

BC/27644

IB/80926



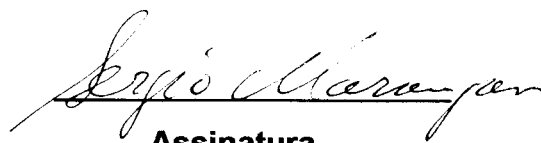
UNICAMP

LOCAL E DATA: CAMPINAS, 10 DE NOVEMBRO DE 1995.

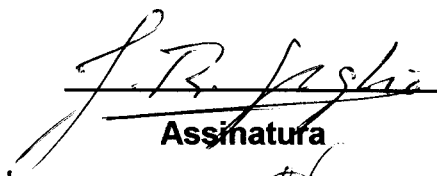
BANCA EXAMINADORA:

TITULARES:

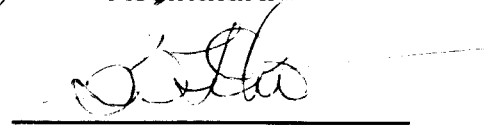
Prof. Dr. SERGIO MARANGONI (Orientador)


Assinatura

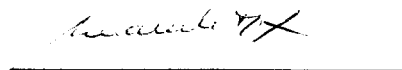
Prof. Dr. JOSÉ ROBERTO GIGLIO


Assinatura

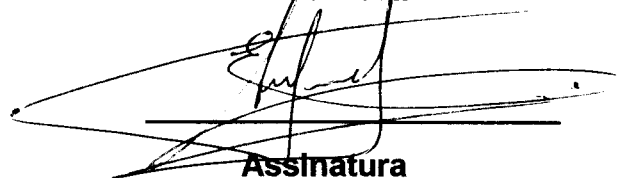
Prof. Dr. BENEDITO DE OLIVEIRA


Assinatura

Profa. Dra. NORA MARCELA HAUN QUIRÓS


Assinatura

Prof. Dr. EDSON ANTUNES


Assinatura

SUPLENTE

Prof. Dr. JOSÉ CAMILLO NOVELLO


Assinatura

Prof. Dr. LUIZ ALBERTO MAGNA

Assinatura

APROVADA

MARISTELA FREITAS PEREIRA

Determinação da Estrutura Primária e da
Atividade Biológica de uma Fosfolipase A₂
Miotóxica (BthTX-II) do Veneno de *Bothrops*
jararacussu

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato(a)
Maristela Freitas Pereira
ne
e aprovada pela Comissão Julgadora.

30/11/95

CAMPINAS- 1995

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

UNIDADE IB
N.º CHAMADA:
TIUNICAMP
P414d
N.º DO L. 27644
N.º 667192
N.º DO R. 11,00
DATA 03/05/96
N.º OFO

CM-00087506-4



FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA CENTRAL DA UNICAMP

P414d **Pereira, Maristela Freitas**
Determinação da estrutura primária e da atividade biológica de uma fosfolipase A2 miotóxica (Bth TX-II) do veneno de *Bothrops Jararacussu* / Maristela Freitas Pereira. — Campinas, SP : [s.n.], 1995.

Orientador : Sergio Marangoni.
Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Campinas.
Instituto de Biologia.

1. Fosfolipase. 2. Venenos. 3. Edema. 4. Cobra.
5. Inflamação. I. Marangoni, Sergio. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

MARISTELA FREITAS PEREIRA

**Determinação da Estrutura Primária e da
Atividade Biológica de uma Fosfolipase
A₂ Miotóxica (BthTX-II) do Veneno de
*Bothrops jararacussu***

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

ORIENTADOR :Prof.Dr. SERGIO MARANGONI

CAMPINAS - SP

1995

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Sergio Marangoni, orientador deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Benedito de Oliveira, Prof. Dr. José Roberto Giglio e ao Prof. Dr. José Camillo Novello, pela orientação , pelo incentivo e oportunidade..

À Elen Cristina Teizem Landucci pelo auxílio e colaboração nos testes farmacológicos.

À Maria Risoleta Freire Marques pelo carinho e amizade

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

À FAPESP pelo apoio financeiro deste projeto

ÍNDICE

RESUMO.....	07
INTRODUÇÃO.....	10
MATERIAIS E MÉTODOS.....	26
RESULTADOS.....	44
DISCUSSÃO.....	63
CONCLUSÕES.....	79
PERSPECTIVAS FUTURAS.....	81
COMUNICAÇÕES EM CONGRESSOS.....	83
TRABALHOS A SEREM PUBLICADOS.....	86
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	88
SUMMARY.....	100

ÍNDICE DE FIGURAS E TABELAS

FIGURA 01.....	12
FIGURA 02.....	33
FIGURA 03.....	46
FIGURA 04.....	47
FIGURA 05.....	48
FIGURA 06.....	51
FIGURA 07.....	53
FIGURA 08.....	54
FIGURA 09.....	56
FIGURA 10.....	57
FIGURA 11.....	58
FIGURA 12.....	59
FIGURA 13.....	60
FIGURA 14.....	61
FIGURA 15.....	62
FIGURA 16.....	68
FIGURA 17.....	70
FIGURA 18.....	72
TABELA 1.....	50

ABREVIACÕES

PLA₂	FOSFOLIPASE A ₂
DTT	DITIOREITOL
EDTA	ÁCIDO ETILENO DIAMINO TETRACÉTICO
kDa	KILODALTON
M	MOLAR
PAGE	ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA
PM	PESO MOLECULAR
PITC	FENILISOTIOCIANATO
5-HT	5-HIDROXITRIPTAMINA
PTH	FENILTIOHIDANTOINA
SDS	DODECIL SULFATO DE SÓDIO
TEMED	N-N-N'-N' - TETRAMETILETILENODIAMINA
TFA	ÁCIDO TRIFLUOROACÉTICO
TRIS	TRIS HIDROXIMETIL AMINO METANO
sn-2	LIGAO ÉSTER DO CARBONO 2 DO FOSFOLIPÍDEO

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

Segundo nomenclatura IUPAC

Resumo

Resumo

Bothropstoxina II (BthTX-II) com atividade fosfolipásica A_2 residual, é uma proteína única com peso molecular calculado de 13.976 é parcialmente responsável pela atividade miotóxica do veneno de *Bothrops jararacussu*.

A estrutura primária da BthTX-II, determinada por sequenciamento automático direto da região N-terminal (32 resíduos) da proteína reduzida e carboximetilada e por sequenciamento automático dos peptídeos provenientes das clivagens enzimáticas com protease V₈ de *Staphylococcus aureus* e clostripaína de *Clostridium histolyticum*, é a seguinte:

**DLWQWGQMILKETGKLFPYYTTYGCYCGWGGRGKPVDPDR
CCFVHDCCYKVTNYCPKKNDRYSYSRVSYNYCLGGPCDKQICEC
DKAIAVCFRENLTYNKKAYYHLKPFCKEPAETC**

O alinhamento desta sequência com outras PLA_2 s e miotoxinas com estrutura de PLA_2 mostram um alto grau de homologia.

Apesar do resíduo Asp-49 ter sido apontado por muitos autores como sendo fundamental para a atividade fosfolipásica A_2 desta família de proteínas, BthTX-II possui atividade catalítica residual sobre lecitina de gema de ovo.

A formação local de edema é o acontecimento mais comum decorrente da picada de uma serpente. A resposta edematogênica da BthTX-II em ratos, foi de início rápida, atingindo a resposta máxima entre 30 e 60 minutos após

a injeção, decaindo sensivelmente após este intervalo. O tratamento prévio dos animais com cyproheptadina (antagonista de histamina e serotonina) praticamente aboliu a resposta edematogênica da BthTX-II, indicando que o edema é decorrente da degranulação de mastócitos *in vivo*. De fato, estudos prévios demonstram que esse é o mecanismo pelo qual diversas PLA₂s são edematogênicas em ratos.

O desenvolvimento do edema decorrente da injeção de BthTX-II, consequência da liberação de histamina e serotonina (5-HT) oriundas de mastócitos corrobora os dados obtidos por outros autores, sugerindo que a primeira ação irritante de PLA₂s é a liberação de aminas de mastócitos .

Sendo assim, a atividade inflamatória de PLA₂ pode ser atribuída a um efeito direto, não enzimático. Esses dados reforçam a evidência de sítios independentes para a expressão das atividades enzimática e farmacológicas destas moléculas.

O fato de BthTX-II se apresentar como uma miotoxina PLA₂ Asp-49 e possuir atividade catalítica residual sugere a necessidade de uma revisão da forma de classificação desta família de proteínas.

INTRODUÇÃO

Introdução

Fosfolipases A₂ (PLA₂s), também conhecidas como fosfatidil acil-hidrolases (E.C.3.1.1.4), são enzimas lipolíticas que agem especificamente na catálise da hidrólise da ligação éster na posição 2- acil (sn-2) dos L-fosfolípidos, que são considerados substratos igualmente adequados para os processos hidrolíticos catalisados pelas demais fosfolipases (A₁, C, D) (*Slotboom e cols., 1982*). (Fig.1).

A reação catalizada pela PLA₂ é dependente de cálcio e proporciona a liberação de ácidos graxos e lisofosfatídeos (*Hanahan, 1971*). Resultados obtidos com experimentos de marcação e cristalografia de Raio-X da PLA₂ pancreática bovina, na presença de íons Ca⁺⁺, demonstraram que o aminoácido Asp-49 é o resíduo responsável pelo controle de ligação destes íons (*Lee & Ho, 1978; Chang e cols., 1987*).

As PLA₂s são consideradas como modelos nos processos catalíticos que se desenvolvem na interface lipídeo/água, pois atuam preferencialmente em substratos agregados como micelas, bicamadas ou lipoproteínas. Isto explica a ampla distribuição das PLA₂s no reino animal com presença demonstrada em organelas subcelulares, extracelulares, bem como a sua participação em inúmeros fenômenos fisiopatológicos e/ou fisiológicos (*Fleer e cols., 1981*).

Historicamente, as primeiras PLA₂s caracterizadas detalhadamente foram as pancreáticas (mamíferos) e as de venenos de várias serpentes. Estas PLA₂s

apresentam alta homologia sequencial e são evolutivamente relacionadas, formando a super-família das PLA₂s de baixo peso molecular (Grupos I e II, *Dennis, 1994*). Esta super-família de proteínas inclui algumas das PLA₂s melhores caracterizadas do ponto de vista estrutural e de mecanismo de ação. Acredita-se que os genes ancestrais para estes grupos divergiram há mais de 200 milhões de anos (*Davidson & Dennis, 1990*).

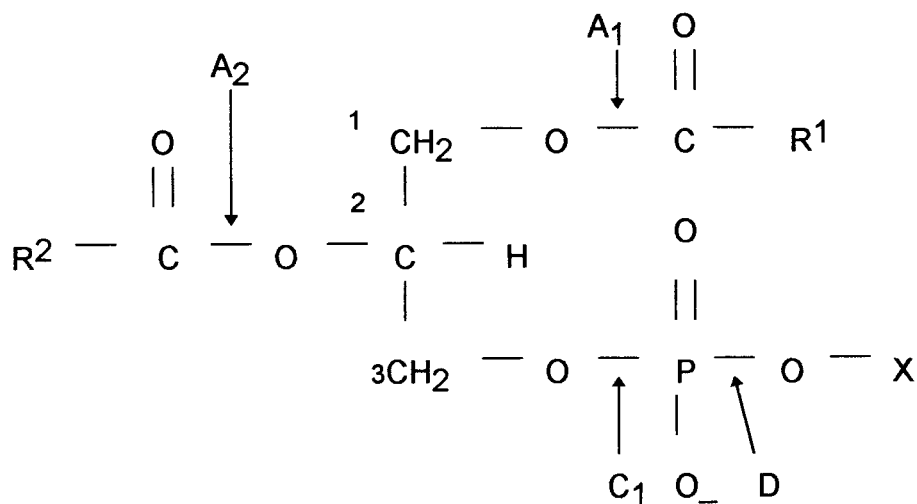


Figura 1: Local de hidrólise das diferentes fosfolipases nos fosfolipídeos.

Estudos com mais de 50 PLA₂s de diferentes famílias revelaram características em comum : baixa massa molecular (14 kDa), uma α -hélice amino terminal anfipática, uma região molecular para ligação de Ca^{++} , um sítio ativo e um grande número de pontes de dissulfeto intramoleculares (geralmente sete, mas existem variações). Estas PLA₂s são relativamente termoestáveis e requerem íons Ca^{++} para sua atividade (*Yang & cols., 1981*).

Apesar destas similaridades, há certas diferenças estruturais que permitem a classificação destas enzimas em dois diferentes grupos: Grupo I que compreende as

enzimas encontradas principalmente no pâncreas de mamíferos e nos venenos Elapídicos e Hidrofídicos, e Grupo II, onde se encontram as enzimas dos venenos Crotalídicos e Viperídicos (*Davidson & Dennis 1990*).

A diferença estrutural entre esses dois grupos consiste na presença de uma ponte de dissulfeto invariável entre os resíduos de meia cistina 11 e 77 no grupo I, e que está ausente nas PLA₂s do grupo II (*Muherjee e cols., 1994*).

FOSFOLIPASES A₂ DE VENENOS DE SERPENTES

Sabe-se desde 1902, que os venenos de serpentes possuem atividade hemolítica diretamente relacionada com os lipídeos das membranas celulares (*Kyes, 1902*). Em 1933, *King e Nolam*, demonstraram que a capacidade de degradar lipídeos de gema de ovo, era dependente de uma fração do veneno de *Bothrops atrox*, identificada posteriormente como sendo uma PLA₂ (*Chargaff & Cohen, 1939*).

Para compreender melhor a interação da enzima com a interface de lipídeos *Hughes* em 1935, introduziu o uso de filmes monomoleculares na enzimologia de lipídeos. Neste caso, mudanças no potencial de superfície foram medidos para monitorar a hidrólise da monocamada lipídica.

Posteriormente o uso inovador de fosfatidilcolinas sintéticas de cadeia curta permitiu aprimorar os ensaios enzimáticos, facilitando a identificação e caracterização das PLA₂s (*Hanaham, 1952*).

Fosfolipases A₂ de venenos de serpentes são extensivamente utilizadas como sondas enzimáticas para se estudar a função e a organização de fosfolípidos de membrana de eritrócitos. *Shukla e colaboradores (1982)*, determinaram diferentes domínios de fosfatidilcolina nas membranas de eritrócitos humanos através do uso de PLA₂s ácidas e básicas de *Agkistrodon halys blomhoffi*. Posteriormente, *Gascard e colaboradores (1993)*, utilizando PLA₂s de venenos de abelhas, verificaram a existência de 2 domínios de fosfatidilinositol 4-fosfato em eritrócitos humanos, os quais respondem diferentemente à ação destas PLA₂s.

Dennis e colaboradores (1973), utilizando PLA₂ de *Crotalus durissus terrificus*, determinaram que o pH ótimo para a hidrólise era por volta de 8.0 e que íons Ca⁺⁺ eram requeridos para a atividade enzimática

As similaridades de estrutura e atividade biológica entre as PLA₂s pancreáticas e as de veneno podem ser explicadas tanto do ponto de vista embriológico como evolutivo. De acordo com *Heinrikson e colaboradores (1977)*, tanto as glândulas salivares quanto as pancreáticas e as de veneno possuem células acinares, as quais são provenientes de uma mesma derivação embriológica.

MIOTOXINAS COM ESTRUTURA DE FOSFOLIPASE A₂

As miotoxinas estão presentes em uma série de venenos de serpentes e são toxinas capazes de provocar dano aos músculos, efeito conhecido como miotoxicidade. Muitas delas são PLA₂s básicas, que além da miotoxicidade apresentam outras

atividades biológicas como neurotoxicidade, cardiotoxicidade e atividade inflamatória (Rosenberg, 1990). Várias PLA₂s miotóxicas foram isoladas de venenos de diferentes espécies de *Bothrops*. Muitas delas são PLA₂s enzimaticamente ativas, (PLA₂s Asp-49) como a miotoxina de *B. atrox*, a SIII - SpVI de *Bothrops insularis* e a miotoxina de *Bothrops godmani* (Gutiérrez e cols., 1984; Lomonte e cols., 1990; Gutiérrez e cols., 1991; Diaz e cols., 1992). Além disso, há um grupo de miotoxinas com deficiência ou atividade de PLA₂ muito baixa, embora dados bioquímicos e imunológicos indiquem que são PLA₂s análogas (PLA₂s Lys-49) (Maraganore, 1984). A miotoxina II de *B. asper*, as miotoxinas I e II de *Bothrops moojeni*, a miotoxina de *Bothrops nummifer*, a bothropstoxina- I de *Bothrops jararacussu*, a miotoxina I de *Bothrops pradoi* e a miotoxina II de *Bothrops godmani* pertencem a este grupo. Após injeção intramuscular em ratos, todas essas toxinas induzem mionecrose por afetar primeiramente a integridade da membrana plasmática das fibras musculares (Lomonte e cols., 1994)

Com base em suas propriedades farmacológicas e bioquímicas, essas miotoxinas podem ser sub-divididas em 3 grupos:

a: toxinas básicas de baixo peso molecular, presentes no veneno de cascavéis.

b: PLA₂s neurotóxicas e miotóxicas.

c: miotoxinas não neurotóxicas com estrutura de PLA₂.

Nosso interesse em particular se atém ao item C.

As miotoxinas com estrutura de PLA₂ são proteínas básicas isoladas dos venenos dos gêneros *Bothrops*, *Agkistrodon* e *Trimeresurus*. (Mebis & Samejima, 1986; Gutiérrez e cols., 1986; Homsí-Brandeburgo e cols., 1988; Lomonte & Gutiérrez, 1989).

Algumas PLA₂s miotóxicas apresentam atividade enzimática, outras não. Essa ausência de atividade enzimática de PLA₂ como, por exemplo, o da miotoxina II de *B. asper*, pode ser devido à troca de alguns aminoácidos, neste caso, asparagina na posição 28, leucina na posição 32 e lisina na posição 49 (Francis e cols., 1991). Nas PLA₂s que expressam atividade enzimática, estas posições são altamente conservadas e são ocupadas por tirosina, glicina e aspartato, respectivamente (van der Berg e cols., 1989). Apesar desta ausência de atividade enzimática de PLA₂, estas proteínas, apresentam semelhanças com as PLA₂s quanto as propriedades bioquímicas tais como peso molecular (PM), ponto isoelétrico (Pi) e composição em aminoácidos (Lomonte & Gutiérrez, 1989; Mebis & Samejima, 1986).

A falta de atividade enzimática de algumas destas PLA₂s miotóxicas torna-se intrigante, uma vez que elas apresentam similaridade química e imunológica com PLA₂s enzimaticamente ativas. Semelhantemente à PLA₂ pancreática, estas PLA₂s conservam os resíduos envolvidos no sítio catalítico (His-48, Asp-99 e uma molécula de água). Portanto, era de se esperar que o mecanismo catalítico proposto representasse o modo de ação de todas as espécies de PLA₂s (Maraganore & Heinrikson, 1986).

Recentemente, foram isoladas PLA₂s dos venenos de *Agkistrodon piscivorus piscivorus* e *B. atrox*, contendo um resíduo de lisina na posição 49, e foram

denominadas como PLA₂- "like" (PLA₂ Lys-49) (Maraganore e cols., 1984,1986,). Embora, Maraganore e colaboradores (1984), tenha as caracterizado como PLA₂s ativas, dados recentes demonstram que elas possuem baixa atividade enzimática, a qual poderia ser atribuída a uma contaminação com uma PLA₂ Asp-49. Fosfolipase A₂ de *Trimerurus flavoridis*, com lisina na posição 49 ao invés, de aspartato, possui somente 1.5 - 1.7% de atividade de PLA₂ (Maraganore e cols., 1986).

Pouco é conhecido com respeito aos detalhes do mecanismo de ação destas toxinas. Gutiérrez e colaboradores (1984), estudaram as alterações causadas sobre músculo esquelético pela miotoxina de *B. asper*, demonstrando que, após injeção intra-muscular em camundongos, esta toxina induzia um rápido aumento nos níveis de creatina quinase. Mostraram ainda que estas toxinas atuam afetando a integridade funcional e estrutural da membrana plasmática .

Ownby e colaboradores (1976), observaram que a miotoxina A de *Crotalus viridis viridis*, quando injetada em músculos, induzia vacuolização e progressiva destruição tecidual. Crotamina, miotoxinas I e II, e 3 outros polipeptídeos básicos de venenos de serpentes, também induziram vacuolização de células musculares.

Gutiérrez e colaboradores (1989), sugeriram que as miotoxinas se ligam e penetram na bicamada de lipídeos por meio de interações hidrofóbicas que induzem uma desorganização de membrana. Harris, já em 1984, reportou que essa desorganização da membrana pode ocasionar um aumento inespecífico na permeabilidade para macromoléculas ou íons, resultando num influxo de Ca⁺⁺, que pode ativar ou estimular a contração de miofilamentos, envenenar as mitocôndrias por sobrecarga de Ca⁺⁺, podendo causar autólise das fibras musculares por ativação de PLA₂s endógenas e de proteases dependentes de Ca⁺⁺. A nível

estrutural, as primeiras alterações morfológicas observadas são a hipercontração de microfilamentos, provavelmente devido ao influxo de Ca^{++} . Um segundo estágio, que ocorre entre 3 a 6 horas após a injeção da miotoxina, é caracterizado pela presença de células com lesão delta, quando as miofibrilas são mais homogêneas e hialinas. Após 24 a 48 horas ou mais, as células do tecido muscular necrosado são invadidas por células que participam do processo inflamatório as quais removem os fragmentos celulares e inicia-se o estágio de regeneração muscular (*Harris, 1984; Lomonte e cols., 1994*).

No entanto, os eventos fisiológicos ou bioquímicos que causam vacuolização e destruição do tecido ainda não foram esclarecidos. Uma possibilidade é que a toxina atue em um fluxo de íons para produzir um desbalanço no potencial eletrolítico de membrana (*Baker e cols., 1993*). Seguindo este pensamento, existem duas propostas que suportam esta hipótese. A primeira, através de um trabalho mostrando que miotoxina A e crotamina parecem interagir com canais de sódio em sítios distintos daqueles da tetrodotoxina, veratridina ou toxina II de anêmona do mar (*Hong & Chang, 1985*). Assim, a permeabilidade para sódio aumentada resultaria em um acúmulo intracelular de íons Na^+ , sendo acompanhado de infiltração de fluidos e, provavelmente inchamento de retículo sarcoplasmático. A segunda proposta está fundamentada nos resultados de *Utaiinchareon e colaboradores (1991)*, onde é demonstrado que a miotoxina I interage com Ca^{++} -ATPase de retículo sarcoplasmático. Desta forma, o efeito da toxina no fluxo intracelular de Ca^{++} produziria inchamento e eventual lise e morte celular.

MECANISMO CATALÍTICO DE FOSFOLIPASES A₂

O mecanismo catalítico das PLA₂s de baixo peso molecular (14 kDa) já foi detalhadamente estudado. Os resíduos que participam da alça de ligação para íons Ca⁺⁺ nas PLA₂s clássicas são, Tyr-28, Gly-30, Gly-32 e Asp-49. A unidade catalítica é formada por His-48, Asp-99 e uma molécula de água. A função desta tríade catalítica acredita-se ser análoga ao das serino proteases. No entanto, o nucleófilo no caso das PLA₂s é uma molécula de água (*Fremont e cols., 1993*). A modificação química do resíduo His-48 pelo agente brometo de p-bromofenacil resulta em inativação da enzima. Os resíduos His-48, Asp-49 do sítio catalítico, e os resíduos da alça de ligação para íons Ca⁺⁺ são invariantes nas PLA₂s clássicas. Ainda mais, o par His-48: Asp-99 são considerados os “pontos-chave” destas enzimas (*Yang e cols., 1981; Dupureur e cols., 1992a e b*).

A cadeia lateral da His-48 nas PLA₂s atua como um sítio catalítico ácido - base, abstraindo um próton de uma molécula de água, originando um estado negativo transitório. A His-48 protonada é estabilizada por uma rede de pontes de hidrogênio incluindo o radical β-carboxilato do resíduo Asp-99. Este estado transitório intermediário é estabilizado pela interação com o íon cálcio e pelo radical amida do resíduo Gly-30. O íon cálcio é também coordenado em um complexo com o fosfato do substrato fosfolipídico e com o radical β-carboxilato do resíduo Asp-49. O estado transitório origina produtos como o radical imidazol do resíduo His-48 que doa um próton para o sn-2 oxigênio éster, levando a formação de um lisofosfolípido e um ácido graxo (*Fremont e cols., 1993*).

Um mecanismo diferente foi sugerido para as PLA₂s Lys-49 ("PLA₂s-like") de venenos de serpentes, nas quais a formação do complexo catalítico envolve a adição de íons Ca⁺⁺ de uma forma diferente das PLA₂s Asp-49, conferindo às PLA₂s Lys-49 baixa atividade enzimática (*Maraganore e cols., 1984; Lombardo & Dennis, 1985; Arni & Ward, 1995*).

O mecanismo catalítico de outras PLA₂s de alto peso molecular (intracelulares) ainda não foi totalmente elucidado, mas ao que se sabe, parece diferir das enzimas de baixo peso molecular (*Bell & Biltonen, 1992*).

ATIVACÃO DE FOSFOLIPASES A₂

Algumas PLA₂s de baixo peso molecular (enzimas pancreáticas) são monoméricas em solução, enquanto outras formam dímeros (PLA₂ de *Crotalus atrox*). Outras PLA₂s dimerizam somente quando se encontram em altas concentrações (PLA₂ de *Naja naja*) (*Griffin & Aird, 1990*). Formas triméricas e formas contendo subunidades chaperônicas foram descritas em venenos. No entanto, estas formas triméricas podem representar um estado inativo da enzima. Postula-se que este estado oligomérico não tenha participação no processo catalítico, mas possa ocorrer *in vivo* como um mecanismo para manter a proteína em uma forma inativa nas glândulas de veneno de serpentes, onde são encontradas em altas concentrações. Estas enzimas permaneceriam então num estado "dormente" até sua atividade ser requerida (*Mebis & Ownby, 1990*).

Todas as PLA₂s, sem exceção, mostram um aumento de sua atividade catalítica quando em contato com agregados fosfolipídicos. Este fenômeno é denominado reconhecimento interfacial. Embora a ativação interfacial seja comumente observada em PLA₂s monoméricas, até o momento não foi possível demonstrar este período de "latência" nas PLA₂s diméricas, como por exemplo aquela do veneno de *Crotalus atrox*. Esta enzima, ao que parece, não requer ativação como um pré-requisito para o reconhecimento do substrato (Krizaj e cols., 1991).

Muitos autores estabelecem que a ativação de PLA₂s monoméricas em solução, bem como na interface lipídica, seja devido a uma transferência de grupos acil (transferência catalizada pela própria enzima) do substrato para dois resíduos de lisina localizados na porção NH₂-terminal da enzima (Lys-7 e Lys-10) (Dennis, 1994). Entretanto, PLA₂ de pâncreas de suínos são monoaciladas na posição 56 (Lys-56), ou seja, essa acilação pode ocorrer de uma forma aleatória nas diferentes posições dos resíduos de lisina na estrutura primária da proteína, mas, sempre promovendo a formação de um dímero cataliticamente mais eficiente. Estes autores postulam ainda que, a ativação e o reconhecimento interfaciais sejam devidos à acilação e dimerização respectivamente, e ainda mais, estes dois fenômenos estão intrinsecamente relacionados, mas somente no caso das PLA₂s monoméricas (Fremont e cols., 1993).

FUNÇÃO DE FOSFOLIPASES A₂

Em relação à função, as PLA₂s podem ser classificadas em regulatórias e digestivas. As PLA₂s regulatórias são principalmente as enzimas associadas com a cascata do ácido araquidônico, que fornece substrato(s) para o metabolismo de moléculas bioativas, potentes mediadores do processo de inflamação. As enzimas pertencentes a este grupo estão relacionadas com muitas doenças inflamatórias como artrite reumatóide, pancreatite, com a insuficiência renal aguda etc. As fosfolipases C pertencem também a este grupo, e estão relacionadas com o ciclo do fosfatidilinositol, e têm sido encontradas em vários tipos de células e tecidos. As PLA₂s responsáveis pela manutenção do grupamento acil dos fosfolipídeos de membrana durante o ciclo de deacilação-reacilação também são denominadas como PLA₂s regulatórias, bem como as que estão envolvidas no processo de estimulação da proliferação celular (Vadas, 1983; Waite, 1987; Wijkander & Sundler, 1989).

A segunda classe de PLA₂s são as digestivas, em particular as pancreáticas e as de venenos de serpentes, sendo que estas últimas podem ser denominadas como toxinas-sítio dirigidas, exercendo ações cardiotoxícas, neurotóxicas, miotóxicas e também inflamatórias (Mebs & Ownby, 1990).

De modo geral as PLA₂s estão envolvidas em vários eventos celulares e teciduais, sendo que a correlação entre atividade de PLA₂ e suas diferentes funções fisiológicas tem sido o maior desafio para os bioquímicos que estudam este intrigante grupo de enzimas (van der Berg, 1989; Mukherjee e cols., 1994).

RELAÇÃO ESTRUTURA - FUNÇÃO DE FOSFOLIPASES A₂

Apesar da alta homologia em relação à estrutura primária, secundária e terciária das PLA₂s de venenos com as PLA₂s não tóxicas de pâncreas de mamíferos, estas enzimas são capazes de produzir diferentes efeitos farmacológicos (*van den Berg, 1989*).

A relação estrutura-função de PLA₂s ainda não está totalmente clara. Sistemas de modificação química e caracterização destas enzimas sugerem a presença de sítios separados, embora justapostos, para a expressão das atividades enzimática de PLA₂ e farmacológicas deste grupo de proteínas (*Rosenberg e cols., 1989*).

Vários ensaios técnicos têm sido utilizados para a identificação de sítios farmacológicos específicos como os neurotóxicos, miotóxicos e os anticoagulantes. Desde que *Volwerk e colaboradores (1974)*, demonstraram que PLA₂ de pâncreas de suíno podia ter sua atividade catalítica totalmente inativada por alquilação do resíduo His-48 com brometo de *p*-bromofenacil, este procedimento tem sido largamente utilizado para a compreensão do mecanismo tóxico e enzimático destas proteínas (*Takasaki e cols., 1990*). Estudos posteriores de metilação de His-48 mostraram uma sensível diminuição da atividade enzimática e do potencial letal de PLA₂ de *Naja nigicollis* e de *Naja naja atra* (*Babu & Gowda, 1991*).

Estudos de modificação química demonstraram que é possível dissociar atividade enzimática das propriedades farmacológicas (*Verheij e cols., 1980*). Alguns trabalhos revelam que a porção NH₂-terminal das PLA₂s é importante para a

bifuncionalidade destas moléculas (*Chu e colaboradores, 1993*). A remoção do octapeptídeo NH₂-terminal da miotoxina II de *B. asper* reduziu significativamente o efeito de desorganização de membrana, bem como a atividade miotóxica desta proteína (*Diaz e colaboradores, 1994*). Muitas PLA₂s de venenos de serpentes têm sido tratadas com brometo de cianogênio a fim de clivar a região NH₂-terminal, já que o resíduo Met-8 é altamente conservado em muitas destas enzimas (*Chwetzoff e cols., 1989 ; Chu e cols., 1993*). No caso de nigexina (PLA₂ de *Naja nigricollis*), a remoção desta região levou a uma eliminação de seus efeitos citotóxicos (*Diaz e cols., 1994*).

Outros resíduos de aminoácidos de interesse biológico têm sido modificados quimicamente nas PLA₂s a fim de se estudar o comportamento catalítico e tóxico destas proteínas, como por exemplo, a modificação de resíduos de lisina. A modificação destes resíduos diminuiu sensivelmente a atividade citotóxica de várias PLA₂s (*Chwetzoff, 1990*).

Sulfonilação de Tyr-68 demonstrou uma acentuada dissociação de efeitos enzimáticos e efeitos biológicos de PLA₂s como: ação hemolítica, atividade anticoagulante, atividade cardiotoxica (*Babu & Gowda, 1991*).

Sendo assim, a sequência de aminoácidos das PLA₂s é fundamental na determinação dos elementos estruturais e para a expressão das propriedades biológicas destas moléculas. O mecanismo de indução de efeitos farmacológicos reflete os domínios estruturais desta família de proteínas (*Yang & Lee, 1986; Yang, 1994*).

O objetivo deste trabalho foi a determinação da estrutura primária da BthTX-II (uma miotoxina fosfolipásica A₂ do veneno de *Bothrops jararacussu*), bem como a avaliação de sua atividade inflamatória em edema de pata de rato.

MATERIAIS E MÉTODOS

Materiais e Métodos

A PLA₂ de *Bothrops jararacussu* (BthTX-II) utilizada neste projeto, foi gentilmente cedida pelo Prof. Dr. José Roberto Giglio, Depto de Bioquímica, FMUSP - Ribeirão Preto, e foi purificada de acordo com o método descrito por *Homsí-Brandeburgo e colaboradores, (1988.)*

ELETROFORESE EM GEL POLIACRILAMIDA

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

As placas de poliacrilamida foram feitas de modo descontínuo, apresentando gel de concentração a 5% e o gel de corrida a 15%. As placas foram preparadas utilizando-se uma solução de acrilamida estoque (Bio Rad Labs. Richmond, Cal.) a 30% e outra de 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 frasco ambar. O gel de concentração a 5% foi preparado utilizando-se tampão Tris-HCl (0,125 M, pH 6,8), e o gel de corrida foi feito utilizando-se o tampão Tris-HCl (0.3 M, pH 8.8). Ambos os géis com 0.1% (p/v) de SDS foram polimerizados com 0.1% (v/v) de N-N-N'-N'-tetrametiletenodiamina (TEMED) e

0,01% de persulfato de amônio. A eletroforese foi realizada em um sistema duplo de placas “SE 250 might small II da Hoefer”.

As amostras foram padronizadas para conterem de 5 a 50 µg de proteínas. As amostras foram dissolvidas no tampão da amostra (tampão Tris-HCl 0,08M, pH 6,8; 2% SDS; 10% de glicerol e 0,1% de azul de bromo fenol). As amostras foram reduzidas com Ditioneitol (DTT), cuja concentração final foi de 0,1M. Foram utilizados marcadores Pharmacia (Electrophoresis Calibration Kit LMW). A eletroforese foi realizada em tampão de corrida Tris-HCl (0,025 M); Glicina (0,192 M) com SDS a 0.1% (pH 8,3) a 100 V/constantes.

O gel foi retirado do sistema de placas e corado com solução de azul de coomassie a 0,1% em ácido acético, metanol e água na proporção de (1:4:5) (v/v) durante 3 horas, e em seguida foi descorado em solução de ácido acético, metanol e água na proporção de: (1:4:5) (v/v).

ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA EM CONDIÇÕES NÃO DISSOCIANTES

O método utilizado foi essencialmente aquele descrito por *Reisfeld e colaboradores*, (1962).

Preparação do Gel

O gel de concentração contendo 3%, e o gel de corrida, contendo 10% de acrilamida, foram preparados a partir de uma solução estoque 0,4 M de acrilamida e 4 mM de bis acrilamida, dissolvidos em água deionizada. Essas soluções foram filtradas em filtro Whatmann nº1 e mantidas a 4°C em frasco escuro. O gel de concentração foi preparado com tampão ácido acético-KOH (pH 6,8); o gel de corrida foi preparado com tampão ácido acético-KOH (pH 4,3). Em cada gel foram acrescentados 200 µl de N,N,N',N'-tetrametilenediamina (TEMED). Ao gel de concentração foram acrescentados 200 µl de uma solução estoque de Riboflavina 0,4%, e no gel de corrida 400 µl de uma solução de persulfato de amônio a 10%. Foram utilizadas duas placas de vidro (16 cm x 14,5 cm) e espessadores de 2 mm de espessura. O gel de corrida foi colocado primeiro até uma altura de 10 cm. Após sua polimerização, foi acrescentado o gel de concentração (3%) e colocado o pente.

Preparação da Amostra

A amostra (10 µl de uma solução de aproximadamente 1 mg/ml) foi dissolvida em 10 µl de uma solução de sacarose 50% (m/v). A eletroforese foi realizada em tampão ácido acético-β-Alanina (pH 4,5) a 200 V (20 mA) por 2 horas.

Após a corrida, o gel foi retirado, imerso em água e em seguida, corado por 1 hora com uma solução de azul brilhante de coomassie G-250 a 0,2% (p/v) em metanol : água (1:1) (v/v). O gel foi descorado em ácido acético a 7% (v/v)

ANÁLISE EM AMINOÁCIDOS

O sistema utilizado foi o do analisador Pico-Tag da Waters, onde a identificação dos aminoácidos das proteínas ou peptídeos foi feita através da cromatografia em HPLC do derivado feniltiocarbamil (PTC) do aminoácido, proveniente da derivatização com fenilisotiocianato dos aminoácidos, obtidos através de hidrólise ácida. Esta forma de cromóforo pode ser detectada a nível de 1 picomol.

Preparação da Amostra

Quantidades entre 0,5 - 10 µg de proteína ou peptídeo, dissolvidos em água e acetonitrilo (1:1) (v/v) foram transferidas para pequenos tubos de reação com volume máximo de 20 µl, o qual foi transferido para o frasco de reação, que possui tampa especial, para a conexão com o sistema de vácuo e atmosfera de nitrogênio.

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 fenol (1 mg/ml), para evitar a formação de clorotirosina. Em seguida foi feito vácuo próximo a 1-2 Torr até início do borbulhamento do HCl. O vácuo foi fechado e deixou-se entrar nitrogênio (SS - Ultra puro) durante 5 segundos. Estas etapas foram repetidas por três vezes sendo por último feito vácuo até 1 Torr. O frasco foi fechado e removido para o forno de hidrólise a 105°C por 24 horas. Após este período, os tubos de reação foram colocados a vácuo até 65 miliTorr, para a secagem das amostras hidrolisadas.

Derivatização

As amostras hidrolisadas foram lavadas com 20 μ l de uma solução de metanol: água: trietilamina (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 preparada com metanol: trietilamina: água: fenilisotiocianato na relação 7: 1: 1: 1 (v/v), foi adicionada (20 μ l) a cada tubo de reação, e estes deixados a temperatura ambiente por um período de 30 minutos. Após a derivatização as amostras foram secas a vácuo até a leitura de 50 miliTorr, para a remoção de todo o PITC. Cada amostra foi dissolvida em 50 μ l de uma solução 0,4 mM de 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/ μ 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 foi feita em relação a uma corrida padrão de PTC aminoácidos .

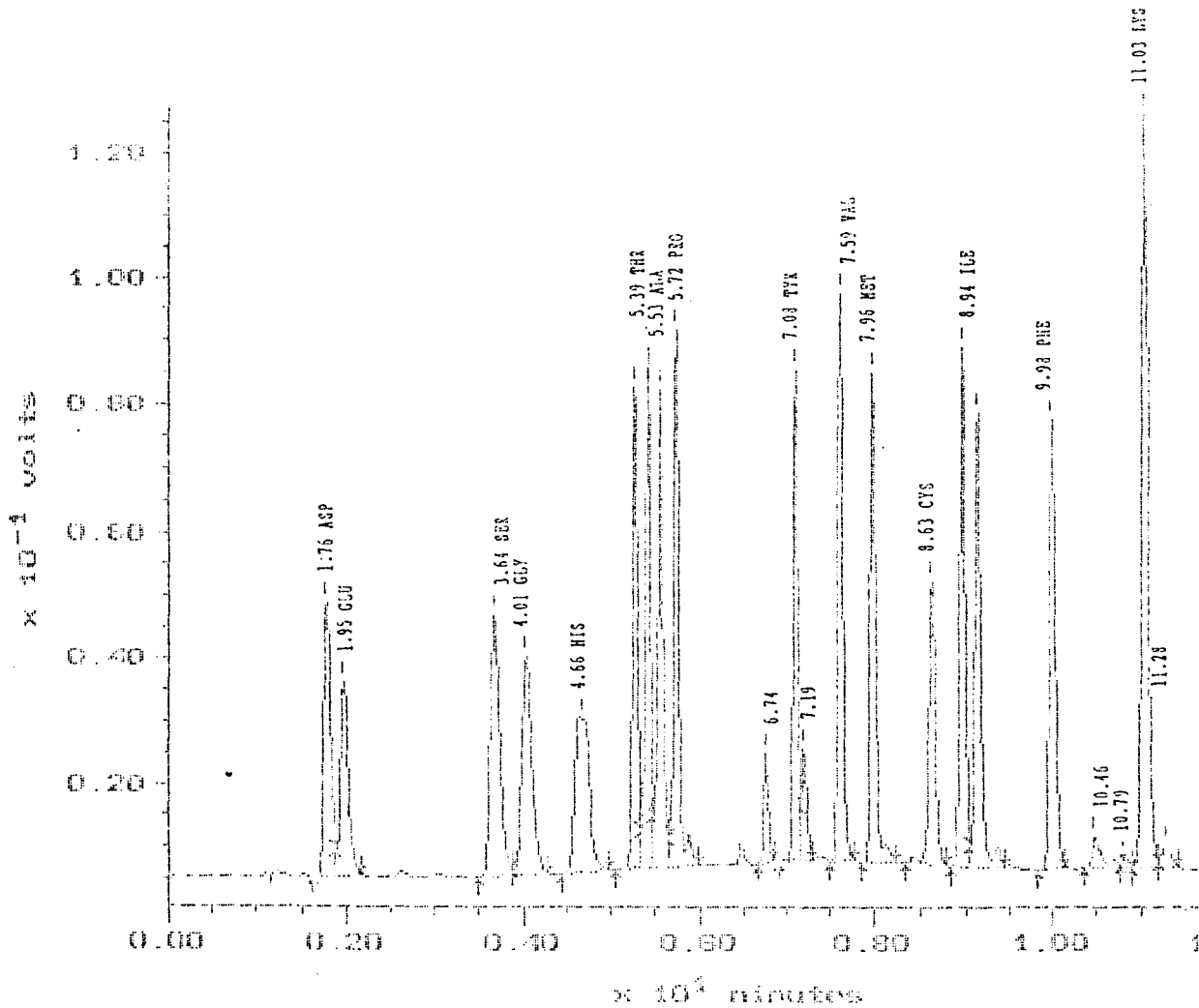


Figura 2: Perfil cromatográfico da análise automática de aminoácidos no sistema PICO-TAG da Waters. Foram aplicados 250 pmoles de uma solução padrão de aminoácidos, derivatizados para a forma feniltiocarbamil de cada aminoácido (PTC - aminoácido). O tempo de corrida foi de 12 minutos a um fluxo de 1 ml/min, sendo cada pico detectado a 254 nm e identificado pelo tempo de retenção em relação ao padrão de PTC -aminoácidos.

REDUÇÃO E ALQUILAÇÃO

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

DESSALIFICAÇÃO EM SEPHADEX G-25

A solução de BthTX-II previamente reduzida e carboximetilada foi eluída em uma coluna (0,5 x 30 cm) de Sephadex G-25, equilibrada com ácido acético 1 M, com fluxo de 1 ml/minuto. As frações foram coletadas e suas absorbâncias monitoradas a 280 nm em um espectrofotômetro da Incibrás modelo UV 1201.

CLIVAGEM ENZIMÁTICA

DIGESTÃO COM PROTEASE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* LINHAGEM V₈

A amostra completamente reduzida e carboximetilada foi digerida com *S.aureus* V₈, relação enzima substrato, (1:30) (p/p) em tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 7,8 por 16 horas a 37 °C.

A digestão foi interrompida, adicionando-se 1 ml de água deionizada e liofilização do digesto (*Houmard & Drapeau, 1972*). Nessas condições experimentais a enzima hidrolisa nos resíduos de ácido aspártico e glutâmico, presentes na cadeia polipeptídica da proteína.

DIGESTÃO COM CLOSTRIPAÍNA (*CLOSTRIDIUM HISTOLYTICUM*)

Ativação da Enzima: 200 µg de clostripaína (E.C 3.4.22.8; SIGMA) foram dissolvidos em 200 µl de tampão fosfato 50 mM, pH 7,6, contendo 20 µl de CaCl₂ 50 mM e 2,5 µl de DTT 1 M. A ativação foi feita durante 3 horas a temperatura ambiente.

Um mg da BthTX-II previamente reduzido e carboximetilado foi dissolvido em 1 ml de tampão fosfato 50 mM pH 7,6. A esta solução adicionaram-se 20 µl da enzima ativada, relação enzima:substrato (1:100) (p/p). A digestão foi feita durante 24 horas a temperatura ambiente. A reação foi paralizada por liofilização do digesto.

CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA PERFORMANCE

Utilizamos para a purificação dos peptídeos provenientes da clivagem enzimática com clostripaina e protease V₈ equipamento Waters HPLC modelo PDA - 991, equipado com duas bombas Waters mod. 510, injetor automático de amostra Waters mod. U6K e coluna C₁₈ /µBondapack (0,39 x 30 cm). A cromatografia reversa usa um gradiente linear de 0 a 100% de uma solução de acetonitrila a 66% em 0.1% de ácido trifluoroacético pH 2,5. A amostra aplicada foi monitorada a 220 nm. Quando necessário, os peptídeos foram repurificados na mesma coluna com um gradiente descontínuo no intervalo de gradiente da primeira purificação.

DEGRADAÇÃO AUTOMÁTICA DE EDMAN

O sequenciador automático de proteínas e peptídeos usa a técnica de degradação de *Edman & Begg (1967)*, 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, a proteína é covalentemente unida a este suporte e, em seguida colocado na câmara de reação. Depois de cada ciclo degradativo, o aminoácido N-terminal é removido da cadeia polipeptídica na forma derivada de anilino-tiazolinona (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 sequenciador utilizado foi o modelo 477A, que utiliza, para a identificação dos PTH-aminoácidos, um sistema de HPLC modelo 120A, ambos da Applied Biosystem.

Reagentes e solventes são transferidos para a câmara de reação e conversão por controle automático através de um micro processador, permitindo sequências 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 ditioneitol (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.

ATIVACÃO DO FILTRO

Um filtro de fibra de vidro é tratado com BioBrene. Esta ativação é realizada na câmara de reação do sequenciador, onde está programado a realizar dois ciclos de reação, para a completa ativação e eliminar o excesso de reagentes, que poderiam interferir durante as etapas da degradação de Edman. A amostra, quando adicionada ao filtro, ficará imobilizada e pronta, para iniciar o sequenciamento. A capacidade máxima é cerca de 30 μl ; mas quando necessário, aplica-se maior volume e seca-se o filtro com nitrogênio após cada aplicação.

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. Todas as etapas de reação ocorrem no ciclo chamado Normal-1, que tem um período de duração de 43 minutos e 32 segundos . O reagente R2 (TMA) proporciona o pH básico (9,0 - 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 anilintiazolinona (ATZ) do aminoácido. Após a etapa de clivagem a proteína é deixada com um novo amino terminal, pronto para o próximo ciclo de degradação.

CICLO DE CONVERSÃO

Nessa etapa da degradação de Edman, o ATZ aminoácido é transferido da câmara de reação pelo solvente 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 1 ml, para onde são enviados os reagentes químicos necessários para o ciclo de conversão, sendo

mantida a temperatura constante de 62°C e possui um período de duração de 44 minutos e 1 segundo.

IDENTIFICAÇÃO DOS PTH AMINOÁCIDOS

Após ter completado um ciclo de conversão, uma alíquota do PTH aminoácidos é transferida para o coletor de frações e pode ser monitorada para confirmar a presença de PTH-S-CMCYS (feniltiohidantoína-S-carboximetil cisteína). O restante da amostra é injetado imediatamente no HPLC, para identificação e quantificação dos aminoácidos, que é feita em comparação com uma análise padrão de PTH aminoácidos.

AVALIAÇÃO DA ESTRUTURA SECUNDÁRIA

A estrutura secundária da toxina BthTX-II foi avaliada utilizando-se o método de *Chou & Fasman, (1978)*. O perfil de hidrofobicidade foi calculado de acordo com o método de *Hoop & Woods, (1983)*. Ambos foram desenvolvidos pelo sistema PROSIS (PHARMACIA) para análise de proteínas.

EDEMA DE PATA

Foram utilizados ratos machos Wistar pesando entre 130 e 200 g, mantidos com água e ração *ad libitum*. Os ratos foram levemente anestesiados com éter e submetidos a uma injeção sub-plantar de 0,1 ml do agente edematogênico (BthTX-II), em doses variáveis (3,0 a 100 µg/pata), dissolvidos em solução fisiológica, injetados na pata traseira esquerda do animal. O volume da pata do rato foi medido imediatamente antes e após a injeção do agente edematogênico em intervalos de tempo pré-estabelecidos. O edema de pata foi medido utilizando-se um hidropletismômetro (Modelo 7150, Ugo Basile, Itália), e os resultados foram expressos como o aumento do volume da pata (ml), calculado por subtração do volume basal. Os resultados foram analisados estatisticamente através das médias e erro padrão das médias pelo teste t-Student.

LIBERAÇÃO DE SEROTONINA (5-HT) DE MASTÓCITOS PERITONIAIS DE RATOS

O método utilizado foi aquele descrito por *McCarron e colaboradores (1984)*. Foram utilizados ratos machos Wistar adultos, pesando entre 130 e 200 g, mantidos com água e ração *ad libitum*. Os ratos foram anestesiados superficialmente com éter e exsanguinados através de secção dos vasos cervicais.

Obtenção de Mastócitos

Os mastócitos foram obtidos através da injeção de 10 ml da solução Krebs-Ringer fosfatada (KRP; pH 7,3) na cavidade intraperitoneal de 4 - 6 ratos . O abdome foi ligeiramente massageado e o fluido peritoneal coletado em tubos de polipropileno.

O fluido foi centrifugado a 300 xg durante 5 minutos à temperatura ambiente. A suspensão celular obtida foi lavada e ressuspensa com KRP (6,5 ml) e incubada com 40 nCi/ml de [¹⁴ C] 5-HT a 37°C durante 60 minutos.

As células foram então lavadas três vezes e ressuspensas em KRP (6,5 ml). Os estímulos (agentes testados) foram adicionados à suspensão celular e esta foi incubada durante 30 minutos a 37°C .

Incubação de Mastócitos

Alíquotas da suspensão de mastócitos (0,5 ml) foram incubadas à 37°C durante 20 minutos.

As células foram então centrifugadas (300 xg, 10 minutos) e o sobrenadante removido para a determinação de [¹⁴C]5-HT. A solução de KRP (1,0 ml) foi adicionada ao resíduo (precipitado) para a determinação da [¹⁴C]5-HT residual.

As concentrações de [¹⁴C]5-HT foram determinadas quantificando-se a radioatividade liberada expressa como % do conteúdo de aminas celulares.

Todos os valores obtidos foram corrigidos subtraindo-se o valor de liberação espontânea em ausência de estímulos.

Análise Estatística

Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão das médias para n experimentos. Em alguns experimentos de edema de pata foi determinada a área sobre a curva (AUC). A comparação estatística foi feita através da média utilizando-se o teste de Student's não pareado. Valores de $p < 0,05$ foram considerados como significativos.

RESULTADOS

Resultados

A fração BthTX-II, proveniente do veneno de *B. jararacussu*, obtida através de cromatografia de exclusão molecular e de troca iônica, como descrito por *Homs-Brandeburgo e colaboradores, (1988)* foi gentilmente cedida pelo Prof. Dr. José Roberto Gíglío do Depto. Bioquímica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP. Esta fração foi recromatografada em fase reversa em uma coluna C18/ μ Bondapak, (0,39 x 30 cm), previamente equilibrada com ácido trifluoracético 0,05% (v/v), pH 2,5. A eluição foi iniciada com solvente A, seguida por um gradiente de concentração linear de 0-100% de solvente B com a duração de 60 minutos.

O perfil cromatográfico da BthTX-II em HPLC é mostrado na figura 3, onde notamos a presença de um único pico de eluição simétrico, eluído no tempo de retenção de 35 minutos e na concentração de 48% de solvente B. A cromatografia em fase reversa-HPLC permitiu obter e comprovar o grau de pureza da fração BthTX-II, obtida do veneno total de *B. jararacussu* em cromatografia de exclusão molecular e de troca iônica.

ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA

A fração BthTX-II, processada em HPLC-fase reversa submetida à análise do perfil de massa molecular em gel de poliacrilamida a 15% na presença de SDS em condições redutoras (Fig. 4), revelou a presença de uma única banda protéica.

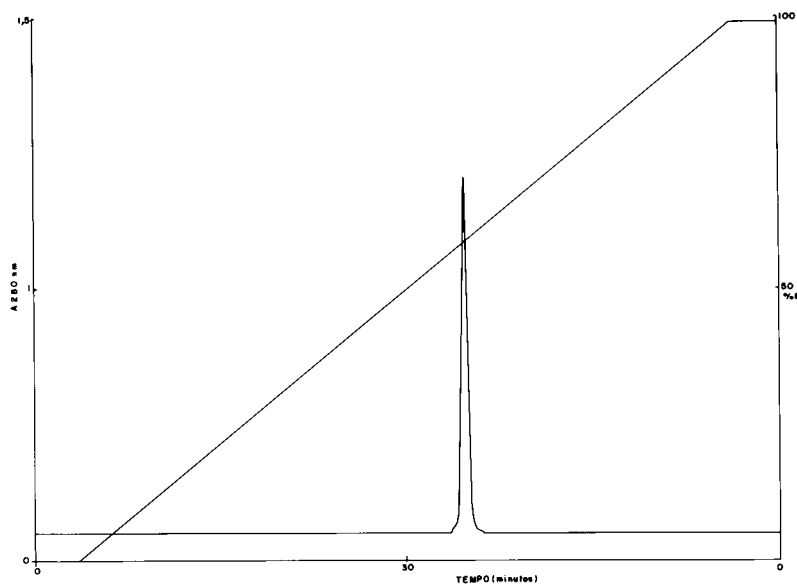


Figura3: Recromatografia da fração BthTX-II (proveniente de cromatografia de exclusão molecular e de troca iônica), em fase reversa por HPLC. A amostra (1 mg) foi fracionada em uma coluna analítica (0,39 x 30 cm) C₁₈/μ Bondapak. Para a eluição, foi utilizado um gradiente linear contínuo na concentração de 0-100% (v/v) de solvente B, fluxo de 1 ml/min. e monitoramento em 220 nm. A, absobância; T, tempo em minutos

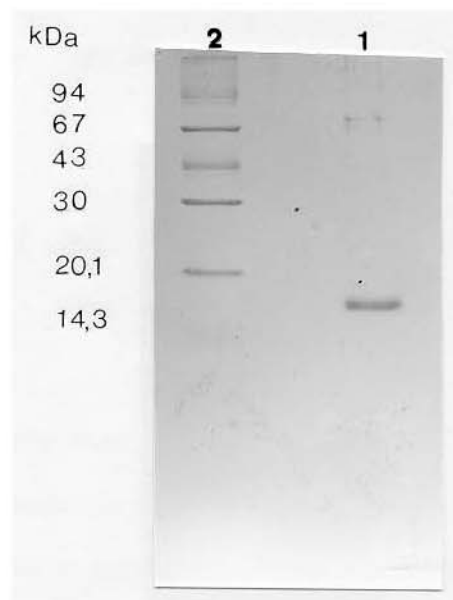


Figura.4: Eletroforese em gel de poliacrilamida 15% na presença de SDS em condições redutoras da fração BthTX-II obtida em HPLC (pista 1). Na pista 2 temos os marcadores de massa molecular correspondentes à fosforilase (94 kDa), albumina bovina (67 kDa), ovalbumina (43 kDa), anidrase carbônica (30 kDa), inibidor de tripsina (20,1 kDa) e lactoalbumina (14,3 kDa).

GEL DE POLIACRILAMIDA EM CONDIÇÕES NÃO DISSOCIANTES.

A análise do perfil eletroforético da fração BthTX-II pode ser visualizado na Figura 5. Observa-se apenas uma banda protéica, evidenciando a ausência de contaminação.

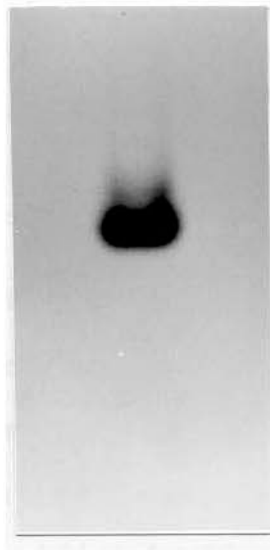


Figura 5: Eletroforese em condições não redutoras da fração BthTX-II obtida em HPLC. Condições : Gel de poliacrilamida a 10%; Tampão β -alanina/ácido acético 0,03 M, pH 4,5; corrida de 4 horas a 200 Volts e 20 mA (constantes). Corante: azul de coomassie G-250 (0,2% em água: metanol) (1:1) (v/v). Descorante: ácido acético a 7% em água.

ANÁLISE EM AMINOÁCIDOS

BthTX-II, com grau de pureza determinado em HPLC fase reversa, gel de poliacrilamida (PAGE-SDS) e gel de poliacrilamida em condições não dissociantes, quando submetida à hidrólise ácida (HCL 6N) e derivatizada, para obtenção da composição global em aminoácidos (Tabela 1), revelou um peso molecular de 13.976 próximo ao resultado determinado em gel de poliacrilamida (14 kDa)

DESSALIFICAÇÃO EM SEPHADEX G-25

A figura 6 mostra uma experiência padrão, na qual 2 mg da de BthTX-II foram completamente reduzidos e carboximetilados como descrito por *Marangoni e colaboradores (1990)*, e submetidos a dessalificação em Sephadex G-25. Esta etapa permite livrar a proteína do sal (guanidina) presente no tampão de completa redução, bem como de DTT e ácido iodoacético, ficando apta a ser submetida à metodologia em química de proteínas, para o seqüenciamento de sua cadeia polipeptídica. O fracionamento foi realizado com um fluxo de 1 ml/minuto. As frações coletadas foram monitoradas no espectrofotômetro a 280 nm. Como marcador visual, foi utilizado ϵ -DNP-Lys-HCl (Sigma).

Tabela 1 - Composição em aminoácidos de BthTX-II.

Aminoácido	resíduos /mol experimental	resíduos/mol. sequência
Asx	11	12
Glx	15	9
Ser	2	3
Gly	12	10
His	1	2
Arg	6	5
Thr	8	7
Ala	7	4
Pro	8	8
Tyr	10	13
Val	4	5
Met ^a	2	1
Cys ^a	4	14
Ile	3	3
Leu	7	6
Phe	4	4
Lys	13	11
Trp	nd ^b	3
Total	118	120
PMc	13.786	13.976

a - analisadas na forma não oxidadas

b - não determinado

PMc: peso molecular calculado

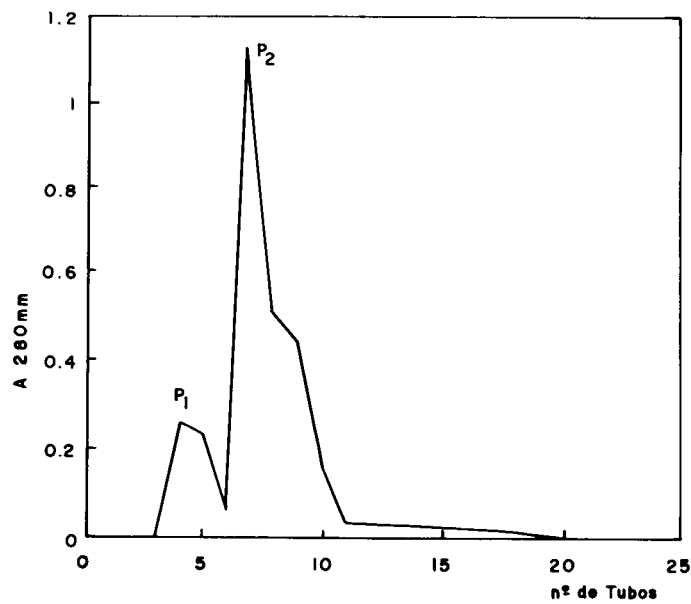


Figura 6: Filtração em Sephadex G-25 da BthTX-II reduzida e carboximetilada. 2 mg da proteína foi aplicado ao topo de uma coluna (0,5 x 30 cm) equilibrada com ácido acético 1M. Fluxo: 1 ml/minuto a temperatura ambiente; volume coletado por tubo: 1 ml e monitoradas a 280 nm. A fração P1 contém a proteína dessalficada. A fração P2 contém os reagentes, utilizados na redução e alquilação. Como marcador visual foi utilizado ϵ -DNP-Lys.

DIGESTÃO ENZIMÁTICA E PURIFICAÇÃO DOS PEPTÍDEOS

Um mg de BthTX-II previamente reduzido e carboximetilado foi submetido à clivagem enzimática com protease SV₈ de *S. aureus* em tampão fosfato de sódio para clivagem em ácido glutâmico e aspártico. O perfil cromatográfico em HPLC-fase reversa do digesto é mostrado na figura 7, onde os peptídeos foram purificados em um gradiente linear de 0-100% do solvente B, sendo monitorados a 220 nm.

Para os estudos de sobreposição, a BthTX-II, digerida enzimaticamente com clostripaína (E.C.3.4.22.8; *Clostridium histolyticum*), enzima específica para a clivagem nos resíduos de Arg-X, (dependendo do tempo de clivagem utilizado, pode-se também obter quebras em Lys-X, como foi observado para os peptídeos C11 e C14), forneceu o perfil cromatográfico em HPLC-fase reversa dos peptídeos mostrado na figura 8.

Quando necessário, os peptídeos foram repurificados através de um gradiente linear descontínuo no âmbito de separação da primeira purificação.

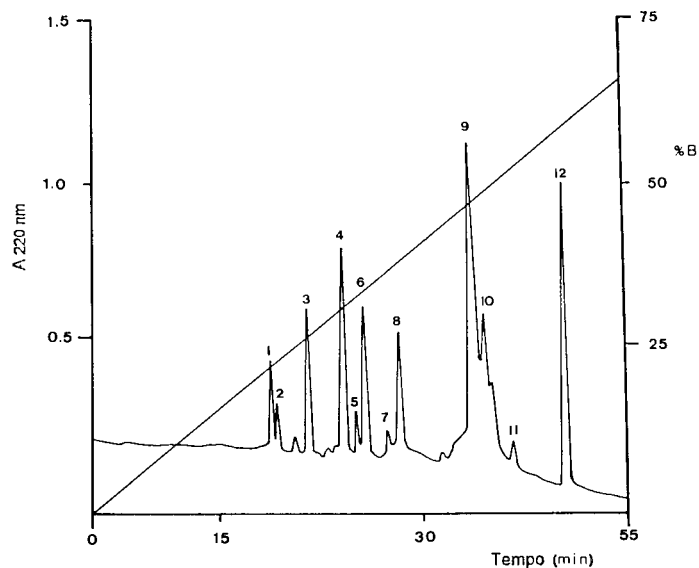


Figura 7: Purificação em HPLC-fase reversa dos peptídeos obtidos após clivagem da BthTX-II com protease *S. aureus* (SVg). A amostra de 1 mg foi fracionada em uma coluna analítica C₁₈/ μ Bondapak de 0,39 x 30cm. Para eluição, foi utilizado um gradiente linear contínuo de concentração de 0 a 100% (v/v) de solvente B, sob um fluxo de 1 ml/minuto. Os números indicam os peptídeos escolhidos para o seqüenciamento.

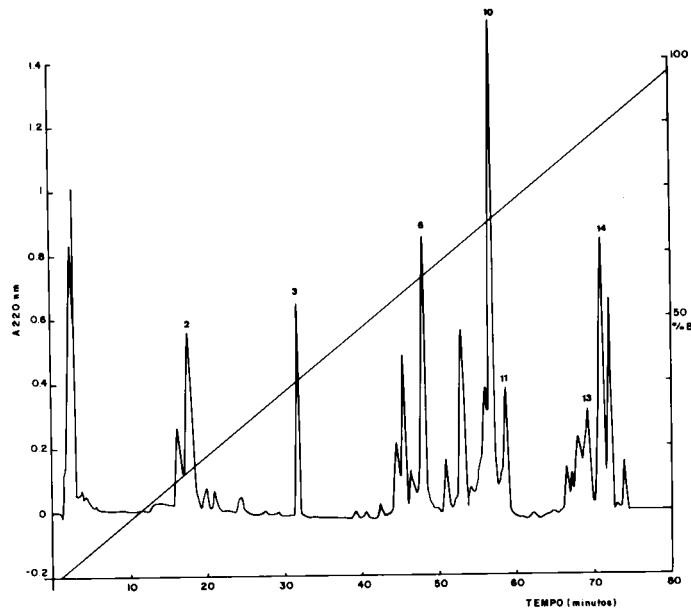


Figura 8: Purificação em HPLC-fase reversa dos peptídeos obtidos após clivagem da BthTX-II com clostripaína. O digesto correspondente a 1 mg da proteína reduzida e carboximetilada foi fracionado em uma coluna analítica C₁₈/ μ Bondapak de 0,78 x 30cm. Para eluição foi utilizado um gradiente linear de concentração de 0 a 100% (v/v) de solvente B sob um fluxo de 2ml/minuto. O perfil cromatográfico foi monitorado em 220 nm. Os números indicam os peptídeos escolhidos para o seqüenciamento

DETERMINAÇÃO DA ESTRUTURA PRIMÁRIA DA BthTX-II

250 pmoles de proteína intacta, após redução e carboximetilação, submetidos ao seqüenciamento, revelaram os primeiros 38 resíduos da região N-terminal da cadeia polipeptídica. A figura 9 mostra os peptídeos mais representativos aqueles provenientes das clivagens enzimáticas com SV₈ e clostripaína, utilizados no alinhamento da seqüência de BthTX-II; outros peptídeos também foram seqüenciados e contribuíram para a determinação da seqüência completa, não sendo representados, por apresentarem homologia seqüencial com a região N-terminal e demais peptídeos

N_DLWQWGQMILKETGKLFPFYTTYGCYCGWGG

S1 - PAE

S2 - RYSYSRVSYNYCGGPCDE

S4 - CDKAIAVCFRE

S6 - NLGTYNKKYYHLPFCKE

S12 - TGKLFPFYTTYGCYCGWGGGRGKPV

S15-1 PCDEQICECDKAIAVCFRE

C2 - GKPVDPTDR

C3 - YSYSR

C6 - CCFVHDCCYKVTNYCPKNDR

C10 - LPFYTTYGCYCGWGR

C11- PVDPTDRCCFVHDCCYK

C13 - ENLGTYNKKYYHLKPFCKEPAETC

C14 - VSYNYCGGPCDEQICECDK

Figura 9. Seqüência de aminoácidos da região N-terminal (N) e dos principais peptídeos obtidos por digestão com protease SV8 (S) e clostripáina (C), que contribuíram para determinar a estrutura primária de BthTX-II.

ESTUDO DE SOBREPOSIÇÃO

O sequenciamento da região N-terminal e dos peptídeos permitiram determinar a estrutura primária completa da BthTX-II, através da análise de sobreposição (“overlapping”). A figura 10 mostra o estudo de sobreposição destes peptídeos. A molécula da proteína BthTX-II possui 120 resíduos de aminoácidos, com um peso molecular calculado de 13.976 (Tabela 1) e a presença de 14 resíduos de meia-cistina.

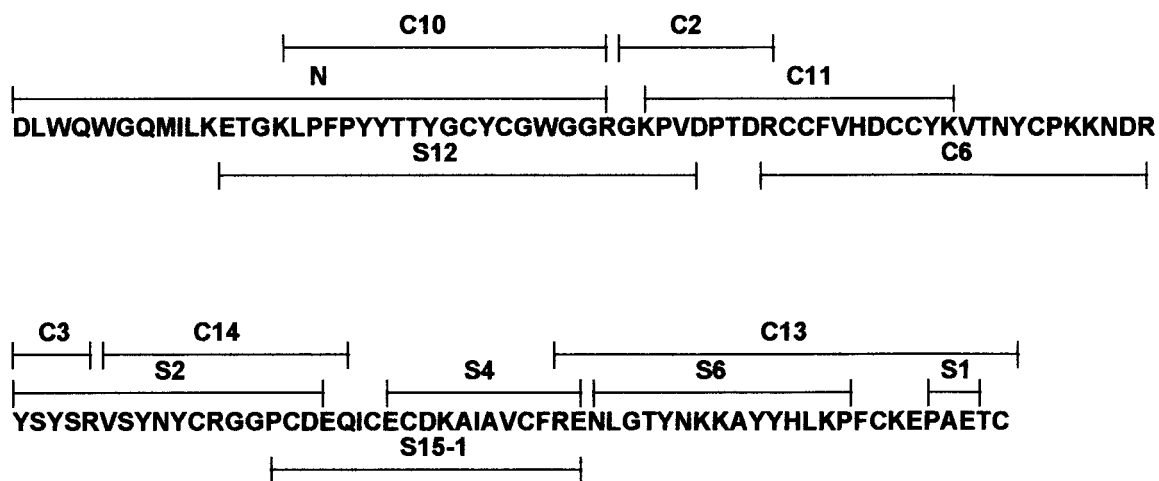


Figura 10: Sequência completa de aminoácidos da cadeia polipeptídica da BthTX-II proveniente do veneno de *Bothrops jararacussu*. (←) indica as posições determinadas pela análise de sequência. Em N é mostrada a sequência da região N-terminal; em S são indicados os peptídeos provenientes da clivagem com protease SV₈; em C são indicados os peptídeos provenientes da clivagem com clostripaina.

PREVISÃO DE ESTRUTURA SECUNDÁRIA

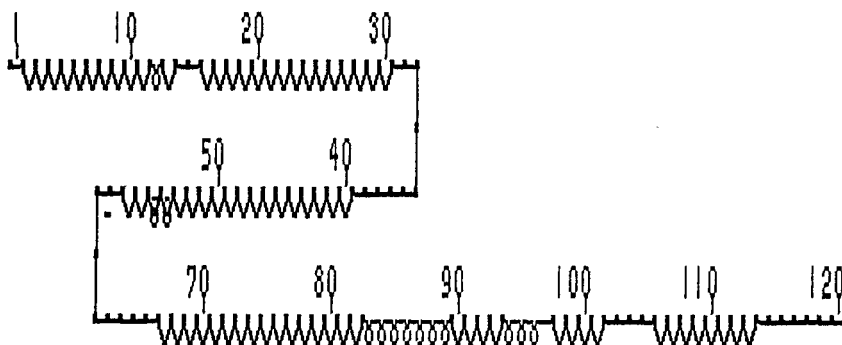


Figura 11: Previsão da Estrutura Secundária da BthTX-II, segundo Chou & Fasman, 1978. (PROSIS-PHARMACIA)

EDEMA DE PATA DE RATO INDUZIDO POR BthTX-II : CURVA DOSE-RESPOSTA.

A BthTX-II induziu a formação de um edema de pata de forma dose-dependente (figura 12). Os valores de área sobre a curva (AUC) foram de : $1,4 \pm 0,13$; $3,0 \pm 0,7$; $4,0 \pm 0,3$ e $4,2 \pm 0,3$ ml min., para as doses de 3,0; 12,5; 25; 50 e 100 g/pata, respectivamente, $n=5$). O edema foi rapidamente instalado (15 min.; $0,7 \pm 0,07$ ml) e de curta duração (120 min.; $0,3 \pm 0,04$ ml) para a dose de 50 $\mu\text{g/pata}$, conforme mostra a Figura 12.

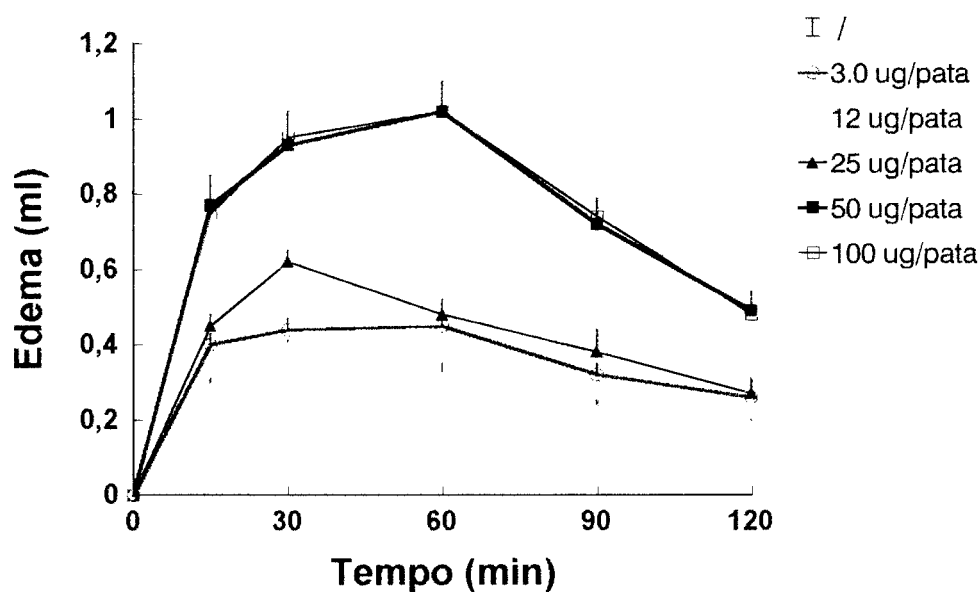


Figura 12: Curva dose-resposta do edema de pata em ratos induzido por BthTX-II. As concentrações utilizadas podem ser vistas na legenda ao lado da figura.

EDEMA DE PATA DE RATO INDUZIDO POR BthTX-I : CURVA DOSE-RESPOSTA.

A BthTX-I induziu a formação de um edema de pata de forma dose-dependente. De forma similar à BthTX-II o edema foi rapidamente instalado e de curta duração conforme pode ser visualizado na Figura 13.

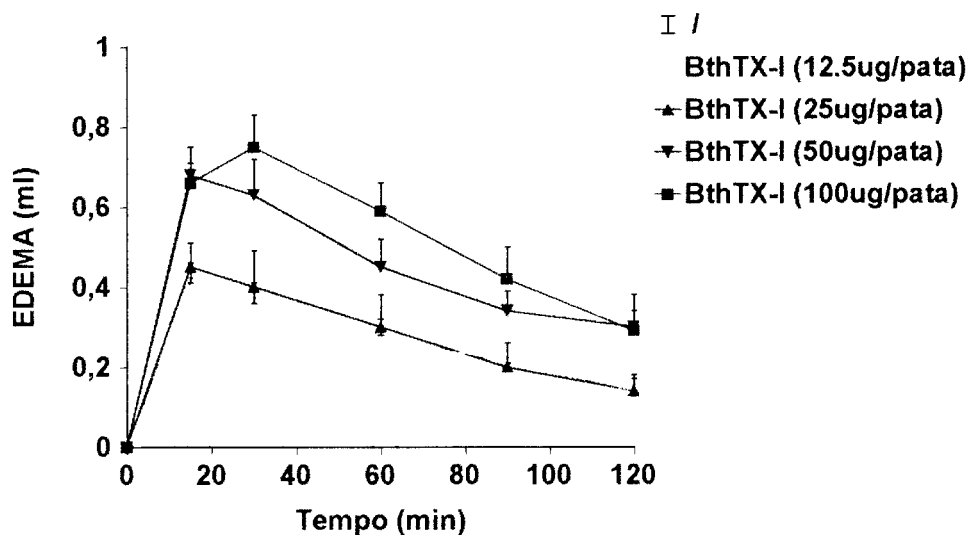


Figura 13: Curva dose-resposta do edema de pata em ratos induzido por BthTX-I. As concentrações utilizadas podem ser vistas na legenda ao lado da figura.

LIBERAÇÃO DE SEROTONINA (5-HT) DE MASTÓCITOS DE RATOS INDUZIDA POR BthTX-II E BthTX-I.

BthTX-II induziu a liberação dose-dependente de [¹⁴C]5-HT de mastócitos. As porcentagens de liberação foram: $32 \pm 6,2$; $56 \pm 4,0$; $61 \pm 3,0$ e $69 \pm 2,0\%$, nas doses de 3, 10, 30 e 100 $\mu\text{g/ml}$ respectivamente (n=5). Observou-se resposta similar para a BthTX-I: ($33,0 \pm 3,4$; $37 \pm 5,08$ e $67,0 \pm 3,8\%$, nas doses de 10, 30 e 100 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente (n= 3). A figura ilustra também que o composto 48/80, um clássico degranulador de mastócito, causou liberação dose-dependente de [¹⁴C]5-HT, validando dessa forma nossos resultados.

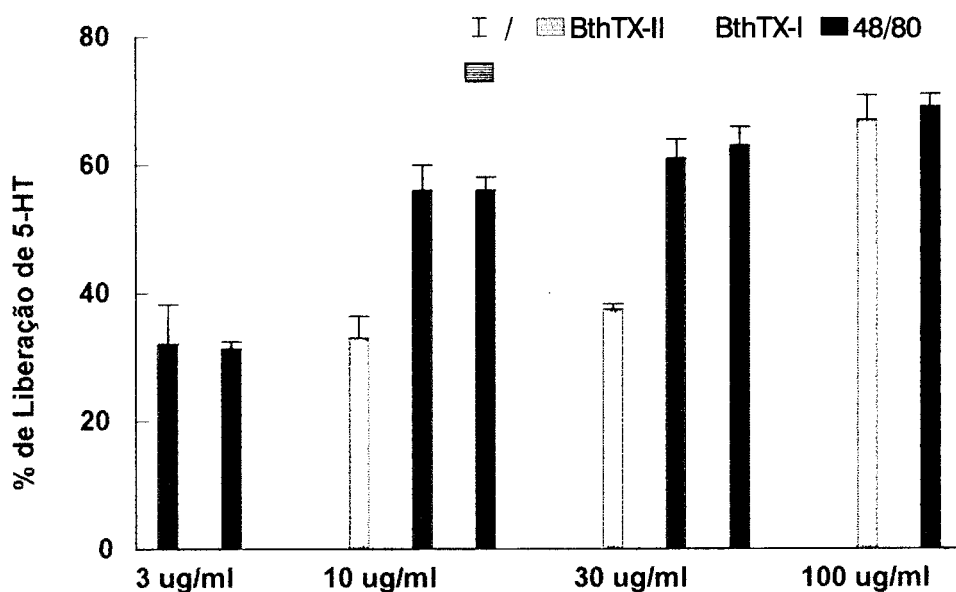


Figura 14: Liberação dose-dependente de [¹⁴C]5-HT de mastócitos induzida por BthTX-II e BthTX-I.

INIBIÇÃO DO EDEMA DE PATA INDUZIDO POR BthTX-II

O tratamento prévio dos animais com cyproheptadina (6 mg/Kg , intraperitonal, 30 minutos antes), um clássico antagonista de receptores de histamina e serotonina, praticamente aboliu a resposta edematogênica induzida pela BthTX-II (Figura 15). Esta figura mostra ainda que o pré-tratamento dos animais com indometacina (10 mg/Kg , intraperitonal, 30 minutos antes), um inibidor da ciclo-oxigenase, reduziu significativamente o edema de pata. De modo similar, a dexametasona (1 mg/Kg, subcutânea, 1 hora antes), causou também uma redução significativa do edema de pata induzido pela BthTX-II (Figura 15).

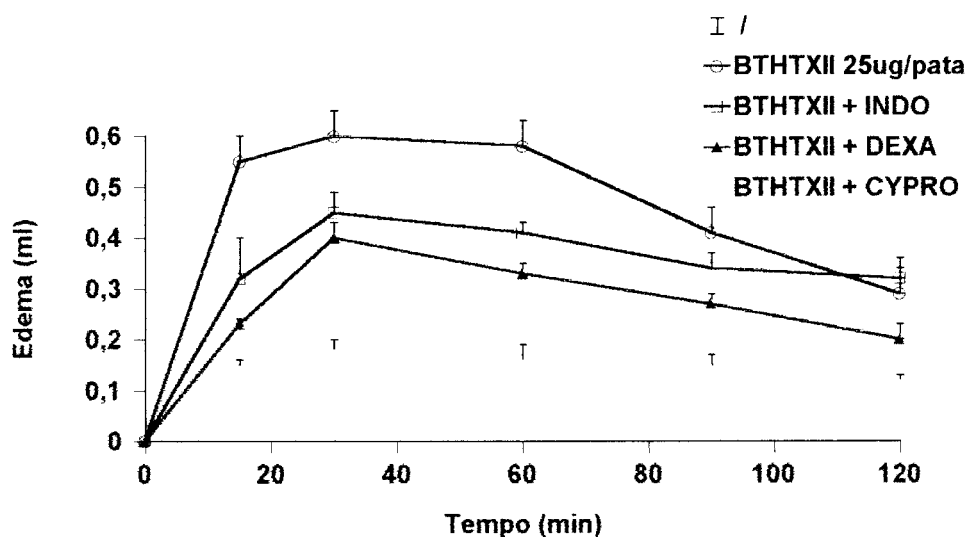


Figura 15: Efeito da Cyproheptadina, Indometacina e Dexametasona sobre o edema de pata induzido pela BthTX-II (25 µg/ pata).

DISCUSSÃO

Discussão

A cromatografia em fase reversa-HPLC (Fig.3) permitiu comprovar o grau de pureza da BthTX-II, obtida através de duas filtrações em gel de Sephadex (G-75 e G-10) e uma cromatografia de troca iônica em SP-Sephadex C-25 (Homsí-Brandeburgo e cols., 1988; Cintra e cols.,1993). O perfil cromatográfico em fase reversa mostra a presença de um único pico de eluição simétrico na concentração de 48% de solvente B.

A eletroforese SDS-PAGE (Fig.4) da BthTX-II mostra uma única banda protéica na sua forma reduzida com DTT (Ditiotreitol). Esse resultado sugere que a BthTX-II é constituída de uma única cadeia polipeptídica, sendo característica das PLA₂s. Na sua forma nativa, a toxina revelou banda única (Fig.5), comprovando o elevado grau de pureza.

Devido a pequena variabilidade de aminoácidos na estrutura primária, a composição global em aminoácidos tem sido utilizada como critério de identificação das PLA₂s purificadas de venenos de serpentes, bem como de pâncreas de mamíferos.

Sua composição global em aminoácidos evidenciou um conteúdo de Asx, Glx, Lys, His, Ser e Met compatível com aqueles encontrados para as PLA₂ (Tabela 1). As diferenças observadas entre os resultados de análise em aminoácidos e de seqüência, podem ser atribuídas a alterações químicas que ocorrem quando a proteína é submetida à hidrólise ácida, para determinação da composição em aminoácidos.

Nenhuma “ condição padrão” de hidrólise fornece resultados corretos para todos os aminoácidos (*Sittampalam e cols., 1988; Gherke e cols., 1985*). Diversos fatores são responsáveis por este comportamento. A composição em aminoácidos, a sua sequência na proteína, a estrutura tridimensional da proteína e mesmo a presença de outros componentes não protéicos (açúcares, lipídeos), bem como a contaminação por elementos traço (metais), interferem na recuperação dos aminoácidos (*Paddock e cols., 1979*)

Sarwar e colaboradores (1983), realizaram um trabalho inter e intralaboratorial distribuindo amostras de proteínas e alimentos proteicos a 7 laboratórios. As proteínas foram hidrolisadas com HCl 6N, de acordo com o procedimento de rotina de cada um dos laboratórios participantes, sendo os aminoácidos analisados por cromatografia de troca iônica, em equipamentos de diversas procedências. Os coeficientes de variação foram no máximo de 10%, para a análise interlaboratorial e de 5% para a análise intralaboratorial. Esta abordagem dá uma idéia realista da variação dos resultados.

O peso molecular calculado obtido da sequência pelo programa PROSIS (PHARMACIA) foi 13.976 e o obtido do analisador automático (PICO - TAG) foi 13.786. A diferença entre estes dois resultados foi de 1.36%.

Outro dado que veio corroborar os resultados já obtidos foi o resultado da espectrometria de massa da BthTX-II, realizada pela PERKIM-ELMER (espectrômetro de massa modelo API I LC/MS), cujo PM encontrado foi de 13.981. A diferença entre os resultados do sequenciamento e da espectrometria de massa foi de 0,036%.

Com o objetivo de obter a sequência completa da estrutura primária da BthTX-II, esta foi reduzida com DTT e os resíduos de meia-cistina foram carboximetilados com ácido iodoacético. Após redução e carboximetilação, a proteína foi dessalificada (Fig.6), ficando apta ao sequenciamento de sua cadeia polipeptídica.

Visando obter os peptídeos que nos permitissem uma sobreposição dos fragmentos e a determinação da ordem dos aminoácidos na estrutura primária, a BthTX-II foi submetida à clivagem enzimática com protease SV₈ de *Staphylococcus aureus* e com clostripaína.

Protease SV₈ é uma endopeptidase que hidrolisa a cadeia polipeptídica nas ligações de Glu nas condições de tampão bicarbonato de amônio 50 mM pH 7,8 e cliva os aminoácidos Asp e Glu em tampão fosfato de sódio 50 mM pH 7,8 (Houmard & Drapeau, 1972).

A BthTX-II foi submetida às condições de clivagem (tampão fosfato de sódio 50 mM pH 7,8) para Asp e Glu por 16 horas a 37°C, fazendo com que obtivéssemos um número maior de peptídeos do que o número teórico esperado, indicativo de clivagem específica, mas com diferentes porcentagens nos pontos da cadeia polipeptídica com Asp e Glu e que foi comprovado pela determinação da sequência de peptídeos.

Para o estudo de sobreposição, a BthTX-II foi digerida enzimaticamente com clostripaína. Segundo Mitchell & Harrington, (1968), nas condições de tampão fosfato (50 mM, pH 7,6), contendo CaCl₂ (50 mM) e DTT (1 M), esta enzima obtida do filtrado de culturas de *Clostridium histolyticum*, exerce ação proteolítica sobre os ésteres ou amida de arginina e/ou lisina. Neste caso, a proteína foi dissolvida em tampão fosfato (50 mM, pH 7,6) e então submetida às condições de

clivagem por 3 horas a temperatura ambiente. Os peptídeos originários dessas clivagens foram isolados em cromatografia de fase-reversa-HPLC (Fig.7 - SV8; Fig.8 - clostripaína) e, então sequenciados. Os peptídeos que contribuíram para os "overlappings" estão contidos na figura 9.

Os peptídeos sequenciados possibilitaram fazer o estudo de sobreposição, que contribuiu para o alinhamento dos aminoácidos na estrutura primária da BthTX-II (Fig.10). A região N-terminal da cadeia polipeptídica foi obtida pelo sequenciamento direto de 250 pmoles da BthTX-II, reduzida e carboximetilada até os 32 primeiros resíduos. O peptídeo S12 sobrepôs a região N-terminal com o peptídeo C11. O peptídeo C6 abrange a região dos resíduos 42-63. O peptídeo S2 foi sobreposto pelo S15.1. O peptídeo C13 (C-terminal) permitiu a sobreposição do peptídeo S4, que por sua vez, forneceu a sequência completa de aminoácidos da cadeia polipeptídica da BthTX-II. Outros peptídeos também foram sequenciados e contribuíram para a sequência completa, não sendo representados na Fig.9, por apresentarem homologia sequencial com a região N-terminal e demais peptídeos.

A sequência completa da BthTX-II (Fig.10) mostra a presença de 120 resíduos de aminoácidos, com um peso molecular calculado de 13.976 possuindo 14 resíduos de meia-cistina.

A estrutura primária completa permitiu a previsão do ponto isoelétrico teórico da BthTX-II (Fig.16) cujo valor calculado foi 8,03, realizado como descrito por *Skoog & Wichman, (1986)* que consideram a contribuição dos aminoácidos carregados através de seu pKa para a previsão do ponto isoelétrico.

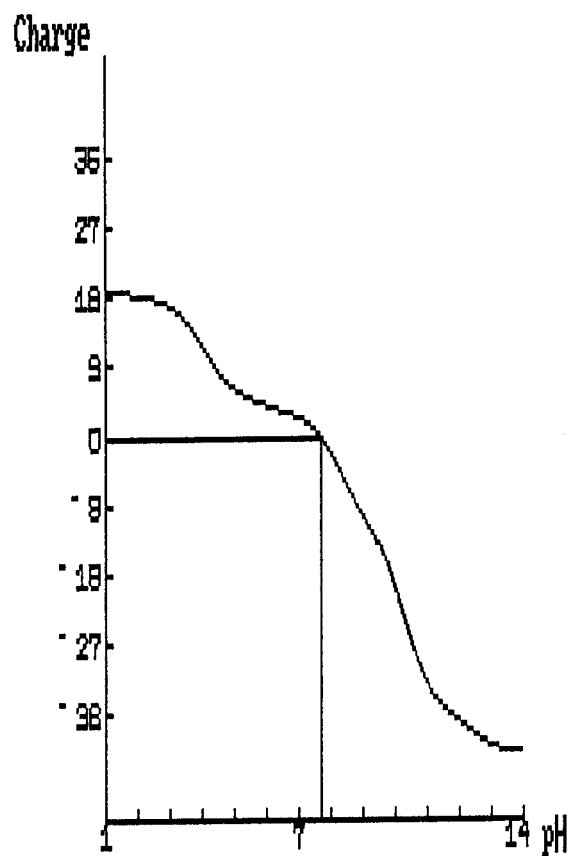


Figura 16: Perfil da curva que relaciona carga-pH da sequência de aminoácidos da BthTX-II. O gráfico define a previsão do ponto isoelétrico de BthTX-II, cujo valor foi calculado como descrito por *Skoog & Wichman, (1986.)*

O estudo de hidrofobicidade entre BthTX-II e uma PLA₂ Asp-49 com atividade enzimática de PLA₂ (APP-D49 de *Agkistrodon piscivorus piscivorus*) revelou similaridades , que podem ser vistas na Figura 17 , como por exemplo, as regiões dos resíduos que participam da alça de ligação para íons Ca⁺⁺ (região entre os resíduos 20 a 30 e 40 a 50), esta última possuindo os resíduos His-48 e Asp-49.

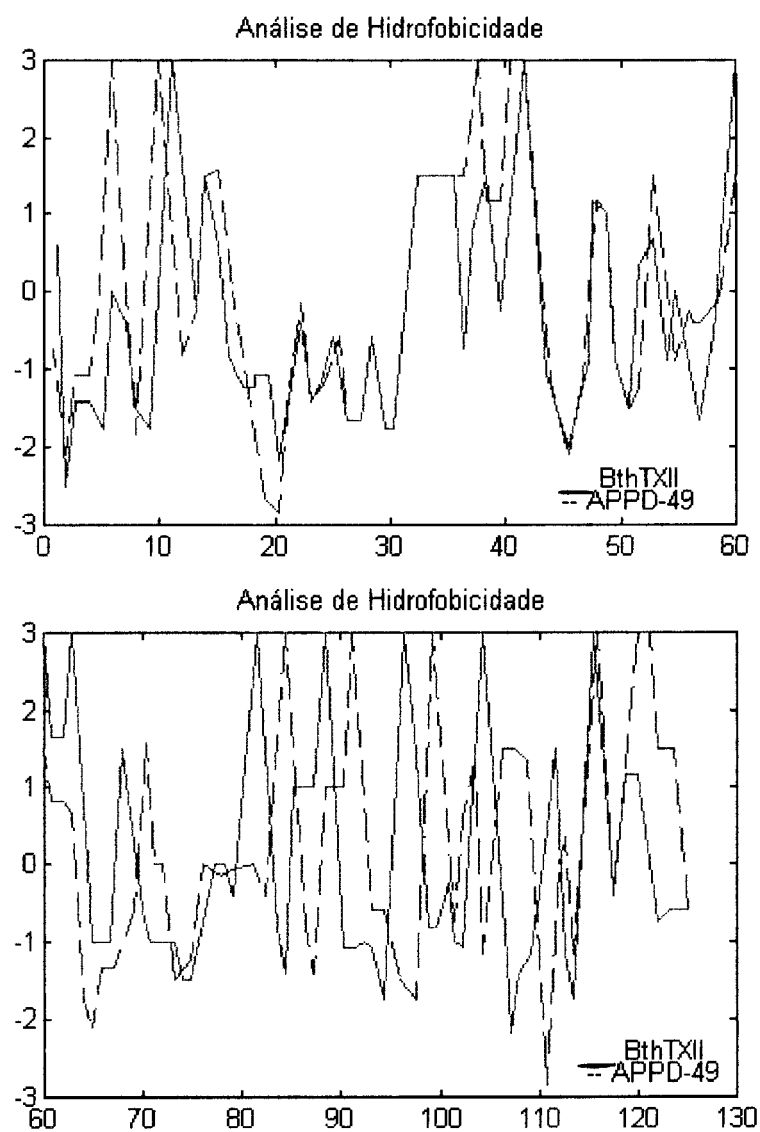


Figura 17: Perfil dos índices de hidrofobicidade das PLA2s : BthTX-II e APPD-49. Os valores de hidrofobicidade foram calculados como descrito por Hoop & Woods, (1983). Abcissa: Posições dos aminoácidos. Ordenada : positivo- hidrofobicidade; negativo-hidrofobicidade.

Quando analisamos o alinhamento da BthTX-II com outras PLA₂s, onde os "gaps" foram introduzidos para maximizar a homologia sequencial e onde o alinhamento foi feito de acordo com os resíduos de meia-cistina, podemos localizar esta proteína dentro do grupo II das famílias de PLA₂s (*Ward & Pattabiraman, 1990*) como sendo uma fosfolipase A₂ Asp 49. A identificação de PLA₂s Lys-49 e Asp-49 são denominações gerais utilizadas na literatura. A numeração correspondente está de acordo com as inserções e deleções gênicas das diferentes proteínas, utilizadas para alinhamento e estudo de homologia sequencial. Neste trabalho a numeração utilizada, para os resíduos de aminoácidos está de acordo com a Figura 18.

Ainda com base na figura anterior podemos observar que o alinhamento da BthTX-II com outras PLA₂s e miotoxinas com estrutura fosfolipásica A₂ mostra um alto grau de homologia entre elas. BthTX-II apresenta 60 % de similaridade com a BthTX-I, uma miotoxina também com estrutura fosfolipásica A₂ do veneno de *B. jararacussu*, 56% com a PLA₂ Asp-49 de *Agkistrodon piscivorus piscivorus*, 57% com PLA₂ Lys-49 também de *A. piscivorus piscivorus*, 53% com AMM, bem como 40% de similaridade com a PLA₂ pancreática bovina. (PROSIS-PHARMACIA)

De acordo com os estudos de cristalografia da PLA₂ pancreática bovina realizados por *Dijkstra e colaboradores (1981)*, os íons Ca⁺⁺ são essenciais para a atividade catalítica para este grupo de enzimas. Este íon se liga a um sítio ativo, o qual está circundado octahedricamente por 7 oxigênios ligantes, que incluem os oxigênios das carbonilas dos resíduos Tyr- 28, Gly-30, Gly-32 e um oxigênio do grupo carboxilato do Asp-49. BthTX-II não apresenta troca de resíduos nestas posições.

	1	10	20	30	40	50	60	70
BthTX II	DLWQWQMIL	-KETGKLPFPYTYG	CYCGWGRGKPVDP	TRCCFVHDCCYK	---	VTNYC	-----	PKKN
BthTX I	SLFELGKMIL	-QETGKNPAKSYG	AYGCNCGVLRGKPK	DATDRCCYVHKCCYK	---	KLTC	-----	NPKN
APP D 49	NLFQFEKLIK	-KMTGKSGMLWYS	AYGCYCGWGGKGR	PKDATDRCCFVHDCCYK	---	KVTGC	-----	NPKN
APP K 49	SVLELGKMIL	-KETGKNAITSYG	SYGCNCGWHRGQ	PKDATDRCCFVHKCCYK	---	KLTD	-----	NHKT
AMM	SLLEFGMMIL	-GETGKNPLTYS	FYGCYCGVGGK	TPKDATDRCCFVHDCCYK	---	NLPDC	-----	SPKT
BP D 49	ALWQFNMIK	KIPSEPLLD	FNNGCYCGLGSG	TPVDDLD	DRCCQTHDNCYK	QA	AKKLD	SCKVLVDN
		80	90	100	110	120	130	
BthTX II	DRYSYRVS	SYNY-CLGG	--PCDEQICE	CDKAI	AVCFREN	LGTYNKK	-AYYHLK	PFCKEPAETC
BthTX I	DRYSYWK	DKTIVCGE	-NNPCLKEL	CECDKAVA	ICLREN	LGTYNKK	-YRYHLK	PFCKK-ADPC
APP D 49	DIYTSV	ENGNIVCGGT	-NPCKKQICE	DRAAA	ICFRD	NLKYD	SKTYWK	YPKKNCKE
APP K 49	DRYSYWK	NAIICEEK	-NPCLKEM	CECDKAVA	ICLREN	LDTYNKK	-YKAYFK	LKCKKP-DTC
AMM	DRYKYH	RENGAIVCG	GT-SCENRICE	DRAAA	ICFRKN	LTYNYI	-YRNYP	DFLCKKSEK
BP D 49	NNYSYCS	SNNEITCS	SENNA	CEAFICN	CDR	NAAICFSK	-VPYNKEH	--KNLDK

Figura 18: Alinhamento da BthTX-II com outras miotoxinas de acordo com os resíduos de meia-cistina. Os "gaps" foram introduzidos para maximizar o grau de homologia. Os resíduos numerados correspondem às suas relativas posições após o alinhamento. BthTX-II (Bothropstoxina-II, este trabalho); BthTX-I (Cintra e cols., 1993); APP D-49 (Kaiser e cols., 1990); APP K-49 (Francis e cols., 1991) e BP (Pancrreatica Bovina) (Fleer e cols., 1978).

No mecanismo proposto por *Ven den Berg e colaboradores (1988)*, a unidade responsável pela catálise nas PLA₂s é compreendida pelos resíduos His-48, Asp-99 e uma molécula de água. A função desta unidade catalítica assemelha-se a serino proteases. Apesar de possuir estes resíduos que são altamente conservados nas PLA₂s pertencentes ao grupo II, BthTX-II apresenta atividade catalítica residual (*Homsí-Brandeburgo e cols., 1988; Gutiérrez e cols., 1991*).

Dados da literatura mostram que a maioria das PLA₂s pertencentes ao grupo II possuem serina como aminoácido N-terminal (*Dupureur e cols., 1992 a*). No entanto, no sequenciamento dessa região na BthTX-II foi identificada uma troca de Ser-1 para Asp-1. Observa-se também a presença de glutamina como resíduo da posição 4, região invariável nas PLA₂s pertencentes ao grupo II (*Dennis, 1994*).

Como outras PLA₂s pertencentes ao grupo II, a BthTX-II possui aminoácidos com grandes cadeias hidrofóbicas laterais concentrados nos primeiros 20 resíduos (N-terminal) e nos últimos 30 (C-terminal), como também é o caso de outra PLA₂ miotóxica do veneno de *Vipera russelli* (*Gowda e cols., 1994*). Uma sequência rica em aminoácidos básicos são encontrados na região molecular compreendida entre os resíduos 68 e 77, também observada na BthTX-I. Essas poli-lisinas (K-K), formam estruturas randômicas em pH neutro, o que dificulta a formação de pontes de hidrogênio intercadeias. Alguns autores sugerem que estas estruturas flexíveis com seus radicais OH livres proporcionam a formação de domínios importantes responsáveis pelos efeitos tóxicos deste grupo de proteínas ao facilitarem as interações proteína - proteína. (*Verheij e cols., 1980*)

Dados da literatura mostram, que as pontes de hidrogênio entre os grupos fenólicos dos resíduos Tyr-52, Tyr-73 e a carboxila do Asp-99 favorecem a

orientação conformacional de outros resíduos, que também participam da catálise, como Phe-5, Phe-22, Phe-97, Phe-106, Tyr-52, Tyr-69, Tyr-73 e Tyr-75 . Esta rede extensa de anéis aromáticos próximos ao sítio ativo fornecem um ambiente hidrofóbico, que favorece a estabilidade conformacional da proteína, favorecendo a atividade de PLA₂ (Dupureur e cols., 1992a). Na BthtX-II, podemos observar trocas de resíduos em algumas das posições mencionadas acima como, Phe-22 → Tyr -22; Phe-5→ Trp-5 e Tyr-69→ Lys-69 (Fig. 17).

Apesar de Phe-5 juntamente com Ile-9 favorecerem a formação de um "canal hidrofóbico" que participa da ligação ao substrato nas PLA₂s (Dupureur e cols., 1992a), a troca do resíduo da posição 5, bem como a da posição 22, pareceriam não estar causando grandes influências em termos conformacionais.

Phe-22 e Phe-106 são resíduos altamente conservados nas PLA₂s. Aparentemente, estes resíduos não possuem papel estrutural, no entanto são requeridos para a atividade catalítica ótima dessas enzimas (Dupureur e cols., 1992 b).

Como em outras PLA₂s, a BthTX-II possui Thr-112, Tyr-113 e três outras tirosinas entre os resíduos 112 a 121. Segundo Francis e colaboradores (1991), essas regiões moleculares compreendidas entre esses resíduos são responsáveis pela expressão da atividade miotóxica e estão presentes em todas as miotoxinas fosfolipásicas A₂ .

Baseados nestas análises estruturais, podemos concluir que o grau de homologia entre estas PLA₂s miotóxicas sugere que estas proteínas possuem um precursor ancestral comum e que mutações pontuais têm influência direta na atividade de PLA₂ destas proteínas (Dennis, 1994). O fato da BthTX-II se apresentar como

uma miotoxina fosfolipásica A₂ Asp-49 e possuir atividade catalítica residual, sugere a necessidade de uma revisão na forma de classificar estas enzimas, uma vez que até agora somente as PLA₂s Lys-49 eram consideradas enzimas sem atividade fosfolipásica A₂ (Maraganore e cols., 1984).

BthTX-II :Propriedades Biológicas

A ativação de ácido araquidônico por PLA₂s, é o passo inicial para a formação de prostaglandinas, mediadores importantes para o desenvolvimento de uma resposta inflamatória. A atividade de PLA₂s circulantes é responsável por algumas condições patológicas tais como: endotoxemia (Vadas & Hay, 1983), inflamação subcrônica (Moreno, 1993); septicemia (Vadas, 1984), artrite reumatóide (Pruzanski e Vadas., 1991) e pancreatite (Schoder e cols. 1980). A associação entre PLA₂ intracelular e inflamação tem sido implicada em diferentes processos inflamatórios. A administração de PLA₂s de venenos ófidicos ou de venenos de abelhas em animais de laboratório inicialmente induzem diversos tipos de reações inflamatórias. Assim, a injeção subplantar de diversas PLA₂s em ratos promove edema de pata dependente da degranulação local de mastócitos. Ou seja, a ativação dos mastócitos resulta em liberação de histamina e serotonina, dois mediadores capazes de aumentar a permeabilidade microvascular causando o edema inflamatório (Cirino e cols., 1989; Moreno e cols., 1992).

Tem sido sugerido na literatura que a resposta inflamatória induzida por tais PLA₂s é dependente da atividade enzimática, visto que o tratamento com brometo de p-bromofenacil usualmente reduz a atividade inflamatória. Além disso, PLA₂s com baixa atividade enzimática (por exemplo, pancreática de mamíferos) não produzem

resposta inflamatórias significativas (Moreno e cols., 1992). Assim, a relação entre atividade enzimática e a capacidade de PLA₂ induzir edema é alvo de várias controvérsias (Visnawanath e cols., 1987.; Marshall e cols, 1989). Isto pode ser reflexo de diferentes aspectos físico-químicos e do grau de homologia sequencial de suas estruturas primárias.

Bothropstoxina-II (BthTX-II) e Bothropstoxina-I (BthTX-I) são duas proteínas homólogas e miotóxicas isoladas do veneno de *Bothrops jararacussu* (Homsibrandeburgo e cols., 1988; Cintra e cols., 1993). Embora ambas, BthTX-II (PM 13.976,39) e BthTX-I (PM 13.720) assemelhem-se a PLA₂s na composição e sequência de suas estruturas primárias, são desprovidas de atividade enzimática (Gutiérrez e cols., 1991). Neste estudo investigamos a atividade edematogênica de BthTX-II em pata de rato. A degranulação de mastócitos *in vitro* foi monitorada através da liberação de [¹⁴C]-5HT.

Um edema dose-dependente foi observado após a injeção de BthTX-II em ratos. Este edema atingiu seu grau máximo entre 30 e 60 minutos após a injeção, decaindo sensivelmente após este intervalo (Fig.12). Isto está de acordo com observações prévias de que, muitas PLA₂s miotóxicas presentes em venenos são capazes de induzir edema (Lomonte & Gutiérrez, 1989). A cyproheptadina (antagonista do receptor de serotonina/histamina) foi capaz de inibir de forma significativa a resposta inflamatória induzida por BthTX-II (Fig. 15), indicando que, à semelhança de outras PLA₂s , o edema decorre da degranulação de mastócitos.

Choi e colaboradores (1989) reportaram que a PLA₂ de *Naja naja* causava a liberação de histamina de mastócitos peritoniais de ratos de uma forma dose-

dependente e *Cirino e colaboradores (1989)* demonstraram, que drogas anti-histamínicas eram altamente efetivas contra a ação edematogênica de PLA₂s .

Vários autores sugerem, que a produção de lisofosfolípídeos durante a atividade catalítica de PLA₂s poderiam ser os mediadores da liberação de histamina de mastócitos peritoniais de ratos e que estes mediadores poderiam estar envolvidos na indução de edema por estas enzimas (PLA₂s) .No entanto, a relação entre atividade fosfolipásica A₂ e indução de edema é contraditória (*Vishwanath e cols., 1987; Marshall & Chang., 1989*)

Alguns trabalhos comentam sobre a relevância da atividade PLA₂ na patogenicidade do edema induzido por venenos *Bothrópicos*. (*Kini & Evans, 1989; Liu e cols., 1991*). Estes autores sugerem que PLA₂s induzem edema via 2 mecanismos diferentes: (a) por liberação de ácido araquidônico como consequência da degradação enzimática de fosfolípídeos de membrana, o que acentua a biossíntese de eicosanóides e (b), por afetar diretamente a microvasculatura causando extravasamento de plasma (*Lomonte e cols., 1994*).

O desenvolvimento de edema decorrente da injeção de BthTX-II, consequência da liberação de serotonina, (5-HT) e Histamina (Fig.14) corrobora os dados obtidos por outros autores, sugerindo que a primeira ação irritante de PLA₂s é a liberação de aminas de mastócitos. Alguns trabalhos mostram que a liberação de serotonina e histamina de mastócitos, está diretamente relacionada com a atividade catalítica de PLA₂s (*LLoret & Moreno, 1993, 1994*) .

Nossos resultados entretanto, sugerem que no caso da BthTX-II, a liberação de aminas acontece de forma independente de sua ação catalítica, já que esta

miotoxina com estrutura de PLA₂ possui atividade catalítica residual (*Gutiérrez e cols., 1991*). Como controle, utilizamos BthTX-I, uma outra miotoxina com estrutura de PLA₂ do veneno de *B. jararacussu*, com ausência total de atividade fosfolipásica A₂, e observamos a formação local de edema e também liberação de serotonina de mastócitos (Figuras 12, 13 e 14).

Assim, sugerimos que a atividade pró-inflamatória de PLA₂ extracelular não depende somente de sua atividade enzimática, uma vez que BthTX-I e BthTX-II apresentam uma atividade enzimática pouco significativa (*Gutiérrez e cols., 1991*). A atividade inflamatória de BthTX-II pode ser atribuída a um efeito direto, não enzimático. Esses dados apoiam ainda a evidência da existência de sítios separados para a expressão das atividades enzimática e farmacológica para a família das PLA₂s

CONCLUSÕES

Conclusões

1. BthTX-II é uma miotoxina com estrutura de PLA₂ Asp-49 com atividade catalítica residual. Este dado é importante pois, torna necessária uma revisão na forma de classificação das PLA₂s, já que até então acreditava-se que somente as PLA₂s -Lys-49 eram isentas de atividade de PLA₂.

2. A liberação de aminas de mastócitos peritoniais de rato, sugere que a BthTX-II atue de forma direta, independente de sua atividade catalítica de PLA₂, apoiando as evidências de sítios separados, no entanto justapostos, para a expressão das atividades catalítica e farmacológica para esta família de proteínas

**PERSPECTIVAS FUTURAS
DE TRABALHO**

Perspectivas Futuras

Estudar os mecanismos indutores de citotoxicidade de duas miotoxinas fosfolipásicas A_2 de veneno Bothrópico. Uma delas é a BthTX-II de *Bothrops jararacussu*, que possui todos os resíduos participante da alça de ligação para íons cálcio como Tyr-28, Gly-30, Gly-32, His-48 e Asp-49. Entretanto, como esta proteína possui atividade fosfolipásica A_2 residual torna-se desta forma uma ferramenta importante para o entendimento da relação entre estrutura e atividade biológica desta família de proteínas. A outra PLA_2 será a de *Bothrops alternatus*, serpente cujo veneno tem sido pouco estudado. Os estudos serão realizados com células de mamíferos em cultura.

Este projeto será desenvolvido através de uma bolsa de Recém-Doutor concedida pelo CNPq

COMUNICAÇÕES EM CONGRESSOS

Comunicações em Congressos

1. II Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular-SBBq

Local: Hotel Glória - Caxambu/MG

Apresentação do Trabalho: *BthTX-II : Partial Primary Structure (M.F. Pereira; A.C.O. Cintra; J.R. Giglio; J.C. Novello and S. Marangoni)*

2. VII Reunião da Federação De Sociedades de Biologia Experimental

Local: Hotel Glória - Caxambu/MG

Período: 25 a 28 de Agosto de 1993

Apresentação do Trabalho: *BthTX-II: Determinação de sua Atividade Hemolítica. (M.F. Pereira; M.R. Marques; A.C.O. Cintra; J.R. Giglio; J.C. Novello; B. Oliveira and S. Marangoni)*

3. XXIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular-SBBq

Local: Hotel Glória - Caxambu/MG

Período: 14 a 17 de Maio de 1994

Apresentação do Trabalho: *Evidence Of Dimerization Of PLA2 From Bothrops jararacussu In SDS-PAGE(M.F. Pereira; J.R. Giglio; J.C. Novello; B. Oliveira and S. Marangoni*

4. XXIV Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular-SBBq

Local: Local: Hotel Glória - Caxambu/MG

Período: 06 a 09 de Maio de 1995.

Apresentação do Trabalho: *The Primary Structure Of Bothropstoxin II (M.F. Pereira; J.R. Giglio; A.C.O. Cintra; J.C. Novello; B. Oliveira and S. Marangoni)*

5. X Reunião da Federação De Sociedades de Biologia Experimental

Local: Centro de Convenções da Prefeitura de Serra Negra - SP

Período: 23 a 26 de Agosto de 1995.

Apresentação do Trabalho:*Oedema Formation And Mast Cell Degranulation Induced By Phospholipase A2 do Not Depend Only Of Their Enzymatic Activity (E.C.T. Landucci; M.F. Pereira; A.C.O. Cintra; J.C. Novello; B. Oliveira ;S. Marangoni; E. Antunes and G. Nucci)*

**TRABALHOS A SEREM
PUBLICADOS**

Trabalhos a serem Publicados

O conjunto de resultados desta tese estão sendo agrupados em dois trabalhos científicos em fase de manuscrito:

1. *Amino Acid Sequence of BthTX-II. A Phospholipase A₂ Asp-49 from the Venom of Bothrops jararacussu.*

2. *Oedema Formation and Mast Cell Degranulation Induced by Phospholipase A₂ do not Depend only of their Enzymatic Activity.*

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Referências Bibliográficas

Arni, R.K. and Ward, R.J. (1995). Structure of a Calcium-Independent Phospholipase-Like Myotoxic Protein from *Bothrops asper* Venom. *Acta Cryst. D51*: 311-317.

Babu, A.S. and Gowda, T.V. (1991). Effect of Chemical Modification on Enzymatic and Toxicological Properties of Phospholipase A2 from *Naja naja* and *Vipera russelli* Snake Venoms. *Toxicon* 29: 1251-1262.

Baker, B.; Tu, A.T. and Middlebrook, J.L. (1993). Binding of Myotoxin A to Cultured Muscle Cells. *Toxicon* 31: 271-284.

Bell, J.D. and Biltonen, R.L. (1992). Molecular Details of the Soluble Phospholipase on Lipid Bilayers: Comparison of Computer Simulations with Experimental Results *J. Biol. Chem.* 267: 11046-11056

Bonta, I.L.; Vargaftig, B.B. and Bohm, G.M. (1979). In: *Handbook of Experimental Pharmacology*, Vol. 52, pp. 629-683.

Chang, J. ; Musser J.H. and McGregor, H. (1987).. Phospholipase A2 : Function and Pharmacological Regulation. *Biochem. Pharmacol.* 36: 2429-2436.

Chargaff, E. and Cohen, S.S. (1939). *J. Biol. Chem.* 129: 619. **apud Waite, M. (1987).** In: *The Phospholipases, Handbook of Lipid Research* (Hanahan, D.J. ed) Plenum Press. New York, -

Choi, S.H.; Sakamoto, T.; Fukutomi, D.; Inagaki, N.; Matsuura, N.; Nagai, H. and Koda, A. (1989). Pharmacological Study of Phospholipase A2 Induced Histamine Release from Rat Peritoneal Mast Cells. *J. Pharmacobio-Dyn.* 12: 517-522.

Chou, P.Y. and Fasman, G.D. (1978). Empirical Predictions of Protein Conformation. *Ann. Rev. Biochem.* 47: 251-276.

Chu, S.T.; Chu, C.C.; Tseng, C.C. and Chen, Y.H. (1993). Met-8 of the B1-Bungarotoxin Phospholipase A2 Subunit is Essential for the PLA2-Independent Neurotoxic Effect. *Biochem. J.* 295: 713-718.

Chwetzoff, S.; Tsunasawa, S.; Sakiyama, F. and Menez, A.(1989). Nigexine , A Phospholipase A2 from Cobra Venom with Cytotoxic Properties not Related to Esterase Activity. *J.Biol. Chem.* 264: 13284-13294.

Chwetzoff, S. (1990). On the Mode of Basic PLA2 from *Naja nigricollis* Venom. *Biochem. Biophys. Acta.* 1045: 285-290.

Cintra, A.C.O.; Marangoni, S.; Oliveira, . and Giglio, J.R. (.1993) Bothropstoxin-I: Amino Acid Sequence and Function. *J. Protein Chem.* 12: 57-64.

Cirino, G; Peers,S.H.; Wallace, J.L. and Flower, R.J.(1989). A Study of Phospholipase A2-Induced Oedema in Rat Paw. *Eur. J. Of Pharmacology:* 166: 505-510.

Davidson, F.F. and Dennis, E.A. (1990). Evolutionary Relationships and Implications for the Regulation of Phospholipase A2 from Snake Venom to Human Secreted Forms. *J. Mol. Evolution* 31: 228-238.

Dennis, E.A. (1994). Diversity of Group Types, Regulation and Function of Phospholipase A2. *J. Biol. Chem.* 269: 13057- 13060.

Dennis, E.A.(1973). *J. Lipid. Research* 14: 152.

Diaz, C.; Alape, A.; Lomonte, B.; Olamendi, T. and Gutiérrez, J.M. (1994). Cleavage of the NH2-Terminal Octapeptide of *Bothrops asper* Myotoxic Lysine-49 Phospholipase A2 Reduces its Membrane Destabilizing Effect. *Arch. Biochem.Biophys.* 312: 336-339.

Diaz, C.; Gutiérrez, J.M. and Lomonte, B. (1992). Isolation and Characterization of Basic Myotoxic Phospholipase A2 from *Bothrops*

godmani (Godmans Pit Viper) Snake Venom. Arch. Biochem. Biophys. 298: 135-142

Dijkstra, B.W. ; Kalk, K.H.; Hol, W.G.J. and Drenth, J. (1981). Structure of Bovine Pancreatic Phospholipase A₂ at 17 Å Resolution. J. Mol. Biol. 147: 97-123.

Dupureur, C.M.; Yu, B-Z; Mamone, J. A.; Jain, M.K. and Tsai, M-D. (1992a). Phospholipase A₂ Engineering. Structural and Functional Roles of Aromaticity and Hydrophobicity in the Conserved Phenylalanine-22 and Phenylalanine-106 Aromatic Sandwich. Biochemistry 31: 10576- 10583.

Dupureur, C.M.; Yu, B-Z; Jain, M.K.; Noel, J.P.; deng, T.; Li, Y.; Byeon, In-Ja, L. and tsai, M-D. (1992b). Phospholipase A₂ Engineering. Structural and Functional Roles of Highly Conserved Active Site Residues Tyrosine-52 and Tyrosine 73. Biochemistry. 31: 6402-64013.

Edmam, P. and Begg, G. (1967). A Protein Sequenator. Eur. J. Biochem. 1: 80-9

Fleer, E.A.M.; Verheij. H.M. and de Haas, G.H.(1981). Modification of Carboxylate Groups in Bovine Pancreatic Phospholipase A₂. Identification of Aspartate-49 as Ca⁺⁺ Binding Ligand. Eur. J. Biochem. 113: 283-288.

Francis, B.; Gutiérrez, J.M.; Lomonte, B. and Kaiser, I.I. (1991). Miotoxin II from Bothrops asper (terciopelo) Venom is a Lysine -49 Phospholipase A₂. Arch. Biochem. Biophys. 284: 352-359.

Fremont, D.H.; Anderson, D.H.; Wilson, I.A. and Dennis, E.A. (1993). Crystal Structure of Phospholipase A₂ from Indian Cobra Reveals a Trimeric Association. Proc. Natl. Acad. Sci. 90: 342-346

Gascard, P.; Sauvage, M.; Sulpice, J.C. and Giraud, F. (1993). Characterization of Structural and Functional Phosphoinositide Domains in Human Erythrocyte Membranes. Biochem. 32: 5941.

Gehrke, C.W. (1985). J. Assoc. OFF Anal. Chem. 68: 811-821 **apud Marques, U.M.L. (1994).** Preparo de Amostras para Análise de Aminoácidos em Alimentos. Apresentado no Seminário sobre Análise de Aminoácidos em Alimentos e Outros Materiais Biológicos- Instituto de Tecnologia de Alimentos, Campinas 14 a 15 de setembro de 1994.

Gowda, V.T; Schmidt, J. and Middlebrook, J. L. (1994). Primary Sequence of the Most Basic Myonecrotic Phospholipase A₂ from the Venom of *Vipera russelli*. Toxicon 32: 665-673.

Griffin, P.R. and Aird, S.D. (1990). A new Small Myotoxin from the Venom of the Prairie Rattlesnake (*Crotalus viridis viridis*). FEBS. LETT. 274:43-47.

Guriérrez, J.M.; Chaves, F.; Gené, J.A.; Lomonte, B.; Camacho, Z. and Schosins, K.Y. (1989). Myonecrosis Induced in Mice by a Basic Myotoxin Isolated from the Venom of the Snake *Bothrops nummifer* (Jumping Viper) from Costa Rica. Toxicon 27: 735-745

Gutiérrez, J.M.; Lomonte, B. and Cerdas, L. (1986). Isolation and Partial Characterization of a Myotoxin from the Venom of the Snake *Bothrops nummifer*. Toxicon 24: 885-894.

Gutiérrez, J.M.; Lomonte, B.; Chaves, F.; Moreno, E. and Cerdas, L. (1986). Pharmacological Activities of a Toxic Phospholipase A₂ Isolated from the Venom of *Bothrops asper*. Comp. Biochem. Physiol. 84C: 159-164.

Gutiérrez, J.M.; Núñez, J.; Díaz, C.; Cintra, A.C.O.; Homs-Brandeburgo, M.I. and Giglio, J.R. (1991). Skeletal Muscle Degeneration and Regeneration after Injection of Bothropstoxin-II, A Phospholipase A₂ Isolated from the Venom of the Snake *Bothrops jararacussu*. Exp. Molec. Path. 55: 217- 229

Gutiérrez, J.M.; Ownby, C.L. and Odell, G.V. (1984). Isolation of a Myotoxin from *Bothrops asper* Venom: Partial Characterization and Action on Skeletal Muscle. Toxicon 22: 115-128.

Hanahan, D.J. (1952). J. Biol. Chem. 195: 199. **apud Waite, M. (1987).** In: The Phospholipases, Handbook of Lipid Research (Hanahan, D.J. ed) Plenum Press. New York.

Hanahan, D.J. (1971). In: Phospholipases. The Enzymes. pp. 71-85.

Harris, J.B. (1984). Polypeptides from Snake Venoms Which act on Nerve and Muscle. Progress. Med. Chem. 21: 64-96

Heinrikson, R.L.; Krueger, E.T. and Keim, P.S. (1977). Amino Acid Sequence of Phospholipase A₂ from the Venom of *Crotalus adamanteus*. A New Classification of Phospholipase A₂ Based upon Structural Determinants. J. Biol. Chem. 252: 4913-4921.

Hermodson, M.A.(1982). Chemical Cleavage Of Proteins . In: Methods in Protein Sequence

Homsí-Brandeburgo, M.I.; Queiroz, L.S.; Santo-Neto, H.; Rodrigues-Simioni, L. and Giglio, J.R. (1988). Fractionation of *Bothrops jararacussu* Snake Venom: Partial Chemical Characterization and Biological Activity of Bothrotoxin. Toxicon 26: 615-627.

Hong, S. and Chang, C. (1985). Electrophysiological Studies of Myotoxin A, Isolated from Prairie Rattlesnake (*Crotalus viridis viridis*), on Murine Skeletal Muscle. Toxicon 23: 927-937.

Hoop, T.P. and Woods, K.R. (1983). A Computer Program for Prediction of Protein Antigenic Determination. Mol. Immunol. 20: 483-489.

Houmard, J. and Drapeau, G.R. (1972). Staphylococcal Protease : A Proteolytic Enzyme Specific for Glutamoyl Bonds. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 69: 3506-3509.

Hughes, A.(1935). Biochem. J. 29: 437. **apud Waite, M. (1987).** In: The Phospholipases, Handbook of Lipid Research (Hanahan, D.J. ed) Plenum Press. New York

King ,E.J. and Nolam, M. (1933)). Biochem. J. 27: 403-407. **apud Waite, M. (1987).** In: The Phospholipases, Handbook of Lipid Research (Hanahan, D.J. ed) Plenum Press. New York, -

Kini, R.M. and Evans, H. (1989). A Model to Explain the Pharmacological Effects of Snake Venom Phospholipase A₂. Toxicon 27: 613-635.

Krizaj, I.; Bieber, A.L.; Ritonja, A. and Gubensek, F. (1991). The Primary Structure of Ammodytin L, A Myotoxic Phospholipase A₂ Homologue from *Vipera ammodytes* Venom. Eur. J. Biochem. 202 : 1165-1168.

Kyes, P. (1902). Wochenschr 39:886. **apud Waite, M. (1987).** In: The Phospholipases, Handbook of Lipid Research (Hanahan, D.J. ed) Plenum Press. New York

Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of Structural Proteins among the Assembly of the Head of the Bacteriophage T4. Nature 277: 680-685.

Lee, C.Y. and Ho, C.L.(1978). Pharmacology of Snake Toxin with PLA₂ activity. In: C.H.L. (Ed), Versatility of Proteins, Academic Press, New York. 433-446.

Liu, C.S.; Chen, J.M.; Chang, C.H.; Chen, S.W.; Teng, C.M. and Tsai, I.H. (1991). The Amino Acid Sequence and Properties of an Edema Inducing Lys-49 Phospholipase A₂ Homolog from the Venom of *Trimeresurus mucrosquamantus*. Biochem. Biophys. Acta 1077: 362-370.

LLoret, S.; Moreno, J.J. (1993). Oedema Formation and Degranulation of Mast Cells by Phospholipase A₂ Purified from Porcine Pancreas and Snake Venoms. Toxicon 31: 949-956.

LLoret, S. and Moreno, J.J.(1994). Immunochemical Relatedness between Secretory Phospholipase A₂ and Intracellular Phospholipase A₂ Activity Linked with Arachidonic Acid Mobilization in Macrophages. Toxicon 32: 1327-1336.

Lombardo, D. and Dennis, E.A. (1985). Cobra Venom Phospholipase A₂ Inhibition by Manoalide. A Novel Type of Phospholipase Inhibitor. J. Biol. Chem. 260: 7234-7245.

Lomonte, B.; Gutiérrez, J.M.; Furtado, M.F.; Otero, R.; Rosso, J.P.; Vargas, O.; Carmona, E. and Rovira, M.E. (1990). Isolation of Basic Myotoxins from *Bothrops moojeni* and *Bothrops atrox* Snake Venoms Toxicon 28: 1137- 1146.

Lomonte, B.; Lundgreen, J.; Johansson, B. and Bagge, U. (1994). The Dynamics of Local Tissue Damage Induced by *Bothrops asper* Venom and Myotoxin II on the Mouse Cremaster Muscle: An Intravital and Electron Microscopic Study. Toxicon 32: 41-55.

Lomonte, B. and Gutiérrez, J.M. (1989). A New Muscle Damaging Toxin, Myotoxin III from the Venom of the Snake *Bothrops asper* (terciopelo). Toxicon 27: 725-733.

Maraganore, J.M.; Merutka, G; Cho, W.; Welch, W.; Kézdy, F.J. and Heinrikson, R.L. (1984). A New Class of Phospholipase A₂ with Lysine in Place of Aspartate 49. J. Biol. Chem. 259: 13839-13843.

Maraganore, J.M. and Heinrikson, R.L.(1986). The Lysine-49 Phospholipase A₂ from the Venom of *Agkistrodon piscivorus piscivorus* Relation of Structure and Function to other Phospholipases A₂. J. Biol. Chem. 261: 4797-4804.

Marangoni, S.; Ghiso, J.; Sampaio, S. ; Arantes, E.C.; Giglio, J.R.; Oliveira, B. and Frangione, B. (1990). The Complete Amino Acid Sequence of Toxin TSTX-VI Isolated from the Venom of the Scorpion *Tityus serrulatus*. J. Protein Chem. 9: 595-601.

Marshall, L.A.; Chang, J.Y.; Calhoun, W.; Yu, J. and Carlson, R.P. (1989). Proinflammatory Effects of Phospholipase A₂ in Several *in vitro* and *in vivo* Systems. J. Cell. Biochem. 40: 147-155

Marshall, L.A. and Chang, J. (1989). Novel Eicosanoid Inhibitors : In : Inflammation and Drugs Series. Vol. 11, pp. 133-151 (Rainsford, K. and Velo, G.P. eds.)

McCarron, R.M.; Goroff, D.K.; Luhr, J.E; Murphy, M.A. and Hercowitz, B. (1984). Methods for the Collection of Peritoneal and Alveolar Macrophages. Meth. Enzymol. 108: 274-284

Mebs, D. and OwnBy, C.L. (1990). Myotoxin Components of Snake Venoms: Their Biochemical and Biological Activities. Pharmacol. Ther. 48: 223 - 236.

Mebs, O. and Samejima, J. (1986). Isolation and Characterization of Myotoxic Phospholipase A₂ from *Crotalid* Venoms. Toxicon 24: 161-168.

Mitchell, W.M. and Harrington, W.F. (1968). Purification and Properties of Clostridiopeptidase B. (Clostripain)

Moreno, J.J. (1993). Time Course of Phospholipase A₂, Eicosanoid and Cellular Accumulation in Rat Immunological Air Pouch Inflammation. Int. J. Immunopharmacol. 15: 597-603.

Moreno, J.J.; Ferrer, X; Ortega, E. and Carganico, G.(1992). PLA₂-Induced in Rat Skin and Histamine Release in Rat Mast Cells. Evidence for Involvement of Lysophospholipids in the Mechanism of Action. Agents Actions 36: 258-263.

Mukherjee, A.B.; Miele, L. and Pattabiraman, N. (1994). Phospholipase A₂ Enzymes : Regulation and Physiological Role. Biochem. Pharmacol. 48: 1-10.

Ownby, C.; Cameron, D. and Tu, A.T. (1976). Isolation of Myotoxic Component from Rattlesnake (*Crotalus viridis viridis* venom) . Electron Microscopic Analysis of Muscle Damage. Am. J. Pathol. 85: 149- 157.

Paddock, G.V. (1979). Biochem. Biophys. Res. Commun. 87: 946 **apud** Marques, U.M.L. (1994). Preparo de Amostras para Análise de

Aminoácidos em Alimentos. Apresentado no Seminário Sobre Análise de Aminoácidos em Alimentos e Outros Materiais Biológicos- Instituto de Tecnologia de Alimentos, Campinas 14 a 15 de setembro de 1994.

Pruzanski, W. and Vadas, P. (1991). Phospholipase A₂-A Mediator Between Proximal and Distal Effectors of Inflammation. *Immun. Today.* 12: 143-146.

Resfield, R.A.; Lewis, V.J. and Willians, D.E. (1962). Disc Electrophoresis of Basic Proteins and Peptides on Polyacrilamide Gels. *Nature* 4838: 281-289.

Rosenberg, P.; Gassemi, A.; Condrea, E.; Dhillon, D. and Yang, C.C. (1989). Do Chemical Modifications Dissociate between the Enzymatic and Pharmacological Activities of β -Bungarotoxin and Notexin ?*Toxicon* 27:137-159.

Rosenberg, P. (1990). In: *Handbook of Toxicology* (Shier, W. and Mebs, D. eds.) pp. 67-277. Marcel Dekker, New York and Basel.

Sarwar, G. (1983). *J. Food Sci.* 48: 526-531. **apud Marques, U.M.L. (1994).** Preparo de Amostras para Análise de Aminoácidos em Alimentos. Apresentado no Seminário Sobre Análise de Aminoácidos em Alimentos e Outros Materiais Biológicos- Instituto de Tecnologia de Alimentos, Campinas 14 a 15 de setembro de 1994.

Schoder, T.; Kinilaakso, E.; Kinnunen, P.K. J. and Lempinen, M. (1980). Serum in Human Acute Pancreatitis. *Scand. J. Gastroenterol.* 15: 633-636.

Sittampalam, G.S.I.(1988)-J. Assoc. Anad. Chem. 71: 833-838. **apud Marques, U.M.L. (1994).** Preparo de Amostras para Análise de Aminoácidos em Alimentos. Apresentado no Seminário Sobre Análise de Aminoácidos em Alimentos e Outros Materiais Biológicos- Instituto de Tecnologia de Alimentos, Campinas 14 a 15 de setembro de 1994.

Sively, J.E. (1986). In: Methods of Protein Microcharacterization: A Practical handbook. Cap. II . pp.66. Humana Press. Clifton, New Jersey .

Skoog, B. and Wichman, A. (1986). Trends In Analytical Chemistry . 5; 82

Slotboom, A.J.; Verheij, H.M.; de Haas, G.H. (1982). In: Phospholipids. Elsevier, Amsterdam (eds. Hawthorne, J.N and Ansell, G.B. pp. 359.

Sukla, S.D. and Hanahan, D.J. (1982). Differences in the Pattern of Attack of Acidic, Neutral and Basic PLA₂ of *A. halys blomhofii* on Human Erythrocyte Membranes : Problems in Interpretation of Phospholipid Location. J. Biol. Chem. 257: 2908.

Takasaki, C; Sugama, A.; Yanagita, A.; Tamiya, N.; Rowan, E.G. and Harvey, A.L. (1990). Effects of Chemical Modifications of Pa-11, A A2 from the Venom of Australian King Brown Snake (*Pseudechis australis*), on its Biological Activities. Toxicon 28: 107 -118

Utainsincharon, P.; Baker, B. and Tu, A.T. (1991). Binding of Myotoxin A to Sarcoplasmic Reticulum Ca⁺⁺-ATPase : A Structural Study. Biochemistry 30: 8211-8216

Vadas, P. (1984). Elevated Plasma PLA₂ Levels : Correlation with the Hemodynamic and Pulmonary Changes in Gram-Negative Septic Shock. J. Lab. Clin. Med. 104: 873-877.

Vadas, P. and Hay, J.B. (1983). Involvement of Circulating PLA₂ in the Pathogenesis of the Hemodynamic Changes in Endotoxin Shock. Can. J. Physiol. Pharmacol. 61: 561-567.

Van den Bergh, C.J.; Slotboom, A.J.; Verheij, H.M. and de Haas, G.H. (1989). The Role of Asp-49 and other Conserved Amino Acids in Phospholipases A₂ and their Importance for Enzymatic Activity. J. Cell. Biochem. 39: 379- 390.

Verheij, H.M.; Volwerk, J.J.; Jasen, E.H.J.M.; Puyk, W.C.; Dijkstra, B.W.; Drenth, J. and de Haas, G.H.(1980). Methylation of Histidine-48 in

Pancreatic Phospholipase A₂ . Role of Histidine and Calcium Ion in the Catalytic Mechanism. *Biochemistry* 19: 743-750

Vishwanath, B.S.; Kini, R.M. and Gowda, T.V. (1987). Characterization of Three Edema Inducing PhospholipaseA₂ Enzymes From Habu (*Trimeresurus flavoviridis*) Venom and their Interaction with the Alkaloid Aristolochic Acid . *Toxicon* 25: 501-509.

Volwerk, J.J.; Piertenson, W.A. and de Haas, G.H (1974). Histidine at the Active Site of Phospholipase A₂ . *Biochemistry* 13: 1446- 1450.

Waite, M. (1987). In: The Phospholipases, Handbook Of Lipid Research (Hanahan, D.J. ed) Plenum Press. New York, 5: 155-167

Ward, K.B. and Pattabiraman, N. (1990). Comparative Anatomy of Phospholipase A₂ Structures. *Adv. Exp. Med. Biol.* 279: 23-36.

Wijkander, J. and Sundler, R. (1989). A Phospholipase A₂ Hydrolyzing Arachidonoyl-Phospholipids in Mouse Peritoneal Macrophages. *FEBS. Lett.* 244: 51-56.

Yang, C. and Tseng, K. (1978). Effect of Crostamine, a Toxin of South American Rattlesnake Venom, on the Sodium Channel of Murine Skeletal Muscle. *Br. J. Pharmac.* 63: 551-559.

Yang, C. C. (1994). Structure Function Relationship Phospholipase A₂ from Snake Venoms. *J. Toxicol. Toxins Reviews* 13: 125-177.

Yang, C.C and Lee, H.J. (1986). Selective Modification of Tyrosine-68 in α_1 -Bungarotoxin from the Venom of *Bungarus multicinctus* (Taiwan Banded Krait). *J. Prot. Chem.* 5: 15-18.

Yang, C.C.; King, K. and Sun, T.P. (1981). Chemical Modification of Lysine and Hystidine Residues in Phospholipase A₂ from the Venom of *Naja naja atra* (Taiwan cobra). *Toxicon* 19: 645-659.

SUMMARY

Summary

Bothropstoxin-II (BthTX-II) showing residual phospholipase activity, is a protein with only one polipeptide chain with calculated molecular mass of 13.976 and partially contributes for the miotoxic activity of the *Bothrops jararacussu* venom.

The primary structure of BthTX-II was determined from the amino acid automatic sequence of the peptides obtained after *Staphylococcus aureus* strain V₈ and clostripain digestion of reduced and carboxylated toxin. The complete sequence is :

DLWQWGQMILKETGKLPPYYTTYGCYCGWGRGKPVDPDRCCFVHDCC
YKVTNYCPKKNDRYSYSSVSYNYCLGGPCDKQICECDKAIAVCFRENLGT
YNKKAYYHLKPFCKEPAETC.

Comparison of BthTX-II (Asp-49) with amino acid sequence of phospholipases from snakes venoms and mammalian sources shows high homology degree. This toxin displays the amino acid residues which are involved in the Ca⁺⁺ loop, essential for the phospholipase activity, but has showed residual phospholipase activity.

In the snakes bites, the more commom symptom is a formation of local oedema. The time course of the oedema inducing BthTX-II in foot pad of rats, was fast in the beginning, remaining maximum between 30-60 minutes and decreasing after this time. The preview treatmant of the animals with cyproheptadine (histamine and serotin antagonist) abolished the edematogenic response of BthTX-II and is indicative that the oedema *in vivo* is caused by mast cells degranulation. Many authors have reportes oedema inducing phospholipase A₂ in rats, suggesting that the first phospholipase action in the oedema is to release the amines of mast cells.

Inflammation activity of PLA₂ can be attributed to a direct but not a enzymatic effect. These results confirms the evidences of independent sites for the expression of the enzymatic and pharmacological activities in this molecules. BthTX-II is a

Asp-49 PLA₂ miotoxin and have residual catalytic activity, which suggests a new way of classifying this proteins family.