril et al., 1984).

2.8. "IMMUNOBLOTTING"

A técnica de "Blotting" permite que proteínas, separadas em gel de poliacrilamida, possam ser transferidas e imobilizadas em membranas de polivinildileno difluoreto, ou nitrocelulose. As bandas transferidas são possíveis de análise por autoradiografia, imunodeteção e eluídas para análise de aminoácidos ou sequência da cadeia polipeptídica (LeGendre & Matsudaria, 1988; Hunkapuller et al., 1983; Gershoni & Polad, 1983).

O tampão de transferência foi preparado com 2,2g de 3-ciclohexilamino-1-ácido propanosulfônico (CAPS) em 900ml de água, sendo titulado a pH 11

com NaOH 2N, completando a 1 litro com 100ml de metanol. A membrana de nitrocelulose ou PVDF previamente tratada com metanol e o gel de poliacrilamida são colocados para equilibrar com tampão CAPS por 5 minutos. O gel é colocado sobre a membrana em suporte especial e a transferência se faz a 400mA de 30 a 90 minutos.

Os antígenos foram determinados através de anti-soros específicos. Cada pista eletroforética, correspondente na membrana, foi recortada, bloqueada com tampão TBST e incubada 2 horas com o anti-soro em uma diluição apropriada, previamente titulada por ELISA, em tampão TBST. A identificação foi feita com conjugado de peroxidase (cabra a-IgG de coelho ou coelho anti IgG de cavalo) no tampão TBST, deixando-se incubar por 1h. O excesso de reagente foi retirado da placa com 3 lavagens sucessivas de 10 minutos cada uma, com 30ml do tampão TBST.

O conjugado foi revelado por (Diaminobenzidina) DAB/H₂O₂ - substrato para peroxidase. Após coloração, a reação foi interrompida com água, para remover o excesso de substrato (Towbin et al., 1979; Matsudaíra, 1987).

2.9 CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO MOLECULAR

O veneno bruto de *B. alternatus* foi dissolvido em tampão bicarbonato de amônio (0,1M, pH 8,0) sendo clarificado por centrifugação a 1200xg por 10 minutos.

O veneno solubilizado foi aplicado em uma coluna (115 x 2 cm), empacotada com Sephadex G-75 (Pharmacia Fine Chemicals), previamente equilibrada com tampão bicarbonato de amônio (0,1M, pH 8,0).

As frações resultantes foram eluídas com o mesmo tampão de equilíbrio e coletadas com fluxo constante (12ml/h), recolhendo-se em coletor Gilson modelo VL.

Os picos foram identificados por leitura da absorbância em espectrofotômetro Incibrás UV 1201 a 280nm, reunidos, e em seguida liofilizados.

2.10 DOSAGEM DE PROTEÍNAS

A dosagem de proteínas do veneno total e frações foi realizada seguindo-se o método descrito por Lowry et al em 1951.

2.11 CROMATOGRAFIA DE TROCA IÔNICA

As frações obtidas na cromatografia de exclusão molecular foram recromatografadas em coluna Protein Pak DEAE (0,75cm x 7,5cm, Waters) equilibrada com tampão fosfato 5mM pH 8,0 e eluídas com um gradiente de 0 a 100% de NaCl 1M no tampão de equilíbrio ou em coluna Protein Pak SP (7,5mm x 7,5cm, Waters) equilibrada com tampão acetato 50mM, pH 4,5 e eluídas com um gradiente de 0 a 100% de NaCl 0,5M no tampão de equilíbrio.

Para ambas as colunas foi utilizado equipamentos HPLC como descrito a seguir na cromatografia líquida de alta performance.

2.12 REDUÇÃO E ALQUILAÇÃO

A amostra foi dissolvida em tampão completo de redução; Tris-HCl 0,6M, pH 8,2, contendo 0,001M EDTA e 6M guanidina. Foi adicionada uma solução de 5mM DTT e a solução incubada por uma hora sob atmosfera de nitrogênio. A proteína reduzida foi alquilada com ácido iodo acético 0,1M durante uma hora à temperatura ambiente. As amostras foram dessalificadas em Sephadex G-25 em ácido acético 1M, e monitoradas à 280nm. Os tubos contendo proteína foram liofilizados.

2.13 CROMATOLOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA PRESSÃO (HPLC)

Muitos dos sistemas de HPLC usam como principal parte funcional colunas com sílica, cujos grupos polares de hidroxila (Si -OH) interagem com diferente intensidade, dependendo da polaridade dos diversos componentes da amostra a ser purificada. As moléculas mais polares são as mais adsorvidas na superfície da sílica, sistema este denominado de cromatografia de fase normal. Os eluentes mais utilizados na fase móvel através da coluna são hexano, clorofórmio e eter dietílico.

A sílica também permite que grupos funcionais sejam unidos a sua superfície. A cromatografia de fase reversa utiliza a sílica unida com grupos funcionais como álcool ou cianogrupos C18. Neste sistema utiliza-se como fase móvel eluentes mais polares, e geralmente são usados tampões aquosos com solventes orgânicos como por exemplo uma mistura de água, ácido trifluoroacético e acetonitrila.

No nosso caso utilizamos para a purificação dos peptídeos equipamentos Waters HPLC modelo ALC/GPC - 204, equipado com duas bombas Waters modelo 6000 com detector Waters 440. Foi usado injetor automático de amostra Waters modelo UGK e coluna C18/Bondapack nas dimensões 0,39 x 30 cm. Na cromatografia reversa foi utilizado um gradiente linear de 0 à 66% acetonitrilo em 0,5% de ácido trifluoroacético pH 2,5. Quando necessário os peptídeos foram repurificados na mesma coluna com um gradiente descontínuo no intervalo de gradiente da primeira purificação. Os peptídeos foram monitorados a 214 nm, e a localização de peptídeos com ¹⁴C - carboximetilcisteína foi seguida pela presença de radioatividade, em contador de cintilação líquida.

2.14 ANÁLISE AUTOMÁTICA DE AMINOÁCIDOS

O sistema utilizado foi basicamente o do analisador Pico-Tag da Waters, onde a identificação dos aminoácidos das proteínas ou peptídeos é feita através da cromatografia em HPLC do produto feniltiocarbamil (PTC) do aminoácido, proveniente da derivatização com feniltiocianato dos aminoácidos, obtidos de

hidrólise ácida. Esta forma de cromóforos pode ser detectada a nível de 1 picomol.

2.15 PREPARAÇÃO DA AMOSTRA

Entre 0,5 - 10 microgramas de proteína ou peptídeo, dissolvidos em água e acetonitrilo na proporção 1:1 (v/v) são transferidos para pequenos tubos de reação em um volume de 20 microlitros. Este é colocado dentro do frasco de reação, que possui tampa especial, para conexão com o sistema de vácuo e atmosfera de nitrogênio.

2.16 HIDRÓLISE ÁCIDA

As hidrólises foram efetuadas colocando-se no fundo do frasco de reação 100 µl de uma solução de HCl 6M, onde foi adicionado 1mg/ml de fenol, para evitar a formação de clorotirosina. Deve-se evitar que o ácido caia dentro dos tubos de reação. Em seguida é feito vácuo próximo 1-2 Torr até início do borbulhamento do HCl. O vácuo é fechado, e é deixado entrar nitrogênio (SS - Ultra puro) por 5 segundos. Esta etapa é repetida por três vezes sendo por último vácuo até 1 Torr, fechando o frasco de reação, que é removido para o forno de hidrólise a 105°C por 24 horas. Após este período os tubos de reação foram colocados no vácuo até 65 miliTorr, para secagem das amostras hidrolisadas.

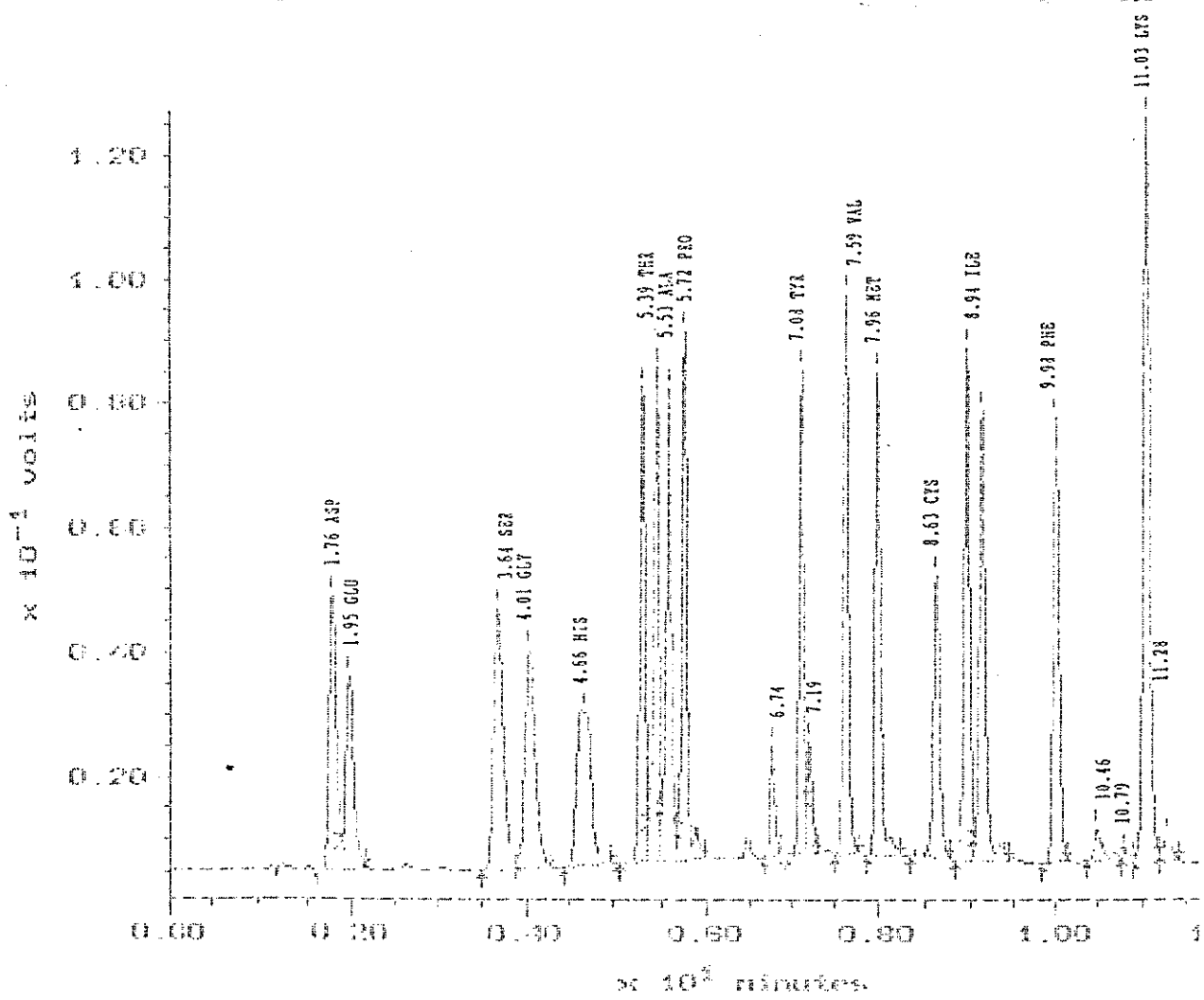


FIGURA 03 - Perfil cromatográfico de uma análise automática de aminoácidos no sistema PICO - TAG da Waters. Foram aplicados 250 pmoles de uma solução padrão de aminoácidos, derivatizados para a forma feniltiocarbamil de cada aminoácido (PTC - aminoácido). O tempo de corrida foi de 12 minutos a um fluxo de 1ml/min., sendo cada pico detectado a 254nm e identificado pelo tempo de retenção em relação ao padrão de PTC - aminoácidos.

2.17 DERIVATIZAÇÃO

As amostras hidrolisadas foram lavadas com 20 μ l de uma solução de metanol:água:triethylamina na proporção 2:2:1 (v/v). Cada tubo foi agitado, centrifugado e colocado a evaporar em vácuo até a leitura de 65 miliTorr. Este procedimento remove sais e solventes, que possam estar adsorvidos nos aminoácidos.

Uma solução fresca de derivatização foi preparada com metanol:triethylamina:água:fenilisotiocianato na proporção 7:1:1:1 (v/v), sendo adicionado 20 μ l a cada tubo de reação e deixado à temperatura ambiente por um período de 30 minutos. Após derivatização as amostras foram secas à vácuo até a leitura de 50 miliTorr, para a completa remoção de todo o PITC. Cada amostra é dissolvida em 50 μ l de uma solução 0,4mM fosfato de sódio, cujo pH foi titulado a 7,4 com ácido fosfórico a 10%, sendo adicionado 5% de acetonitrilo.

A análise dos PTC aminoácidos foi realizada em HPLC, usando coluna C18/Bondapack em cromatografia de fase reversa com um gradiente linear de 20,5 minutos de 0 a 100% de acetonitrilo (60%). A identificação de cada aminoácido é feita em relação a uma corrida padrão de PTC aminoácidos (Fig. 3). (Bidlemeier et al., 1984).

2.18 DEGRADAÇÃO AUTOMÁTICA DE EDMAN

O seqüenciador automático de proteínas e peptídeos usa a técnica de degradação de Edman para remover e identificar aminoácidos a partir da porção N-terminal de um polipeptídeo. Após ativação de um filtro composto de papel e fibra de vidro com polibrene, a proteína é covalentemente unida à este suporte que é colocado na câmara de reação. Depois de cada ciclo degradativo, o aminoácido N-terminal é removido da cadeia polipeptídica na forma derivada de anilinothiazolinona (ATZ). O ATZ aminoácido é automaticamente transferido para uma segunda câmara de reação, onde ocorre a conversão para um derivado mais estável, na forma de feniltiohidantoína do correspondente aminoácido (PTH). O PTH aminoácido é transferido para um sistema de cromatografia líquida de alta pressão onde a identificação é realizada em comparação a uma cromatografia de um padrão de PTH aminoácidos. O seqüenciador utilizado foi o modelo 477A, que utiliza, para a identificação dos PTH aminoácidos, um sistema de HPLC modelo 120A, ("on line" do seqüenciador) ambos da Applied Biosystem. (Foster City CA, USA).

Reagentes e solventes (Applied Biosystem) são transferidos para a câmara de reação e conversão por controle automático através de um micro processador, permitindo seqüências automáticas em alta sensibilidade entre 10 - 500 picomoles de proteína ou peptídeos. Os reagentes utilizados foram R1, 5% fenilisotiocianato (PITC) em n-heptano; R2, 12,5% trimetilamina (TMA) em água; R3, ácido trifluoroacético (TFA), com 0,002% de (DTT); R4, 25% TFA em água com 0,01% DTT; R5, acetonitrilo, com 0,001% DTT; S1, n-heptano; S2, etilacetato; S3, 1-clorobutano; S4, 20% acetonitrilo em água.

2.19 ATIVAÇÃO DE FILTRO

Um filtro de fibra de vidro é tratado com BioBrene (Polibrene), que ficará retido no filtro. Esta ativação é realizada na câmara de reação do seqüenciador, onde é programado a realizar ciclos de reação, para a completa ativação e eliminar o excesso de reagentes, que poderiam interferir durante as etapas da degradação de Edman.

2.20 CICLO DE REAÇÃO

As etapas da degradação de Edman denominadas de acoplamento, que consiste na união do PITC com o aminoácido da cadeia polipeptídica e a etapa de clivagem para a formação do ATZ aminoácido, ocorrem na câmara de reação, que consiste de dois blocos de vidro, onde internamente está uma pequena câmara com o filtro ativado a 48°C. Foi utilizado o programa Normal-1, que tem um período de duração de 53 minutos e 30 segundos. O reagente R2 (TMA) proporciona o meio básico (pH 9 - 9,5), para que o PITC acople ao aminoácido N-terminal do peptídeo. R3, que consiste de TFA, é usado para clivar o aminoácido unido ao PITC do resto da cadeia polipeptídica, produzindo o derivado ATZ do aminoácido. Após a etapa de clivagem a proteína é deixada com um novo amino terminal pronto, para o próximo ciclo de degradação.

2.21 CICLO DE CONVERSÃO

Nessa etapa da degradação de Edman, o ATZ aminoácido é transferido da câmara de reação pelo solventes S3 para a câmara de conversão. O ATZ é um derivado instável, sendo desejável sua conversão para um isômero mais estável que é a feniltiohidantoína do correspondente aminoácido (PTH aminoácido). A câmara de conversão consiste em um tubo cônico com um volume interno de 1ml, para onde são enviados os reagentes químicos necessários para o ciclo de conversão, sendo mantida a temperatura constante de 64°C e no programa Normal-1 tem um período de duração de 43 minutos e 59 segundos.

2.22 IDENTIFICAÇÃO DOS PTH AMINOÁCIDOS

Após completado o ciclo de conversão, o PTH aminoácido pode ser transferido para o coletor de frações monitorado, para confirmar a presença de PTH-S-CMCYS (feniltiohidantoína-S-carboximetil cisteína) ou aplicado no sistema HPLC, para identificação e quantificação dos aminoácidos.

2.23 PREPARAÇÃO DE PLASMA RICO EM PLAQUETAS E PLAQUETAS LAVADAS

Sangue de voluntários sadios, que não tomaram medicamentos por 15 dias foi coletado por punção na veia em um tubo plástico contendo citrato de sódio 3,8%. Plasma rico em plaquetas (PRP) foi preparado por centrifugação a 200xg por 12 minutos à temperatura ambiente. Plasma pobre em plaquetas (PPP) foi obtido centrifugando o sangue remanescente a 900xg por 8 minutos à temperatura ambiente. Para preparar as plaquetas lavadas (WP), o PRP foi centrifugado (900xg/8 minutos) na presença do análogo de prostaglandina, iloprost (0,8mM). O sobrenadante foi removido e o "pellet" de plaquetas, foi ressuspenso em 15ml de tampão Krebs, oxigenado, livre de cálcio (95% O₂/5% CO₂). Iloprost (0,8mM) foi adicionado novamente e as plaquetas foram centrifugadas (900xg/8 minutos) à temperatura ambiente. O sobrenadante foi aspirado e o "pellet" ressuspenso em uma solução de Krebs livre de cálcio. (Radomski & Moncada, 1983). A contagem de plaquetas foi determinada automaticamente (Coulter Counter Model T 890, Hialeah, Fla, USA) e ajustada para 1×10^8 células/ml. Cloreto de cálcio (1mM) foi adicionado à suspensão final de plaquetas. A composição da solução de Krebs foi (mM) NaCl 137, KCl 2,7, NaHCO₃ 11,9, Na₂HPO₄ 0,3, MgSO₄ 0,8, glicose 5,6 e CaCl₂ 1,0.

2.24 MEDIDA DA AGREGAÇÃO PLAQUETÁRIA

Uma suspensão de plaquetas lavadas (400 μ l) e PPP (100 μ l, diluição 1:4) foi incubada a 37°C por 1 min. em um agregômetro de dois canais Payton, (Born and Cross, 1963) com agitação contínua a 900xg e então estimuladas com ristocetina (1mg/ml). Mudanças na absorvância foram registradas por 5 min após estimulação.

3. RESULTADOS

3.1 CONTROLE ATRAVÉS DA METODOLOGIA DE DUPLA DIFUSÃO EM GEL DE AGAR DAS PARTIDAS DE VENENO DE *B.alternatus*

Dupla difusão em gel de ágar mostra, na figura 4, vários arcos de precipitação correspondentes as proteínas antigênicas de veneno (V) reveladas pelo anti-soro produzido em cavalos (Ho-a-bot). Esta figura revela ainda identidade antigênica total entre as proteínas do veneno nº 2 (V₂) e veneno nº 3 (V₃).

3.2 ANÁLISE IMUNOELETROFORETICA DO VENENO DE *B.alternatus*

Na imunoeletroforese apresentada na figura 5 vários arcos de precipitação devidos aos componentes dos "pools" de veneno de *B.alternatus* revelados por soro de cavalo anti soro botrópico (Ho-a-bot) são visualizados na região anódica; um único arco de precipitação é visualizado na região catódica.

Como o tampão de corrida foi o veronal tamponado em pH 8.6, a existência de uma ou muitas proteínas com pI acima deste valor é possível.

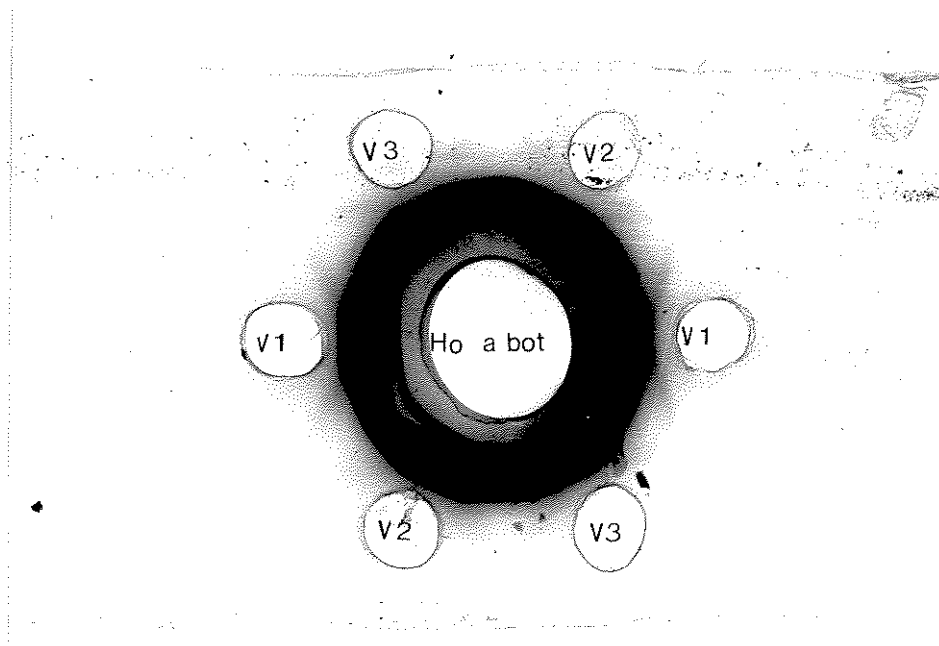


FIGURA 04 - Dupla difusão em duas dimensões em gel de ágar do soro de cavalo (Ho-a-Bot) hiperimunizado com proteínas totais de venenos botrópicos. Este anti-soro foi aplicado no poço central da figura. "Pools" de veneno total de *Bothrops alternatus* (V1, V2, V3) foram aplicados nos poços periféricos. Pode-se observar que os venenos V2 e V3 apresentam uma relação de completa identidade. Uma linha de precipitação a mais foi observada no veneno V1.

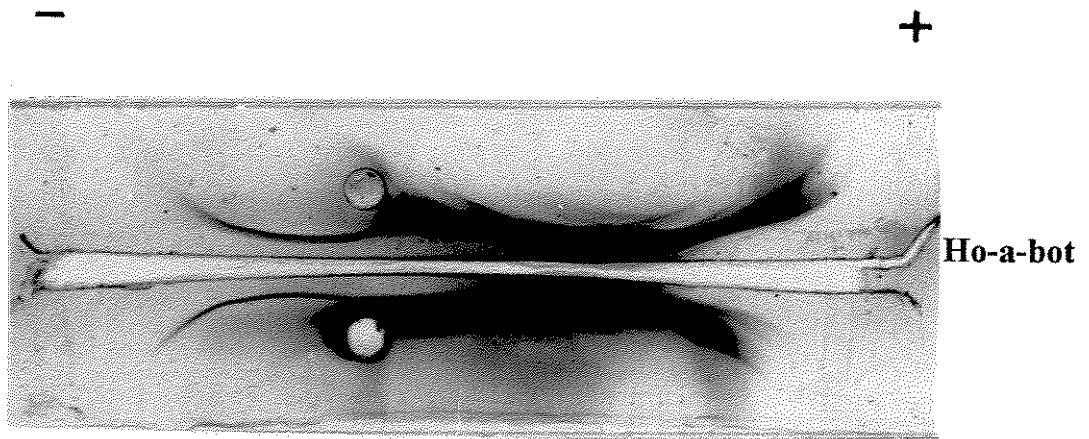


FIGURA 05 - Análise imunoeletroforética dos venenos V2 e V3 de *Bothrops alternatus*. Os venenos V2 e V3 (15 μ l de uma solução contendo 10mg/ml em NaCl 0,15M) foram aplicados nos poços indicados. Na canaleta central foi aplicado soro de cavalo anti botrópico.

3.3 CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO MOLECULAR (SEPHADEX G-75) DO VENENO TOTAL

Cinco frações correspondentes aos picos de absorbância em 280nm foram eluidas em cromatografia de exclusão molecular em Sephadex G-75, no veneno total de *B.alternatus* em tampão NH_4HCO_3 0,1M pH 8,0.

Essas frações foram denominadas SI, SII, SIII, SIIIa e SIV e o perfil de eluição é mostrado na figura 6.

A fração SIII representa o componente do veneno de *B.alternatus* com maior massa.

Os testes de atividade biológica que monitoraram esta cromatografia demonstraram que a fração SIII é capaz de se ligar ao fator de von Willebrand (vWF) em testes "*in vitro*" (figura 14). Além disto esta fração apresenta atividade de lectina (hemaglutinação). A fração SIIIa apresenta atividade fosfolipásica e a fração SIV apresenta atividades potenciadora de bradicinina (BPF) em testes com ileo isolado de cobaia.

3.4 CONTROLE EM PAGE-SDS

O material contido nos picos de eluição da cromatografia de exclusão molecular em Sephadex G-75 do veneno de *B.alternatus* que corresponde aos tubos 25, 27, 29, 38 e 41 quando submetidos ao controle em PAGE-SDS em condições não desnaturantes mostram a presença de mais de um componente como se pode verificar na figura 7. A massa molecular aparente desses

componentes varia de 15 a > 66 kDa quando suas mobilidades eletroforéticas são comparadas com os padrões.

3.5 ANÁLISE IMUNOELETROFORETICA DA FRAÇÃO SIII

A fração SIII obtida da cromatografia em Sephadex G-75 do veneno total de *B. alternatus* quando submetida à análise imunoeletroforética usando-se como revelador o soro de cavalo anti veneno Botrópico (Ho-a-bot) apresenta pelo menos dois arcos de precipitação, como se pode observar na figura 8. Um desses arcos de precipitação corresponde a região de migração mais anódica dos componentes do veneno total.

3.6 PURIFICAÇÃO DA FRAÇÃO SIII-3 EM DEAE 5 PW (HPLC)

A fração SIII-3 quando submetida a cromatografia em DEAE 5 PW (HPLC) foi desdobrada em três componentes denominados SIII-1, SIII-2 e SIII-3 como mostra a figura 9. A fração SIII-1 não se liga à coluna nas condições do tampão de equilíbrio (5mM PO₄, pH 8.0).

As frações SIII-2 e SIII-3 foram eluidas em gradiente de 20 a 24% de tampão B. (NaCl 1M em fosfato de sódio 5mM pH 8.0).

Os testes de agregação plaquetária mostraram que a fração SIII-3 teve a capacidade de se ligar ao fator de von Willebrand (figura 15) a fração SIII-1

que aparece como "breakthrough" na coluna de troca iônica corresponde à proteína mais anódica descrita na figura 8.

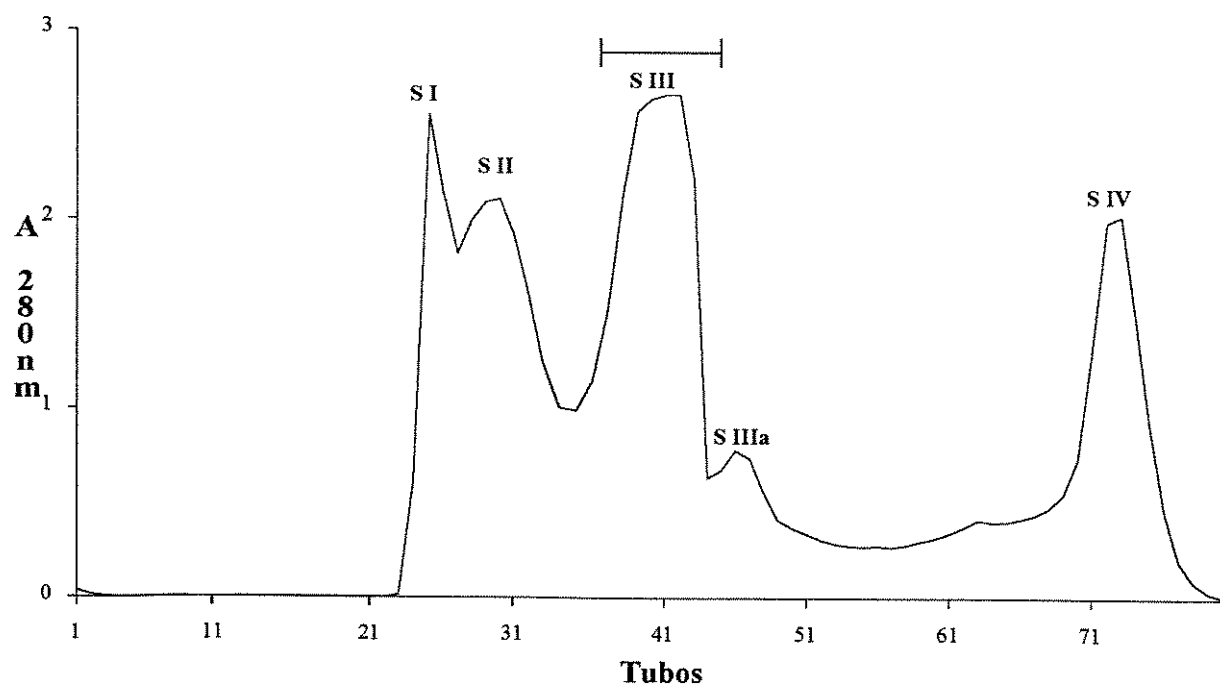


Figura 06 - Cromatografia de exclusão molecular (Sephadex G-75) do veneno de *B. alternatus* (200mg). Tampão Bicarbonato de Amônia 0,1M, pH 8,0. Fluxo : 12ml/h (4ml/tubo).

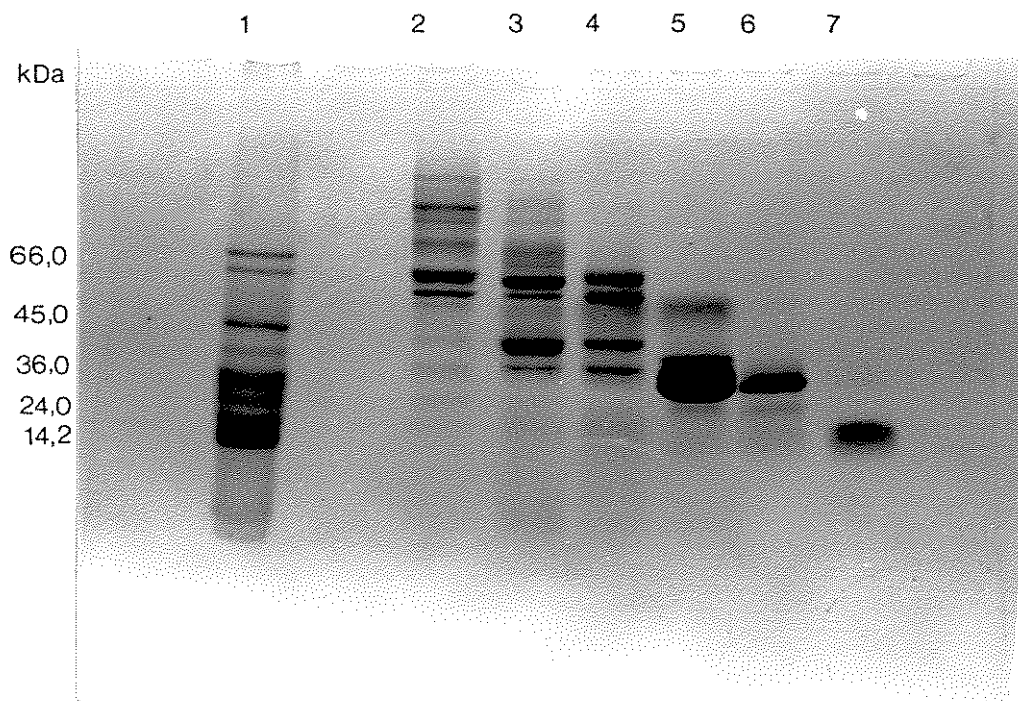


FIGURA 07 - PAGE - SDS (gradiente 7,5 a 15%) dos tubos correspondentes aos picos de absorção máxima a 280nm da cromatografia de exclusão molecular em coluna Sephadex G-75 do veneno de *B. alternatus*. Poço 01 - Marca dores (14,2kDa - lactoalbumina; 24,0kDa - tripsinogênio; 29,0kDa - anidrase carbônica; 36,0kDa - gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase; 45,0kDa - ovoalbumina; 66,0kDa - albumina bovina). Aos poços enumerados de 02 a 07 forma aplicados 20µl de material correspondente aos tubos de números 25, 27, 29, 38, 41 e 46 na ordem.

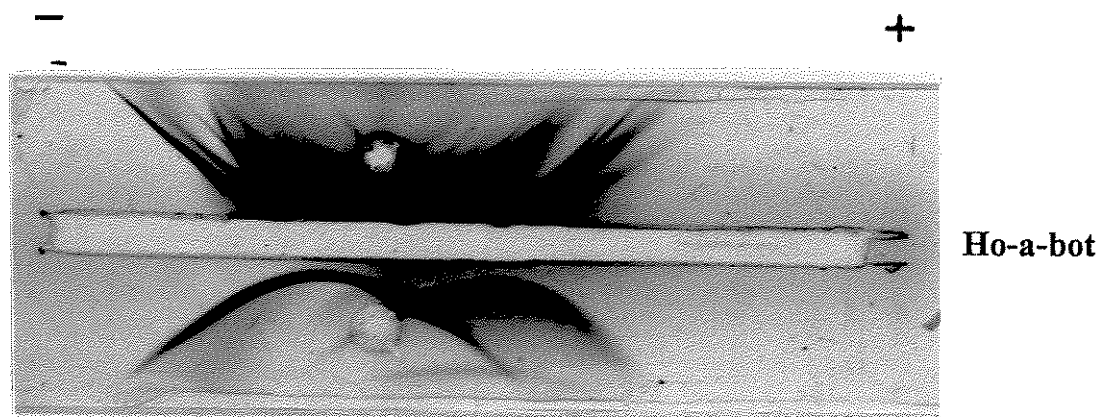


FIGURA 08 - Análise imunoeletroforética do veneno total de *B.alternatus* (VT) e fração SIII de Sephadex G-75 (SIII) utilizando-se soro de cavalo anti veneno botrópico (Ho a Bot) como revelados.

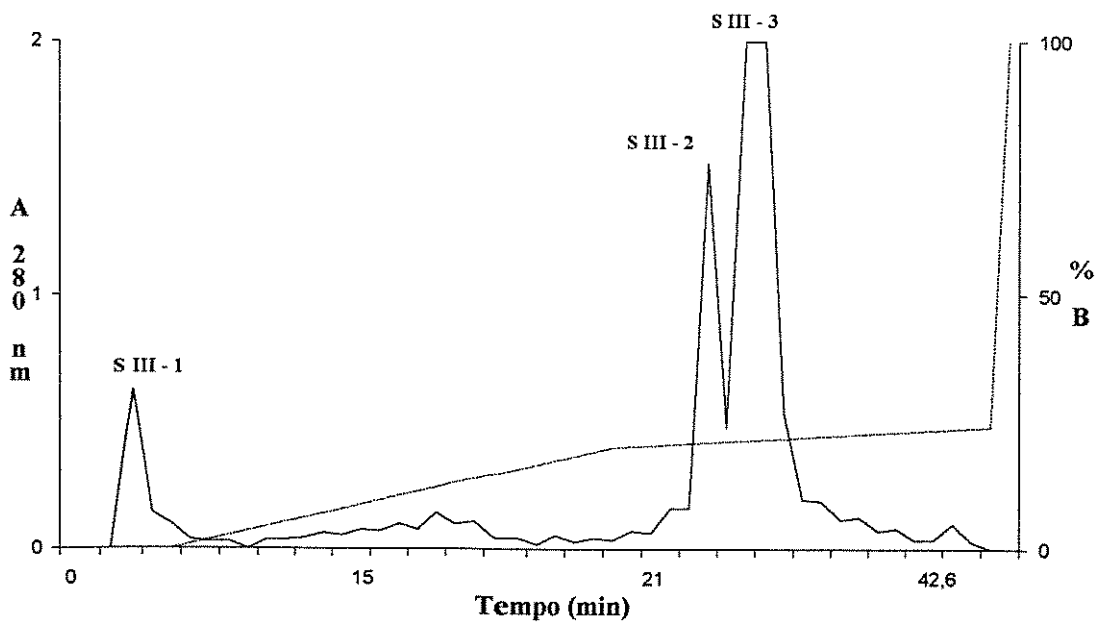


FIGURA 09 - Cromatografia da fração SIII em DEAE 5PW (HPLC). Tampão A : fosfato de sódio 5mM pH 8,0. Tampão B : NaCl 1M em Tampão A. Linha pontilhada : gradiente. Fluxo : 1ml/min.

3.7 REPURIFICAÇÃO DA FRAÇÃO SIII-3 EM HPLC FASE REVERSA

A fração SIII-3 quando submetida à HPLC fase reversa em coluna C18 apresenta preponderantemente um pico de absorbância denominada SIII-3 rp. Esta fração repurificada quando submetida ao controle em PAGE-SDS apresenta uma única banda homogênea de migração eletroforética em condições redutoras (R) e não redutoras (NR) como indicado no quadro em destaque da figura 10. Este material compatível com massa moleculares de 28 kDa e 15 kDa em condições não redutoras e redutoras respectivamente.

3.8 CONTROLE PAGE-SDS DAS FRAÇÕES SIII E SIII-3 rp

A fração SIII-3 rp mostra em PAGE-SDS uma única banda coincidente com a fração SIII (figura 11).

3.9 ANÁLISE DE AMINOÁCIDOS DA PROTEÍNA SIII-3

A composição de aminoácidos da proteína SIII-3 em condições nativas está mostrada na tabela I. Não foram determinados triptofano e 1/2 cistina. Não foram feitas análises de amostras oxidadas para determinação de cisteína na forma de ácido cisteico Cys SO₃H seqüência NH₂-terminal da proteína SIII-3rp.

3.10 SEQÜÊNCIA NH₂-TERMINAL

A seqüência NH₂-terminal da proteína SIII-3rp é mostrada na Figura 12.

3.11 GRÁFICO DE HIDROPATIA

A Figura 13 mostra o gráfico de hidropatia da seqüência amino terminal, com uma janela de dois resíduos.

3.12 ATIVIDADE SOBRE AGREGAÇÃO PLAQUETÁRIA

Através da técnica de agregação plaquetária (Figura 14), a fração SIII inibiu a ristocetina na sua atividade de coaglutina. O mesmo aconteceu com a fração SIII-3rp (Figura 15)

Quando se utilizou trombina como induzir da agregação (Figura 16), a fração SIII-3 rp não provocou nenhum efeito.

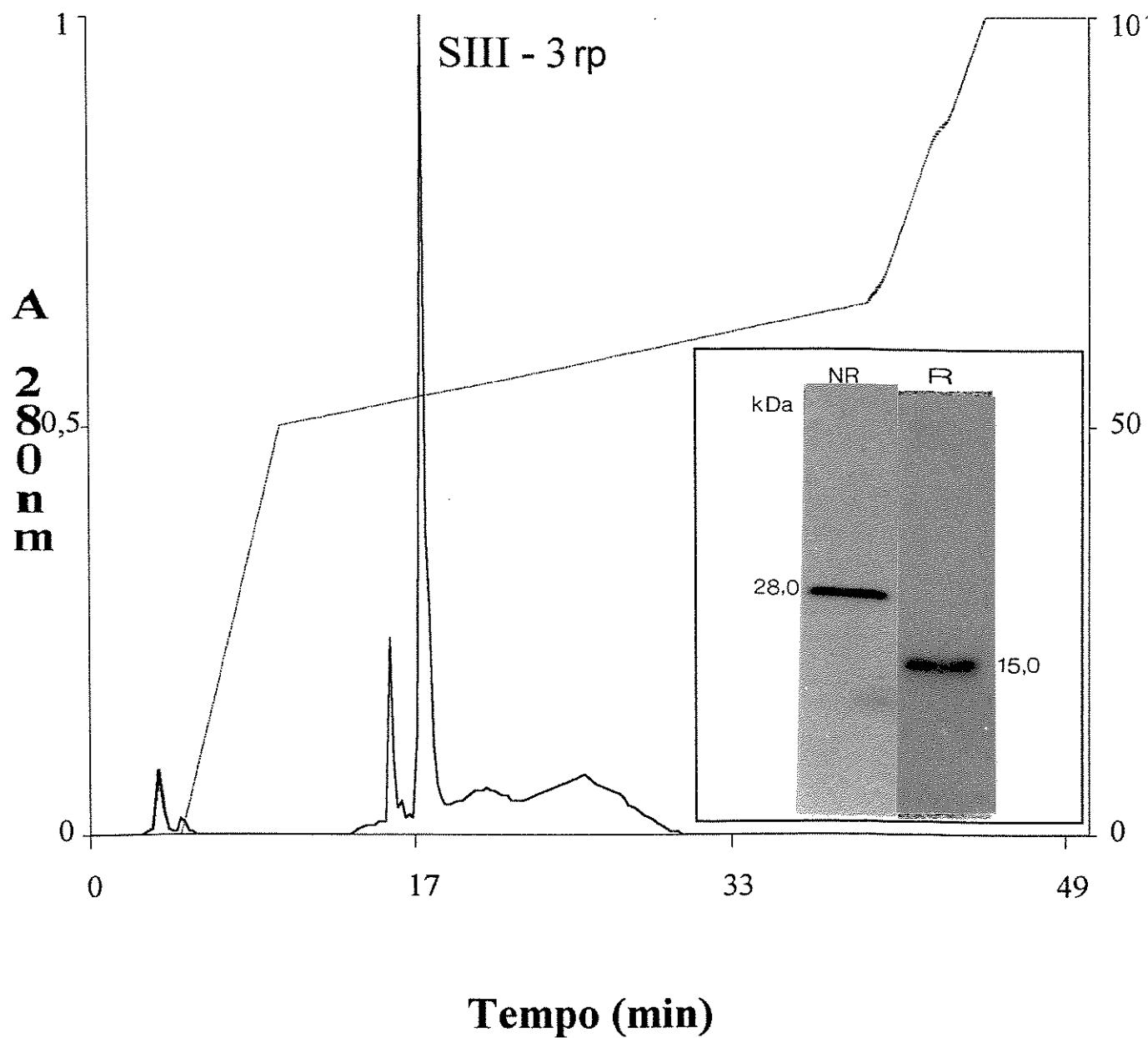


FIGURA 10 - Purificação da fração SIII - 3 (1,0 mg), obtida da cromatografia de troca iônica em DEAE 5PW, em HPLC de fase reversa em uma coluna C₁₈ (7.8 x 300mm, 125Å). Tampão A : Ácido trifluoracético 0,1% (TFA). Tampão B : Acetonitrila 66% em tampão A. Fluxo : 2 ml/min. O quadro mostra em destaque a análise em SDS-PAGE da proteína SIII - 3 repurificada. O material eluído na fração SIII - 3 rp mostra em condições redutoras (R) e não redutoras (NR) uma única banda de migração eletroforética em SDS - PAGE.

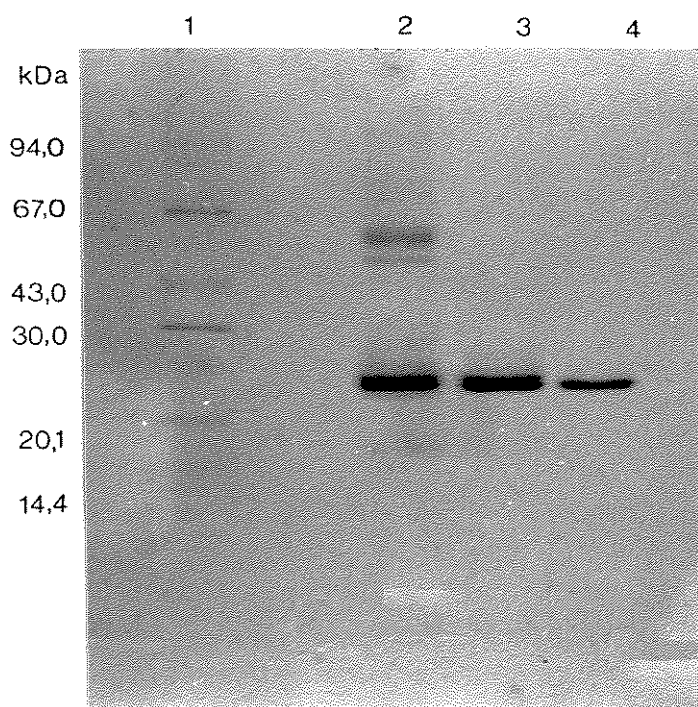


FIGURA 11 - PAGE - SDS 12,5% do veneno bruto e frações (SIII e SIII-3rp) do veneno de *B. alternatus* em condições não redutoras. Poço 01 - Marcadores (94,0kDa - Fosforilase B; 67,0kDa - Albumina; 43kDa - Ovoalbumina; 30kDa - Anidrase Carbônica; 20,1kDa - Inibidor de Tripsina; 14,4kDa - α lactoalbumina); Poço 02 - Veneno bruto (25 μ g); Poço 03 - fração SIII (15 μ g); Poço 04 - fração SIII-3rp (8 μ g).

Tabela 1 - Composição de aminoácidos da fração SIII - 3rp isolada do veneno de *Bothrops alternatus* (a).

Aminoácido	SIII - 3
Asx	25.04 (25)
Glx	67.11 (67)
Ser	24.83 (25)
Gly	14.97 (15)
His	6.01 (06)
Arg	11.01 (11)
Thr	4.22 (04)
Ala	19.38 (19)
Pro	5.41 (05)
Tyr	7.29 (07)
Val	8.67 (09)
Met	3.31 (03)
1/2 Cys	não det.
Ile	7.52 (08)
Leu	14.29 (14)
Phe	8.73 (09)
Lys	16.25 (16)
Trp	não det.
Total	244.04 (244)

(a) A composição de aminoácidos é expressada em moles de resíduo por moles de proteína. Os números em parênteses representam o número inteiro mais próximo.

(b) A presença de grupos sulfidrilas livres não foi determinada e nenhuma correção para possíveis perdas durante a hidrólise ácida foi feita para o conteúdo de cistina.

não det. = não determinado

SIII-3rp

D C P S D W S P Y E G

Figura 12 - Sequência NH₂-terminal dos 11 primeiros resíduos da proteína SIII - 3rp na forma nativa.

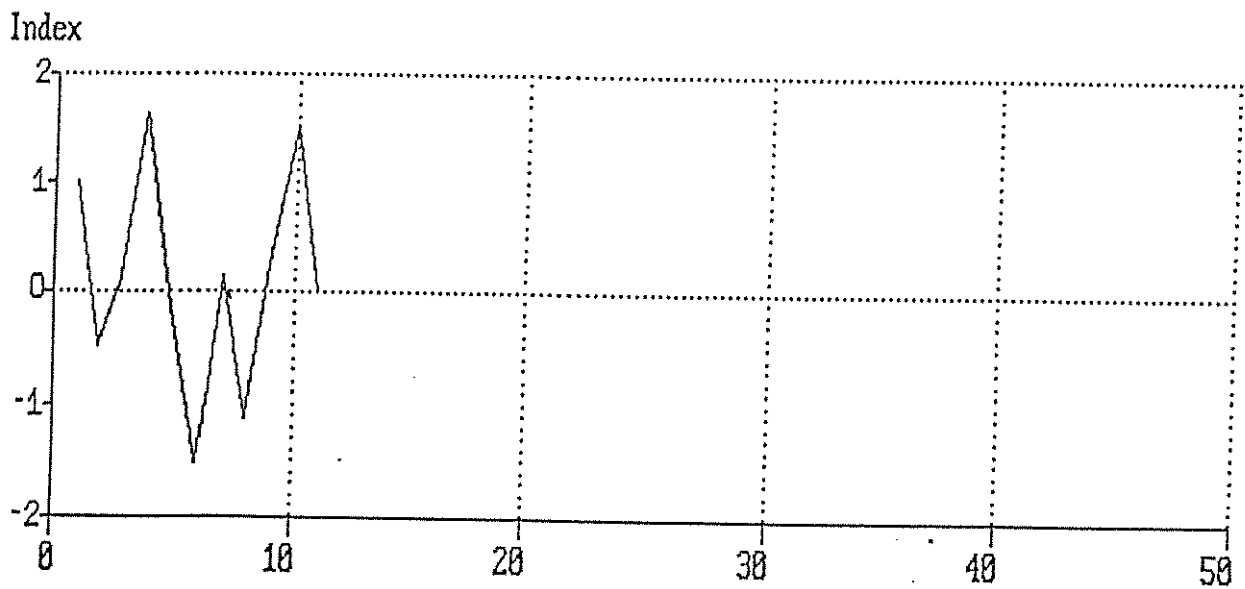


FIGURA 13 - Gráfico de hidropatia da sequência amino terminal, empregando o método de Kyte e Doolittle (1982). Janela : 2 resíduos.

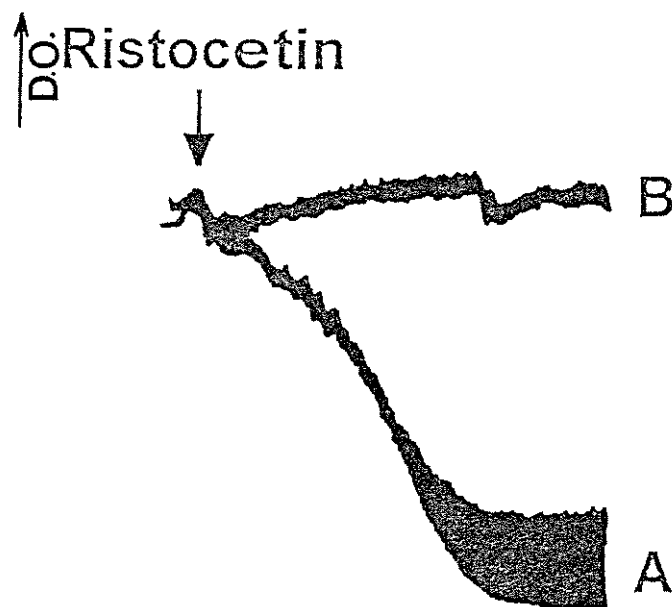


FIGURA 14 - Efeito inibitório da Fração SIII sobre a agregação plaquetária induzida pela ristocetina (1mg/ml). À suspensão de plaquetas lavadas (200 μ l) foi adicionado 200 μ l de plasma pobre em plaquetas (PPP) e a mesma foi previamente incubada por 5 min. sob agitação constante (900 rpm/min). A Fração SIII foi pré-incubada por um período de 3 minutos antes da adição da ristocetina.

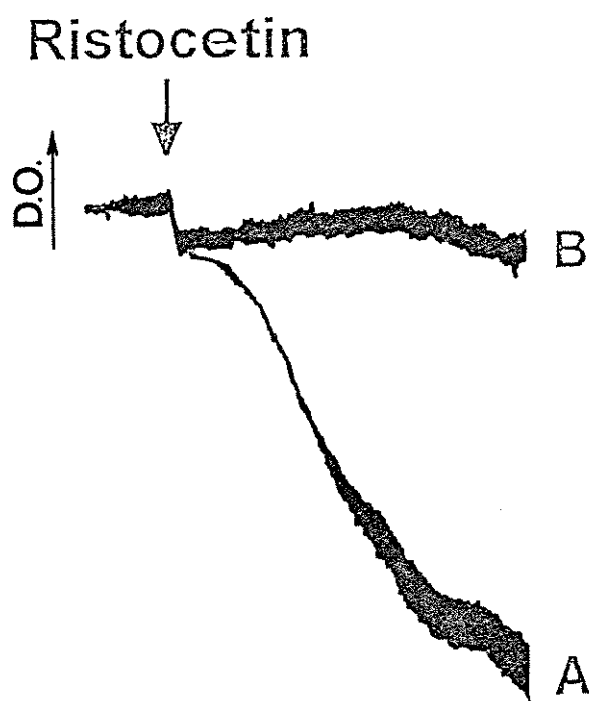


FIGURA 15 - Efeito inibitório da Fração SIII - 3rp sobre a agregação plaquetária induzida pela ristocetina (1mg/ml). À suspensão de plaquetas lavadas (200 μ l) foi adicionado 200 μ l de plasma pobre em plaquetas (PPP) e a mesma foi previamente incubada por 5 min. sob agitação constante (900 rpm/min). A Fração SIII - 3 foi pré-incubada por um período de 3 minutos antes da adição da ristocetina.

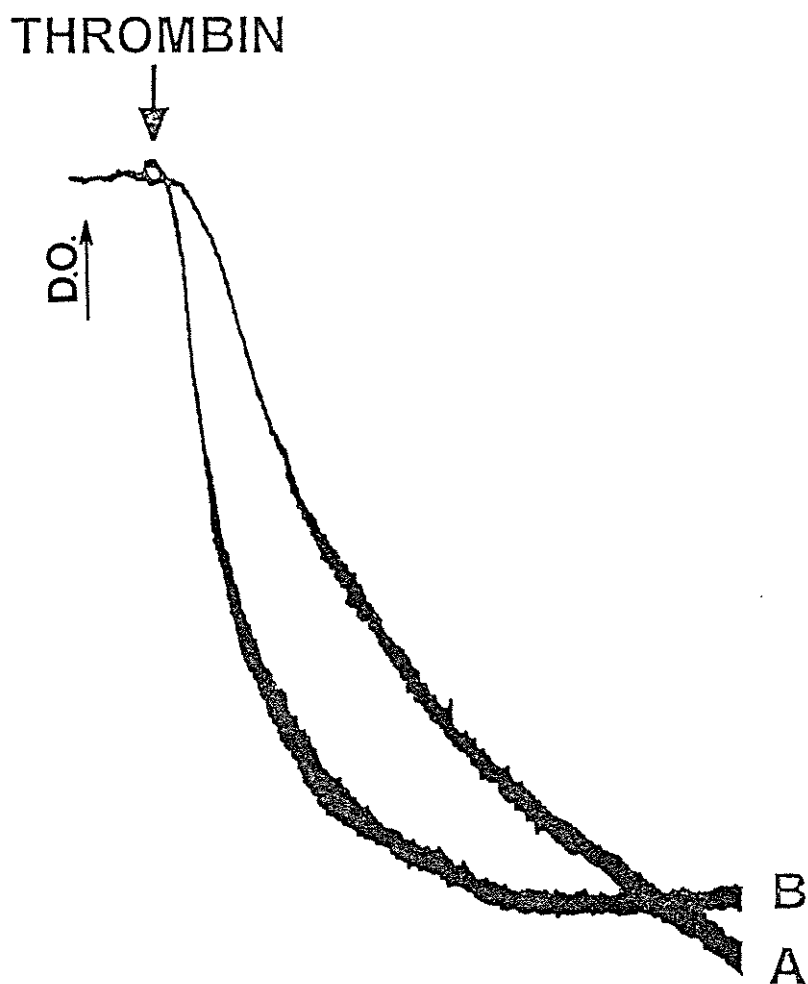


FIGURA 16 - Ausência de efeito da Fração SIII - 3rp sobre a agregação plaquetária induzida pela trombina (100mU/ml). À suspensão de plaquetas lavadas (200 μ l) foi adicionado 200 μ l de plasma pobre em plaquetas (PPP) e a mesma foi previamente incubada por 5 min. sob agitação constante (900 rpm/min). A Fração SIII - 3 foi pré-incubada por um período de 3 minutos antes da adição da trombina.

4. DISCUSSÃO

O mecanismo molecular responsável pela ligação do vWF a GPIb ainda está por ser elucidado. Enquanto o vWF e plaquetas coexistem na circulação sem que nenhuma interação ocorra normalmente, a GPIb atua como um receptor para o vWF exposto no subendotélio (Turitto et al., 1985). Esta interação pode ser o resultado de conformações funcionais específicas adquiridas pelo vWF quando em contacto com componentes da parede vascular. Alternadamente, ou em adição, pode ser a consequência de mudanças no receptor de GPIb induzida por substâncias agonistas ainda não identificadas e/ou condições reológicas, como demonstrado através da exposição de plaquetas em "stress" provocado por dano vascular. (Moake et al., 1988).

O entendimento da natureza química desta interação é de importância tanto teórica como prática e pode levar a formulação de novas estratégias antitrombóticas. Portanto é importante conhecer a ligação do vWF a GPIb utilizando diferentes sistemas de ensaios envolvendo domínios favoráveis similares ou distintos nos receptores das moléculas.

O receptor para ligação, tanto para ristocetina como para botrocetina, no vWF envolve duas regiões da molécula ligadas por uma ponte dissulfeto (Figura 1). (Mohri et al., 1988)

Na GPIb α (Figura 2) o sítio de ligação ao vWF está localizado na região 45 kDa N-terminal (Titani et al, 1987; Lopez et al., 1987; Ruggeri et al., 1989;

Berndt et al., 1986), sendo postulado que o sítio de ligação do vWF na GPIb é formado por elementos descontínuos de seqüência arranjados em proximidade especial na molécula nativa, e que a orientação apropriada destas seqüências pode influenciar a afinidade de ligação (Ruggeri et al., 1989).

A maior parte dos estudos para localizar os sítios de ligação de ristocetina e botrocetina ao vWF e GPIb foi realizada utilizando-se anticorpos monoclonais, porém anticorpos podem inibir a função de uma molécula mudando sua conformação sem necessariamente se ligar ao domínio funcional responsável por esta função. (Fujimura et al., 1986)

Os testes de agregação direta ou indireta da agregação plaquetária utilizando-se ristocetina como padrão foram realizados após a cromatografia de exclusão molecular em Sephadex G-75. (Figura 6), pois os lotes de veneno utilizados neste trabalho apresentam uma potente proteína coagulante, que é eluída na fração S-II, que inviabiliza o teste de agregação que utiliza plasma rico em plaquetas como um dos componentes do teste.

Os testes de agregação plaquetária realizados com a fração S-III mostram que esta fração não agrega plaqueta diretamente, não inibe α trombina, não induz a agregação na presença de vWF, porém inibe a agregação plaquetária induzida pela ristocetina.

Estes resultados são indicativos que as proteínas contidas na fração SIII possuem atividades biológicas diferentes daquelas apresentadas pela albogreguina-B (agregação plaquetária direta através de ligação com o complexo GPIb (Yoshida et al., 1993), botrocetina (indução da agregação

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
SIII-3rp	D	C	P	S	D	W	S	P	Y	E	G
Bot. α	D	C	P	S	G	W	S	S	Y	E	G
Bot. β	D	C	P	P	D	W	S	S	Y	E	G
Botj. 13KDa	D	C	P	X	D	W	S	X	Y		
Botj. 15KDa	D	C	P	S	D	W	S	P	Y	G	
AL - B 1	D	C	P	S	D	W	S	S	Y	D	L
AL - B 2	D	C	P	S	D	W	S	S	F	K	Q
Echinoidina	C	C	P	T	F	W	T	S	F	G	S
BJL	N	N	C	P	Q	D	W	L	P	M	N

Figura 17 - Homologia na seqüência de aminoácidos entre SIII - 3, botrocetina de duas cadeias (Bot. α , Bot. β) (Usami, Y. et al., 1993), Bothrojaracin (Botj. 13KDa , Botj. 15KDa) (Zingali, R. B. et al., 1993), Alboagreguina (AL - B 1 e AL - B 2) (Yoshida et al., 1993) e lectinas do tipo C : Echinoidina (Hirabayashi, J. et al., 1991) e BJL (Ozeki, Y. et al., 1994).

plaquetária na presença de vWF) (Read et al., 1978) e botropsjaracina (inibição da α trombina (Zingali et al., 1993). Desta forma tornou-se interessante o isolamento e purificação de proteínas da fração SIII-3 do veneno de *B.alternatus* com a propriedade de se ligar ao vWF.

Através da cromatografia de troca iônica (DEAE 5PW) a fração SIII foi desdobrada em 3 picos principais de absorção, SIII-1, SIII-2 e SIII-3 (Figura 9).

No teste de agregação plaquetária a fração SIII-3 é a que apresenta atividade de inibição da ligação da ristocetina ao vWF. A fração SIII-3 quando submetida a eletroforese (PAGE-SDS) sob condições não redutoras se observa uma única banda de massa molecular de 28 kDa (Figura 11).

A fração SIII-3 foi submetida a uma repurificação através de HPLC em fase reversa usando uma coluna C18. (Figura 10)

A característica do pico de eluição da proteína SIII-3 repurificada (SIII-3rp) demonstra o grau de pureza e homogeneidade. A migração eletroforética das bandas sugere que a proteína SIII-3 é um homodímero composto por duas cadeias de 15 kDa.

COMPOSIÇÃO DE AMINOÁCIDOS E HOMOLOGIA SEQUENCIAL

Analisando-se a fração em relação à composição de aminoácidos (Tabela I) e homologia sequencial de aminoácidos (Figura 17) pode-se observar que existem características estruturais muito similares entre estas

- 1 - A fração SIII-3 rp tem uma composição de aminoácidos rica em resíduos ácidos (Asx e Glx) o que também é uma característica da botrocetina (34-Asx, 39-Glx) (Fujimura et al, 1991).
- 2 - Pela homologia sequencial dos primeiros onze resíduos da fração SIII-3 rp obtem-se: 82% de homologia com a cadeia α da botrocetina (Asp5-Gly, Pro8-Ser); 82% de homologia com a cadeia β da botrocetina (Ser4-Pro; Pro8-Ser); 100% de homologia com os sete primeiros resíduos identificados da cadeia de 13KDa da botropsjaracina e 90% com a cadeia de 15 kDa (Glu10-Gly); 73% com o pico 1 de alboagreguina-B (AL-B). (Pro8-Ser, Glu10-Asp6, Gly11-Leu) e 64% com o pico 2 (Pro8-Ser, Tyr9-Phe, Glu10-Lys, Gly11-Gln).
- 3 - Quando comparada às lectinas do tipo C (Lectinas animais) apresenta 54% de hemologia com a BJL, uma lectina isolada do veneno de *B.jararaca*, com características químicas e estruturais (massa molecular aparente, número de cadeias = 2) semelhantes a botrocetina, porém sem apresentar atividade de coagulinina (Ozeki et al, 1994), e 27% com a echinoidina, uma lectina isolada do ouriço do mar (*Anthocidaris crassispina*).

ATIVIDADE BIOLÓGICA

Nos testes de agregação plaquetária a fração SIII-3rp não apresentou atividade de trombina - "like"mediada pelo complexo glicoproteico IIb-IIIa (GpIIb-IIIa) ou inibição da atividade de trombina (Figura 16) o que demonstra mais um critério de pureza da fração SIII-3rp (ausência de atividade coagulante).

Os resultados de atividade biológica obtidos com a fração SIII-rp:

1 - Diferem consideravelmente daqueles da botrocetina (Andrews et al 1989, Fujimura et al 1991) visto que a fração SIII-rp não induz a aglutinação plaquetária pela ligação do fator de von Willebrand ao complexo glicoproteico Ib-IX de plaquetas (coaglutinação) (Figura 15).

2 - Quando se compara a fração SIII-rp ao análogo de botrocetina sem atividade de coagulinina isolada por Andrews et al, (1989), verifica-se que este não é capaz de inibir a ristocetina.

3 - A botropsjaracina (Zingali et al, 1993) inibe a ligação de α trombina ao complexo glicoproteico IIb-IIIa de plaquetas (GPIIb-IIIa) e não tem atividade de coaglutinação ou de inibir a ligação de ristocetina, sendo que os autores sugerem que a botropsjaracina poderia ser o análogo da botrocetina isolado por Andrews et al, 1989.

4 - A albogreguina B isolada de *T.albolabris* (Peng et al, 1991) provoca aglutinação direta (aglutinina) pela ligação ao complexo glicoproteico de plaquetas Ib (GPIb) e também como a fração SIII-3rp inibe a ligação de ristocetina ao fator de von Willebrand (vWF).

Outro aspecto relevante a ser considerado quando se compara as diversas atividades biológicas e estruturais destas proteínas é que a composição do material inicial vai determinar a natureza do produto final. Estas proteínas foram todas isoladas de "pools" de venenos, isto é veneno colhido de um grupo de indivíduos geralmente de uma mesma região geográfica, sendo que determinadas atividades biológicas podem estar expressas com maior ou menor intensidade ou mesmo ausentes (Fujimura et al, 1991).

O isolamento e caracterização da proteína SIII-3rp vem corroborar a hipótese de Zingali et al, 1993, de que estas proteínas pertencem a uma família

com alta homologia estrutural com atividades biológicas e funcionais diferentes.

No presente trabalho foi isolada e caracterizada uma proteína do veneno de *Bothrops alternatus* que se liga ao fator de von Willebrand.

Como perspectivas futuras, a seqüência completa de aminoácidos desta proteína seria um passo importante para elucidar a relação entre estrutura e função biológica deste grupo de proteínas e ampliar o conhecimento em relação à ativação do fator de von Willebrand.

5. BIBLIOGRAFIA

- ANDREWS, R.K.; BOOTH, W.J.; GORMAN, J.J.; CASTALDI, P.A. and BERNDT, M.C. (1989a): Purification of botrocetina from *Bothrops jararaca* venom. Analysis of the botrocetin-mediated interaction between von Willebrand factor and the human platelet glycoprotein Ib-IX complex. **Biochemistry.**, 28:8317-8326.
- ANDREWS, R.K.; GORMAN, J.J.; BOOTH, W.J.; CORINO, G.L.; CASTALDI, P.A. and BERNDT, M.C. (1989b): Cross-linking of a monomeric 39/34 - kDa disperse fragment of von Willebrand factor (Leu-480/Val-481 - Gly 718) to the N-terminal region of the α chain of membrane glycoprotein Ib. **Biochemistry.**, 28:8326-8336.
- BERNDT, M.C. and CAEN, J.P. (1984): **Progress in haemostasis and thrombosis.** (Spaet, T.H., Ed.), 7:111-150
- BERNDT, M.C.; CHONG, B.H.; BULL, H.A.; ZOLA, H. and CASTALDI, P.A. (1985): Molecular characterization of quinine/quinine drug - dependent antibody platelet interaction using monoclonal antibodies. **Blood**, 66:1292-1301.

- BERNDT, M.C.; GREGORY, C.; DOWDEN, G. and CASTALDI, P.A. (1986): Thrombin interactions with platelet membrane proteins. **Ann N.Y. Acad. Sci.**, 485:374-386.
- BIDLINGMEYER, B.A.; GOHEM, S.A. & TARVIN, T.L. (1984): Rapid analysis of aminoacids using pre column derivatization. **J.Chromatogr.**, 336:93-104
- BORN, G.V.R. & CROSS, M.J. (1963): The aggregation of blood platelets. **J.Physiol.**, 168:178-195
- BRINKHOUS, K.M; BARNES, D.S.; POTTERS, J.Y. & READ, M.S. (1981): von Willebrand syndrome induced by a Bothrops venom factor: Bioassay for venom coagglutinin. **Proc.Natl.Acad.Sci., USA**, 78: 3230-3235
- BRINKHOUS, K.M.; READ, M.S.; FRICKE, W.A. & WAGNER, R.H. (1983): Botrocetin (venom coagglutinin): Reaction with a broad spectrum of multimeric forms of factor VIII macromolecular complex. **Proc.Natl.Acad.Sci., USA**, 80: 1463-1466
- BRINKHOUS, K.M. & READ, M.S. (1989): Fixation platelets and platelet agglutination/aggregation tests. **Meth. Enzymol.** 169:149-166

CAEN, J.P.; NURDEN, A.T.; JEANNEAU, C.; MICHEL, H.; TOBELEM, G.,
LEVY-TOLEDANO, S.; SULTAN, Y.; VALENSI, F. & BERNARD, J.
(1976): Bernard - Souller syndrome: a new platelet glycoprotein
abnormolity. Its relationship with platelet adension to subendothelium and
with the factor VIII von Willebrand protein. **J.Lab.Clin.Med.**, 87:586-
596

COLMAN, R.W. (1986): Platelet activation: role of an ADP receptor.
Semin.Hematol., 23: 119-128

DERENLEAU, D.A. (1987): Blood platelet shape change ABCs. **Trends
Biochem. Sci** 12, 439-442

EDMAN, P. and BEGG, G. (1967). A protein sequenator. **Eur.J.Biochem.**,
1:80-91

FOX, J.E.B. (1985): Identification of actin-binding protein as the protein
linking the membrane skeleton to glycoproteins on platelet plasma
membranes. **J.Biol.Chem.**, 260:11970-11977

FUJIMURA, Y.; TITANI, K.; HOLLAND, L.Z.; RUSSEL, S.R.; ROBERTS,
J.R.; EDLER, J.H.; RUGGERI, Z.M. and ZIMMERMAN, T.S. (1986):
von Willebrand factor: A reduced and alkylated 52/48 kDa fragment
beginning at aminoacid residue 449 contains the domain interacting with
platelet glycoprotein Ib. **J.Biol.Chem.**, 261:381-385.

FUJIMURA, Y.; HOLLAND, L.Z.; RUGGERI, Z.M.& ZIMMERMAN, T.S. (1987): The von Willebrand factor domain mediating botrocetin-induced binding to glycoprotein IB lies between Val499 and Lys728. **Blood.**, 70:985-988

FUJIMURA, Y.; TITANI, K.; USAMI, Y.; NINOMI, K.; NISHIO, K.; TAKASE, T.; YOSHIKA, A. & FUKUI, H. (1991a): Studies on anti-von Willebrand factor (vWF) monoclonal antibody NMC-4 which inhibits both ristocetin and botrocetin induced vWF binding to platelet glycoprotein Ib. **Blood.**, 77:113-120

FUJIMURA, Y.; USAMI, Y.; TITANI, K.; SUZUKI, M.; OYAMA, R.; MATSUI, T.; FUKUI, H.; SUGIMOTO, M. & RUGGERI, Z.M. (1991b): Isolation and chemical characterization of two structural and functionally distinct forms of botrocetin. **Biochemistry**, 30:1957-1964

FREUND, J. (1965): The mode of action of immunologic adjuvantes. **Adv.Tuber.Res.**, 7:130-132

GANZ, P.N.; TACKABERRY, E.S. and ROCK, G. (1986): The binding of purified factor VIII to platelets. In: **Progress in Clinical and Biological Research**, Vol. 283, Platelet Membrane Receptors: Molecular Biology, Immunology, Biochemistry, and Pathology, pp. 255-261 (JAMIESON, G.A., Ed.) New York: Alan R. Liss.

- GEORGE, J.N.; NURDEN, A.T. & PHILLIPS, D.R. (Eds) (1985): **Platelet membrane glycoproteins**. New York: Plenum Press.
- GERSHONI, J.M. and PALADE, G.E. (1983): Protein Blotting: principles and applications. **Anal. Biochem.**, 131:1-8
- GIRMA, J.P.; MEYER, D.; VERWEIJ, C.L.; PANNEKOEK, H. and SIXMA, J.J. (1987): Structure function relation ship of human von Willebrand factor. **Blood.**, 70:605-611
- GRABAR, P. & WILLIAMS, C.A. (1953): Méthode permettant L'étude conjuguée des propriétés eletrophoretiques et immunoquimiques D'un mélange de protéines application an serum sanguin. **Biochim. Biophys Acta**, 10:193-194
- HARRIS, J.B. (Ed) (1986) **Natural Toxins: Animal, Plant and Microbial**. Oxford: Oxford University Press.
- HAWIGER, J. (1989): Platelet secretory pathways **Meth Enzymol.** 169, 191-195
- HIRAYASHI, J.; KUSONOKI, T. and KASAI, K. (1991): Complete primary structure of a galactose-specific lectin from the venom of the rattlesnake *crotalus atrox*. **J.Biol.Chem.**, 266:2320-2326

HOLSEM, H. (Ed) (1986): **Platelet responses and metabolism**. Vol. I-II, Boca Raton, FL: CRC Press

HOWARD, M.A.; PERKIN, J.; SALEM, H.H. & FIRKIN, B.G. (1984): The agglutination of human platelets by botrocetin: evidence that botrocetin and ristocetin act at different sites on the factor VIII molecule and platelet membrane. **Br.J.Haematol**, 57:25-35

HUNKAPILLER, M.W.; LUJAN, E.; OSTRANDER, F. and HOOD, L.E. (1983): Isolation of microgram quantities of proteins from polyacrylamide gels for aminoacid sequence analysis. **Meth. Enzymol.**, 91:227-231

JAFFE, E.A., HOYER, L.W., and NACHMAN, R.L., (1973): Synthesis of antihemophilic factor antigen by cultured human endothelial cells. **J.Clin.Invest.**, 52:2754-2764

JAMIESON, G.A. (ED.) (1988). **Progress in clinical and biological research**, vol 283, Platelet membrane receptors: molecular biology, immunology, biochemistry, and pathology. New York: Alan R. Liss

JUDSON, P.A.; ANSTEC, D.J. & CLAMP, J.R. (1982): Isolation and characterization of the major oligosaccharide of human platelet membrane glycoprotein GPIb. **Biochem.J.**, 205:81-90

- KATZMANN, J.A.; MUYSID, D.K.; MULLER, R.S. and TASS, D.N. (1981): Monoclonal antibodies to von Willebrand's factor: Reactivity with porcine and human antigens. **Blood.**, 58:530-536
- KINI, M.R. and EVANS, H.J. (1990): Effects of snake venom proteins on blood platelets. **Toxicon**, 28:1387-1422
- KYTE, J. and DOOLITTLE, R.F. (1982): A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. **J.Mol.Biol.**, 16:732-739
- LAEMULI, U.K. (1970): Cleavage of structural proteins among the assembly of the head of the bacteriophage T₄. **Nature**, 227:680-685
- LEE, C.Y. (Ed.) (1979) **Handbook of Experimental Pharmacology**, Vol. 52, Snake Venoms. Berlin: Springer
- LEGENDRE, N. and MATSUDAIRA, P. (1988): Direct protein microsequencing from immobilized-P transfer membrane. **Biotechniques**, 6:154-157
- LEUNG, L. and NACHMAN, R. (1986): Molecular mechanisms of platelet aggregation. **Ann Rev. Med.**, 37:179-186
- LOPEZ, J.; CHUNG, D.; FUJIKAWA, K.; HAGEN, F. & ROTH, G. (1987): Cloning of the α chain of human platelet glycoprotein Ib: A

transmembrane protein with homology to leucine-Rich α 2 glycoprotein.
Proc.Natl.Acad.Sci., USA, 84:5615-5619

LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L. and RONDALL, R.J.
(1951). Protein measument with the folin phenol reagent. **J.Biol.Chem.,**
193:265-275

MATSUDAIRA, P. (1987): Sequence from picomole quantities of proteins
electroblotted onto polyuinylidene difluoride membranes, **J.Biol.Chem.,**
262: 10035-10039

MERRIL, C.R.; GOLDMAN, D. and VAN KEUREN, M.I. (1984): Gel
protein stains: Silver Stain. **Meth.Enzymol., 104:441-447**

MEYER, D.; BAUMGARTHER, H.R. and EDGINGTON, T.S. (1984):
Hybridoma antibodies to human von Willebrand factor. **Br.J. Haematol,**
57:609-620

MOAKE, J.L.; TURNER, N.A.; STATHOPOULOS, N.A.; NOLASCO, L. and
HELLUMS, J.D. (1988) Shear-induced platelet aggregation can be
mediated by vWF revesead from platelets, as well as by exogenous large
or unusually large vWF multimers, requires adenosine diphosphate, and is
resistant to aspirin. **Blood., 71:1366-1374**

MOHRI, H.; FUJIMURA, Y.; SHIMA, M.; YOSHIOKA, A.; HOUGHTEN, R.A.; RUGGERI, Z.M. and ZIMMERMAN, T.S. (1988): Structure of the von Willebrand factor domain interacting with glycoprotein IB **J.Biol.Chem.**, 263:17901-17904

MOROSE, R and HOYER, L.W. (1986): von Willebrand factor and platelet function. **Ann. Rev. Med.**, 37:157-163

NACHMAN, R.L.; LEVINE, R. and JAFFE, E.A. (1977). **Thromb. Res.**, 11:433-438

NEISENBON, H.E.; SEKI, C. & VIDAL, J.C. (1986): Phospholipase A2 from *Bothrops alternatus*, (Vibora de la cruz) venom. Purification and some characteristic properties. **Toxicon**, 24:259-272

NIEWIAROWSKI, S. (1987): Platelet membrane components and receptors. **Hematologia**, 20:3-14

OKUMURA, T.; HASITZ, M. & JAMILSON, G.A. (1978): Platelet glyco-calicin. **J.Biol.Chem.**, 253:3435-3445

OUCHTERLONY, O. (1958): Diffusion in gel methods for immunological analysis. **Prog. Allerg.**, 5:78-82

- OUYANG, C.; TENG, C.H. and HUANG, T.F. (1992): Characterization of snake venom components acting on blood coagulation and platelet function. **Toxicon**, 30:945-966
- OZEKI, Y.; MATSUI, T.; HAMAKO, J.; SUZUKI, M.; FUJIMURA, Y.; YOSHIDA, E.; NISHIDA, S.; & TITANI, K. (1994): C-type galactoside binding lectin from *Bothrops jararaca* venom: comparison of its structure and function with those of botrocetin. **Arch.Biochem.Biophys.**, 308:306-310
- PACKHAM, M.A. and MUSTARD, J.F. (1986): Interactions of platelet activating pathways: studies with inhibitors of specific individual pathways. In: Platelet responses and metabolism. Vol.I, Responses, pp.267-283 (Holmsen, H.Ed). Boca Raton, Fl: CRC Press
- PEERSCHKE, E.I.B (1985): The platelet fibrinogen receptor. **Sem.Hematol.**, 22:241-259
- PENG, M.; LU, W. & KIRBY, E.P. (1991): alboaggregin-B: A new platelet agonist that binds to platelet membrane glycoprotein Ib. **Biochemistry**, 30:11529-11536
- PHILLIPS, D.R. and SHUMAN, M.A. (EDS) (1986). Biochemistry of platelets. Orlando, FL: Academic Press

- PIRKLE, H. and MARKLAND, Jr, F.S (Eds) (1988) Hematology, Vol. 7, Hemostasis and Animal Venoms. New York: Marcel Dekker
- PLOW, E.F.; MARGUERIE, G. and GINSBERG, M.H. (1987): Fibrinogen receptors, and the peptides that inhibit these interactions. **Biochem. Pharmac.**, 36:4035-4040
- RADOMSKI, M.W. & MONCADA, S. (1983): An improved method for washing of human platelets with prostacyclin. **Thromb.Res.**, 30:383-389
- READ, M.S.; SHERMER, R.W. & BRINKHOUS, K.M. (1978): Venom coagglutinin: An activator of platelet aggregation dependent on von Willebrand factor. **Proc.Natl.Acad.Sci., USA**, 75:4514-4518
- READ, M.S.; POTTER, J.Y. & BRINKHOUS, K.M. (1983): Venom coagglutinin for detection of von Willebrand factor activity in animal plasmas, **J.Lab.Clin.Med.**, 101:74-82
- READ, M.S.; SMITH, S.V.; LAMB, M.A. & BRINKHOUS, K.M. (1989): Role of botrocetin in platelet agglutination: Formation of an activated complex of botrocetin and von Willebrand factor. **Blood.**, 74:1031-1035
- ROSTAGNO, A.A.; FRANGIONE, B. & GOLD, L. (1991): Biochemical studies on the interaction of fibronectin with Ig. **J.Immunol.**, 146:2687-2693

- RUGGERI, Z.M.; DE MARCO, L; GATTI, L; BADER, R. and MONTGOMERY, R.R. (1983): Platelets have more than one binding site for von Willebrand factor. **J. Clin. Invest.**, 72:1-12.
- SADLER, J.E. (1991): von Willebrand factor. **J.Biol.Chem.**, 266:22777-22780.
- TITANI, K.; KUMAR, S.; TAKEO, K.; ERICSSON, L.H.; WADE, R.D.; ASHIDA, K.; WALSH, K.A.; CHOPEK, M.W.; SADLER, N.E. and FUYIKAWA, K. (1986): Aminoacid sequence of human von Willebrand factor. **Biochemistry**, 25:3171-3184.
- TITANI, K.; TAKIO, K.; HANDA, M. & RUGGERI, Z. (1987): Aminoacid sequence of the von Willebrand factor-binding domain of platelet membrane glycoprotein Ib. **Proc.Natl.Acad.Sci., USA**, 84:5610-5614
- TOBELEM, G.; LEVY-TOLENDANO, S.; BREDOUX, R.; MICHEL, H., NURDEN, A. & CAEN, J. (1976): New aproach to determination of specific functions of platelet membranes sites. **Nature**, 263:427-428
- TOWBIN, H.; STAEHELIN, T. and GORDON, J. (1979): Eletrophoretic transfer of proteins from polyacrilamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proc.Natl.Acad.Sci., USA**, 76:4350-4356

- TRACY, P.B. and MANN, K.G. (1966a): Platelet involvement in coagulation. In: Platelet Responses and Metabolism. Vol. I, Responses, pp. 297-324 (HOLMSEN, H., Ed.). Boca Raton, Fl: CRC Press
- TRACY, P.B. and MANN, K.G. (1966b): A model for assembly of coagulation factor complexes on cell surfaces: prothrombin activation on platelets. In: **Biochemistry of Platelets**, pp.295-318 (PHILLIPS, D.R. and SCHUMAN, M.A., Eds). Orlando, Fl: Academic Press
- TURITTO, V.T.; WEISS, H.J.; ZIMERMAN, T.S. and SUSMAN, I.I. (1985): Factor VIII/von Willebrand factor in subendothelium mediates platelet adhesion. **Blood.**, 65:823-831
- USAMI, Y.; FUJIMURA, T.; SUZUKI, M.; OZEKI, Y.; NISHIO, Y.; FUKUI, H. & TITANI, K. (1993): Primary structure of two-chain botrocetin a von Willebrand factor modulator purified from the venom of *Bothrops jararaca*. **Proc.Natl.Acad.Sci., USA**, 90:920-932
- VARGAFTIG, B.B.; CHIGNARD, N. & BENVENISTE, J. (1981): Present concepts on the mechanisms of platelet aggregation. **Biochem.Pharmacol.**, 30:263-271
- WEISS, H.J. & HOYER, L.W. (1973): von Willebrand factor: Dissociation from antihemophilic factor procoagulant activity. **Science**, 182:1149-

WESTWICK, J.; SWLLY, M.F.; MACINTYRE, D.E. & KAKKAR, V.V. (Eds) (1985): Advances in experimental medicine and biology. 192, Mechanisms of stimulus-response coupling in platelet. New York:, Plenum Press

YOSHIDA, E.; FUJIMURA, Y.; MIURA, S.; SUGIMOTO, M.; FUKUI, H.; NARITA, N.; USANI, Y.; SUZUKI, M. & TITANI, K. (1993): Alboaggregin-B and bothrocetin, two snake venom proteins with highly homologous amino acid sequences but totally distinct functions on von Willebrand factor binding to platelets. **Biochem.Biophys.Res.Commun.**, 80:1382-1392

ZIMMERMAN, T.S. and EDGINTON, T.S. (1973): Factor VIII coagulant activity and factor VIII - like antigen: independent molecular entities. **J. Exp. Med.**, 138:1015-1020.

ZIMMERMANN, T.S. and RUGGERI, Z.M. (1982). Progress in haemostasis and thrombosis. (Spaet, T.H., Ed.), 203-236. Editora

ZINGALI, R.B.; JANDROT-PERRUS, M.; GUILLIN, M.C. & BORN, C. (1993): Bothroparacin, a new thrombin inhibitor isolated from *Bothrops jararaca* venom: Characterization and mechanism of the thrombin inhibition. **Biochemistry**, 32:10794-10802

ZUCKER, N.B. (1989): Platelet aggrgation measured by the photometric method. **Meth.Enzymol.**, 169:117-133