

**Purificação de isoformas de fosfolipase A<sub>2</sub> a partir do veneno total de *Crotalus durissus terrificus* e estudo de seus efeitos em mitocôndrias isoladas.**



**RICHARD HEMMI VALENTE**

este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo (a) candidato (a) *Richard Hemmi Valente* e aprovada pela Comissão Julgadora.

*5/3/96*

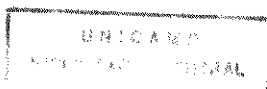
**ORIENTADOR**  
**Prof.Dr. BENEDITO DE OLIVEIRA FILHO**  
**Depto. de Bioquímica - IB**  
**UNICAMP**

**Tese apresentada ao curso de pós-graduação em Ciências Biológicas para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas, área de concentração em Bioquímica.**

**CAMPINAS - SP**

**1996**

9608046



UNIDADE	BC
N.º SIGLA	UNICAMP
V.	V234p
T.º	27697
PROB.	667/96
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	21/05/96
N.º CPJ	

CM-00088766-6

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA CENTRAL DA UNICAMP

V234p Valente, Richard Hemmi  
Purificação de isoformas de fosfolipase A<sub>2</sub> a partir do veneno total de *Crotalus durissus terrificus* e estudo de seus efeitos em mitocôndrias isoladas / Richard Hemmi Valente. -- Campinas, SP : [s.n.], 1996.

Orientador: Benedito de Oliveira Filho.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

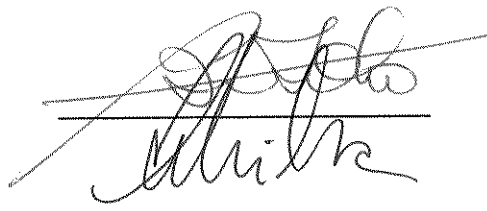
1. Fosfolipase. 2. Mitocôndria. 3. Oxigênio - Consumo.  
4. Ciclosporina A. I. Oliveira Filho, Benedito de. II.  
Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia.  
III. Título.

Campinas, 05 de Março de 1996

**BANCA EXAMINADORA**

**TITULARES:**

Prof. Dr. Benedito de Oliveira Filho (Orientador)



A handwritten signature in cursive script, appearing to read 'Benedito', is written above a horizontal line.

Profª. Dra. Lucia Pereira da Silva

Prof. Dr. José Camillo Novello



A handwritten signature in cursive script, appearing to read 'José Camillo Novello', is written above a horizontal line.

**SUPLENTE:**

Prof. Dr. Sérgio Marangoni

\_\_\_\_\_

**APROVADA**

Na presente tese, os estudos envolvendo funções mitocondriais foram desenvolvidos sob a supervisão da Profª.Dra. Denise Vaz de Macedo do Laboratório de Oxidações Biológicas, Depto. Bioquímica, IB, UNICAMP.

## AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Benedito Oliveira Filho, Professor Titular em Bioquímica do Instituto de Biologia da UNICAMP, pela orientação desta Tese, mas além de tudo pelo respeito, confiança e amizade a mim dedicados durante esses anos de convivência.

À Profa. Dra. Lúcia Pereira da Silva, Professora Titular em Bioquímica do Instituto de Biologia da UNICAMP, por todos os ensinamentos passados (os quais não foram poucos), pela agradável convivência, pelo alto sentido de ética e pela paciência para com um aluno tão insubordinado.

À Profa. Dra. Denise Vaz de Macedo, Professora Doutora do Instituto de Biologia da UNICAMP, pela atuante e eficiente orientação na área de Bioenergética, agindo sempre de maneira a me estimular à correta prática da ciência mesmo nos meus piores momentos. Além disso agradeço pela grande amizade bem como pelas “consultas terapêuticas gratuitas” sempre que precisei.

Ao Prof. Dr. José Camillo Novello, Professor Doutor do Instituto de Biologia da UNICAMP, por tudo que me ensinou em Química de Proteínas bem como pela presença conciliatória quando eu me encontrei em momentos de dificuldade. O Dr. Novello foi sem dúvida um amigo e orientador inesquecível.

Ao Prof. Dr. Sérgio Marangoni pela orientação durante minha Iniciação Científica.

Aos colegas e amigos do Departamento de Bioquímica, que direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho. Em especial à Andreia Aparecida Vigilato, secretária de Pós-Graduação do Depto. Bioquímica, pela ajuda, eficiência e paciência para comigo durante o Mestrado.

Ao SAE-UNICAMP, FAEP-UNICAMP, FAPESP e CAPES pelo apoio financeiro a este projeto durante a Iniciação Científica ou durante o Mestrado.

## ÍNDICE

RESUMO.....	01
SUMMARY.....	03
INTRODUÇÃO.....	05
MATERIAIS E MÉTODOS.....	18
RESULTADOS.....	30
DISCUSSÃO.....	49
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	55
COMUNICAÇÕES EM CONGRESSO REFERENTES A ESTE TRABALHO.....	71
AUXÍLIOS FINANCEIROS REFERENTES A ESTE TRABALHO.....	72
TRABALHOS SUBMETIDOS PARA PUBLICAÇÃO.....	73

## ÍNDICE DE FIGURAS E TABELAS

FIGURA 01.....	12
FIGURA 02.....	13
FIGURA 03.....	31
FIGURA 04.....	32
FIGURA 05.....	33
FIGURA 06.....	34
FIGURA 07.....	36
FIGURA 08.....	37
FIGURA 09.....	39
FIGURA 10.....	40
FIGURA 11.....	42
FIGURA 12.....	45
FIGURA 13.....	46
FIGURA 14.....	47
FIGURA 15.....	48
TABELA I.....	10
TABELA II.....	38
TABELA III.....	43

## ABREVIACOES

<b>ADP</b>	ADENOSINA 5' - DIFOSFATO
<b>ATP</b>	ADENOSINA 5' - TRIFOSFATO
<b>BSA</b>	SOROALBUMINA BOVINA
<b>CAT</b>	CARBOXIATRACTILATO
<b>CAPS</b>	3-CICLOHEXILAMINO-1-ÁCIDO PROPANOSULFNICO
<b>CSA</b>	CICLOSPORINA A
<b>DTT</b>	DITIOREITOL
<b>EGTA</b>	CIDO ETILENO GLICOL TETRACTICO
<b>FCCP</b>	CARBONILCIANETO-P-TRIFLUOROMETOXIFENIL HIDRAXONA
<b>HEPES</b>	CIDO 2-[4-(2-HIDROXIETIL)-PIPERAZINIL-(1)] ETANOSSULFNICO
<b>HPLC</b>	CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICINCIA
<b>MFR</b>	MITOCNDRIAS DE FÍGADO DE RATO
<b>NADH</b>	NICOTINAMIDA ADENINO NUCLEOTDEO - FORMA REDUZIDA
<b>PAGE</b>	ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA
<b>PFK</b>	FOSFOFRUTOQUINASE
<b>PLA<sub>1</sub></b>	FOSFOLIPASE A <sub>1</sub>
<b>PLA<sub>2</sub></b>	FOSFOLIPASE A <sub>2</sub>
<b>PLC</b>	FOSFOLIPASE C
<b>PLD</b>	FOSFOLIPASE D
<b>RNA</b>	ÁCIDO RIBONUCLEICO
<b>SDS</b>	DODECIL SULFATO DE SÓDIO
<b>SUC</b>	SUCCINATO
<b>TEMED</b>	N-N-N-N-TETRAMETILENODIAMINA
<b>TFA</b>	ÁCIDO TRIFLUOROACÉTICO
<b>TRIS</b>	TRIS HIDROXIMETILAMINOMETANO
<b>TWEEN 20</b>	POLIOXIETILENO SORBITANO MONOLAURATO



## ABREVIÇÕES PARA AMINOÁCIDOS

AMINOÁCIDOS	ABREVIÇÃO <sup>a</sup> (3 LETRAS)	SÍMBOLO <sup>a</sup> (1 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
NÃO IDENTIFICADO	-	X

<sup>a</sup> Segundo nomenclatura IUPAC.

## RESUMO

A crotoxina, isolada e cristalizada em 1938 por Slotta e Fraenkel-Conrat a partir do veneno total de *Crotalus durissus terrificus* mostrou ser um complexo resultante da interação quaternária de duas sub-unidades representadas por uma proteína ácida com massa molecular de 9 kDa denominada crotapotina e um componente básico, com massa molecular de 14,5 kDa que foi identificado como sendo uma fosfolipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>). Esta última é considerada o principal componente responsável pelo desencadeamento dos efeitos farmacológicos induzidos pelo complexo crotoxina. Estudos mais recentes demonstraram a ocorrência de várias isoformas de PLA<sub>2</sub>, presentes em diferentes lotes de veneno coletados de várias serpentes, sendo tais isoformas decorrentes da expressão de diferentes RNAs mensageiros.

As PLA<sub>2</sub> (EC 3.1.1.4.) são enzimas que catalisam especificamente a reação de hidrólise da ligação acil-éster na posição *sn*-2 de fosfoglicerídeos numa reação dependente de cálcio, liberando quantidades equimolares de ácidos graxos livres e lisofosfolídeos.

Já foi demonstrado que frações puras de PLA<sub>2</sub> apresentam efeitos inibitórios marcantes sobre várias funções mitocondriais, reduzindo as atividades da NADH-oxidase, das succinato e NADH-desidrogenase e da capacidade de fosforilação. Além disso, as PLA<sub>2</sub> podem modificar a microviscosidade da fase lipídica da bicamada hidrofóbica de membranas, afetando a atividade funcional de enzimas ligadas à membrana, e, através desse mecanismo, regular vários processos metabólicos.

No presente trabalho purificamos e caracterizamos, a partir da crotoxina, três isoformas de PLA<sub>2</sub> (F1, F2 e F3) com elevado grau de pureza. As isoformas apresentaram massa molecular aparente com valor igual a 15 kDa e alta homologia

sequencial dos 20 resíduos N-terminais em comparação a isoformas já descritas na literatura.

O efeito de cada isoforma de PLA<sub>2</sub> purificada sobre mitocôndrias isoladas de fígado de rato foi determinado através de consumo de oxigênio durante o estado respiratório 4 e de inchamento mitocondrial. F1 apresentou um estímulo dose-dependente do consumo de oxigênio enquanto F2 e F3 causaram estímulo apenas em baixas concentrações e inibição em quantidades maiores. Esses efeitos foram completamente abolidos quando soro albumina bovina a 0,1% ou EGTA a 0,5mM estavam presentes no meio de incubação. Usando-se o inchamento mitocondrial como um parâmetro comparativo, todas as isoformas apresentaram o mesmo comportamento com intensidades diferentes, levando à permeabilização da membrana mitocondrial. Neste caso, a adição de EGTA preveniu o inchamento enquanto a soro albumina bovina foi ineficiente, indicando que o microambiente lipídico foi realmente afetado. Esses resultados sugerem que ácidos graxos livres liberados pela ação das isoformas são diretamente responsáveis pelos efeitos observados nos experimentos de consumo de oxigênio. A proteção oferecida pela CSA contra o inchamento causado pelas isoformas, principalmente quando estas estavam presentes em baixas concentrações, sugere que a ligação da CSA a um sítio da membrana mitocondrial protege esta última contra o ataque das PLA<sub>2</sub>. Já a pequena proteção oferecida pelo CAT, bem como o prevailecimento do pequeno efeito protetor do CAT quando utilizamos simultaneamente CSA e CAT, sugerem que a ligação do CAT ao seu sítio no carreador ADP/ATP impede a proteção conferida pela CSA.

## SUMMARY

Crotoxin, isolated and cristalized in 1938 by Slotta and Fraenkel-Conrat from *Crotalus durissus terrificus* venom showed to be a complex resultant from the quaternary association between two sub-units: an acidic protein with a molecular mass of 9 kDa named crotapotin and a basic component, with a molecular mass of 14.5 kDa which was identified as a phospholipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>). This last one is considered to be the main component responsible for the pharmacological effects induced by the crotoxin complex. Recent studies have demonstrated the existence of several PLA<sub>2</sub> isoforms which were present in different venom batches collected from several snakes. These isoforms result from the expression of different messenger RNAs.

The PLA<sub>2</sub> (EC 3.1.1.4) are enzymes that specifically catalyse the hydrolysis of the acyl-ester bond at the *sn*-2 position of phosphoglycerides in a calcium dependent reaction, producing equimolar amounts of free fatty acids and lysophospholipids.

It has already been demonstrated that purified PLA<sub>2</sub> fractions show marked inhibitory effects on several mitochondrial features, decreasing NADH-oxidase, succinate and NADH-dehydrogenase activities and phosphorylation capacity. It is also known that PLA<sub>2</sub> can modify the microviscosity of the lipid phase of the hydrophobic membrane bilayer, affecting the functional activity of membrane-bound enzymes, and through this mechanism regulate various metabolic processes.

In the present work, we have purified and characterized, from crotoxin, three PLA<sub>2</sub> isoforms (F1, F2 and F3) with high degree of purity. The isoforms presented an apparent molecular mass of 15 kDa and a high degree of homology regarding the 20 N-

terminal aminoacid residues when compared to other isoforms already described in the literature.

The effect of each purified phospholipase A<sub>2</sub> isoform on isolated rat liver mitochondria was determined through mitochondrial swelling and O<sub>2</sub> consumption during respiratory state 4. F1 showed a dose-dependent stimulation of O<sub>2</sub> consumption while F2 and F3 caused stimulation only at low doses and inhibition at higher amounts. These effects were completely suppressed by the presence of 0.1% bovine serum albumin or 0.5mM EGTA in the incubation medium. Taking the mitochondrial swelling as a comparative parameter, all of them presented the same behaviour at different intensities, leading to permeabilization of the mitochondrial membrane. In this case, addition of EGTA prevented it whereas bovine serum albumin was ineffective, indicating that the lipid microenvironment was actually affected. These results suggest that free fatty acids must be directly responsible for the observed effects induced by phospholipase A<sub>2</sub> isoforms on oxygen consumption experiments. The protection conferred by cyclosporin-A on swelling induced by the isoforms, mainly when they were present in low concentrations, suggests that cyclosporin-A binding to a mitochondrial membrane site protects the membrane against the phospholipase A<sub>2</sub> attack. On the other hand, the small protection conferred by CAT, as well as the prevailment of the small protective CAT effect when we used both CSA and CAT, suggest that the CAT binding to the ADP/ATP carrier inhibits the protection conferred by CSA.

## INTRODUÇÃO

### *A serpente **Crotalus durissus terrificus***

A família das **CROTALIDAE** compreende os gêneros: *Crotalus*, *Agkistrodon*, *Bothrops*, *Lachesis*, *Sistrurus* e *Trimeresurus*. O gênero *Crotalus* inclui 27 espécies norte e centro-americanas e apenas duas sul-americanas e designa serpentes que apresentam no fim de sua cauda estrutura composta de vários anéis córneos, formados cada qual ao final de uma ecdise, engastados entre si e que ao ser agitada emite o som de um "chocalho". A provável função biológica do "chocalho" seria a de alertar, amedrontar (ou ambos) possíveis inimigos naturais. A espécie *Crotalus durissus* (LINNAEUS), 1758 apresenta além do "chocalho" escamas do corpo endurecidas e rígidas. Por fim a sub-espécie *Crotalus durissus terrificus* (LAURENTI), 1768, também conhecida como cascavél Sul Americana, recebeu tal classificação em latim pois Laurenti ao observá-la chamou-a de "a terrificante tocadora de cauda" (Bücherl, 1980). Esta serpente apresenta ampla distribuição geográfica pela América do Sul: Brasil, Venezuela, Argentina, Paraguai e Bolívia (Glenn and Straight, 1982)

## Veneno de *C.d.terrificus*

Os venenos das serpentes da família **CROTALIDAE** apresentam um grande número de proteínas farmacológica e bioquimicamente ativas (Tu, 1977a). O veneno de *C.d.terrificus* está entre os mais tóxicos do gênero *Crotalus*, apresentando valor médio de 50% da dose letal (DL<sub>50</sub> em mg/kg), através de injeção intra-peritoneal, igual a 0,22 (Glenn and Straight, 1982).

Os sinais e sintomas clássicos do envenenamento por *C.d.terrificus* são decorrentes dos efeitos neurotóxico, sistêmico miotóxico e em menor intensidade de coagulação semelhante à causada por trombina, sendo que o veneno não apresenta atividade proteolítica local (Cupo et al., 1990). No entanto, a principal e mais séria complicação decorrente do envenenamento crotálico parece ser a insuficiência renal aguda com necrose tubular (Santos dos et al., 1993 ; Amaral et al., 1986).

Vários componentes do veneno já foram purificados e dentre eles podemos citar os seguintes: a) crotoxina, principal fração do veneno, a qual é um agente bloqueador da junção neuromuscular levando à uma síndrome neurotóxica que consiste basicamente de uma paralisia flácida; b) crotamina, contida apenas no veneno de *C.d.terrificus* var. *crotaminicus*, um polipeptídeo básico indutor de contração que ocasiona uma rigidez muscular duradoura precedendo a paralisia flácida mediada pela crotoxina; c) convulxina, fração proteica que quando injetada em camundongos leva a convulsões seguidas de morte e d) giroxina, um componente proteico tóxico não-letal que age sobre o sistema nervoso central, levando à síndrome de uma lesão labiríntica (Seki et al., 1980).

## Crotoxina

A crotoxina é uma neurotoxina que exerce sua ação patofisiológica através do bloqueio da transmissão neuromuscular (Brazil, 1966), sendo seus efeitos primariamente em nível pré-sináptico, causando uma modificação trifásica da liberação de neurotransmissor dos terminais nervosos. Primeiramente ocorre uma depressão na liberação do transmissor neuromuscular seguida de uma facilitação significativa da transmissão neuromuscular culminando em um bloqueio final da transmissão (Chang and Lee, 1977 ; Chang and Su, 1982). Além dos efeitos pré-sinápticos, a crotoxina também atua de maneira pós-sináptica bloqueando a resposta à acetilcolina através de uma estabilização do receptor de acetilcolina em um estado conformacional inativo (Bon et al., 1979).

A crotoxina também possui propriedades hemolítica (Rosenfeld, 1971) bem como miotóxica quando injetada intra-muscularmente (Gopalakrishnakone et al., 1984).

A crotoxina, cristalizada e isolada em 1938 por Slotta e Fraenkel-Conrat (Hendon and Fraenkel-Conrat, 1971) a partir do veneno total de *C.d. terrificus* mostrou ser um complexo resultante da interação quaternária de duas sub-unidades representadas por uma proteína ácida com massa molecular de 9 kDa denominada crotapotina e um componente básico, com massa molecular de 14,5 kDa que foi identificado como sendo uma PLA<sub>2</sub> (Breithaupt et al., 1974). Esta última, é considerada o principal componente responsável pelo desencadeamento dos efeitos farmacológicos induzidos pelo complexo crotoxina (Hendon and Fraenkel-Conrat, 1971).

Estudos mais recentes, mostraram que a crotoxina é, na realidade, uma mistura de variantes crotoxínicas (Faure and Bon, 1987) derivadas da combinação de diferentes



isoformas de suas duas sub-unidades (Faure et al., 1994). Várias isoformas de crotapotina e de PLA<sub>2</sub>, presentes em diferentes lotes de veneno coletados de várias serpentes, já foram purificadas e algumas sequenciadas (Aird et al., 1985 ; Aird et al., 1986 ; Faure and Bon, 1988 ; Aird et al., 1990 ; Faure et al., 1991). A multiplicidade e a diversidade das isoformas de crotoxina parecem ser fruto de: a) modificações pós-traducionais que ocorrem sobre uma única forma precursora (homóloga a PLA<sub>2</sub> do grupo II - Tabela I) levando à formação das isoformas de crotapotina (Bouchier et al., 1991 ; Faure et al., 1991) e b) expressão de diferentes RNAs mensageiros (isolados a partir de apenas um espécimen) levando à formação das isoformas de PLA<sub>2</sub> (Faure et al., 1994).

Existem atualmente dois modelos para explicar a interação da crotoxina com membranas pré-sinápticas: o modelo da dissociação e o do complexo ternário transiente. No primeiro modelo, quando a crotoxina se aproxima do seu receptor na membrana celular, a crotapotina se dissocia da PLA<sub>2</sub> e esta última se liga então ao receptor. No segundo modelo, a crotoxina primeiramente se liga ao seu receptor de membrana e só então ocorre a dissociação de seus componentes com liberação da crotapotina, enquanto a PLA<sub>2</sub> permanece ligada ao receptor (Delot and Bon, 1993).

Embora a crotapotina seja considerada farmacologicamente inativa quando isolada do complexo, ela facilita a atividade da PLA<sub>2</sub> ao interagir com sítios inespecíficos para PLA<sub>2</sub> presentes nas membranas biológicas, propiciando desta forma, a interação da PLA<sub>2</sub> com os sítios específicos envolvidos nas suas atividades fisiológicas bem como farmacológicas (Bon et al., 1979). Tais sítios específicos (ou moléculas-alvo), proteicos ou glicoproteicos, estariam localizados na superfície (membrana plasmática) das células-alvo (Kini and Evans, 1989), sendo que a PLA<sub>2</sub> não seria

internalizada na célula para produzir seus efeitos tóxicos (Simpson et al., 1993). Três polipeptídeos presentes preferencialmente em membranas neuronais já foram identificados como subunidades de molécula(s)-alvo para crotoxina (Tzeng et al., 1995).

Estudos mais recentes demonstraram que a crotapotina, quando aplicada *in vivo* (através de injeção sub-plantar, intraperitoneal ou por via oral) apresenta atividade anti-inflamatória. Tal atividade não é devida à liberação de corticosteróides endógenos ou à inibição da atividade de ciclo-oxigenases. Provavelmente, a crotapotina interage com PLA<sub>2</sub> extracelulares geradas durante o processo inflamatório levando à uma redução da atividade hidrolítica destas últimas (Landucci et al., 1995).

**Tabela I - Propriedades dos diferentes grupos de PLA<sub>2</sub> (Dennis, 1994).**

Características	Grupo		
	I / II / III	IV	γ <sup>a</sup>
Localização	secretada	citossólica	citossólica
Massa molecular	~14 kDa	~85kDa	~40 kDa
Aminoácidos	~125	~750	
Cisteínas	10-14	9	
Pontes Dissulfeto	5-7	0	
Sensibilidade ao DTT	+	-	-
Preferência por ácido araquidônico	-	+	+
Requerimento de Ca <sup>2+</sup>	~mM	~μM <sup>b</sup>	nenhum
Papel do Ca <sup>2+</sup>	catálise	associação de membrana	nenhum
Proteína regulatória	-	-	PFK talvez
Cofatores regulatórios	-	-	ATP
Fosforilação regulatória	-	+	-
Atividade de liso-PLA <sub>2</sub>	-	Alta	+
Atividade de PLA <sub>1</sub>	-	+	-
Atividade de transacilase	-	+	-
Hidrolase de acil-CoA graxo	-	-	+

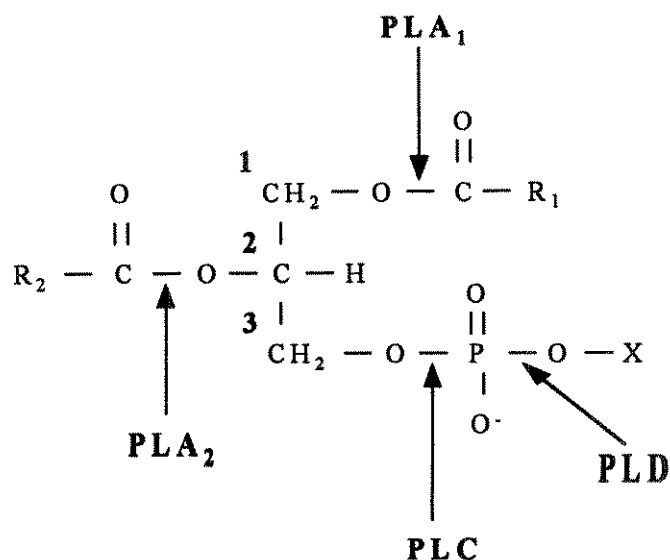
<sup>a</sup> Dados obtidos para PLA<sub>2</sub> miocárdica canina. <sup>b</sup> Outros metais e sais podem, *in vitro*, substituir o cálcio.

(-) ausente (+) presente

## Estrutura e função de fosfolipase A<sub>2</sub>

As PLA<sub>2</sub> são enzimas amplamente espalhadas na natureza, podendo ser encontradas em bactérias, plantas, tecidos de mamíferos (pulmão, fígado, baço, coração), eritrócitos, plaquetas e leucócitos polimorfonucleares (Van den Bosch, 1980). No entanto, as mais conhecidas e amplamente estudadas são aquelas encontradas nos tecidos pancreáticos de mamíferos e nos venenos de répteis e insetos (Verheij et al., 1981). Estas enzimas pertencem a uma mesma classe, dividida em 4 a 5 grupos (Tabela I), mas diferem com relação à função, localização, regulação, mecanismo, sequência de aminoácidos, estrutura e papel dos íons divalentes (Dennis, 1994). Essas enzimas apresentam alta taxa de pontes dissulfeto e são extremamente estáveis ao tratamento com calor e ácidos, apresentando homologia sequencial entre si, especialmente nas regiões do sítio ativo que liga cálcio (Chang et al., 1987).

As PLA<sub>2</sub> (EC 3.1.1.4.) catalisam especificamente a reação de hidrólise da ligação acil-éster na posição *sn*-2 de fosfoglicerídeos (Figura 1) numa reação dependente de cálcio, liberando quantidades equimolares de ácidos graxos livres e lisofosfolídeos (Mukherjee et al., 1994). As PLA<sub>2</sub> têm papel fundamental no metabolismo de lípidos e estão intimamente relacionadas com a liberação de ácido araquidônico, que é um precursor de lípidos bioativos tais como prostaglandinas, leucotrienos e tromboxanos, sendo que há evidências de que estas enzimas poderiam também atuar em respostas imunológicas, inflamação, proliferação celular, vasoconstrição e broncoconstrição (Waite, 1987 ; Chang et al., 1987 ; Bomalaski and Clark, 1993 ; Mukherjee et al., 1994 ; Hanada et al., 1995).

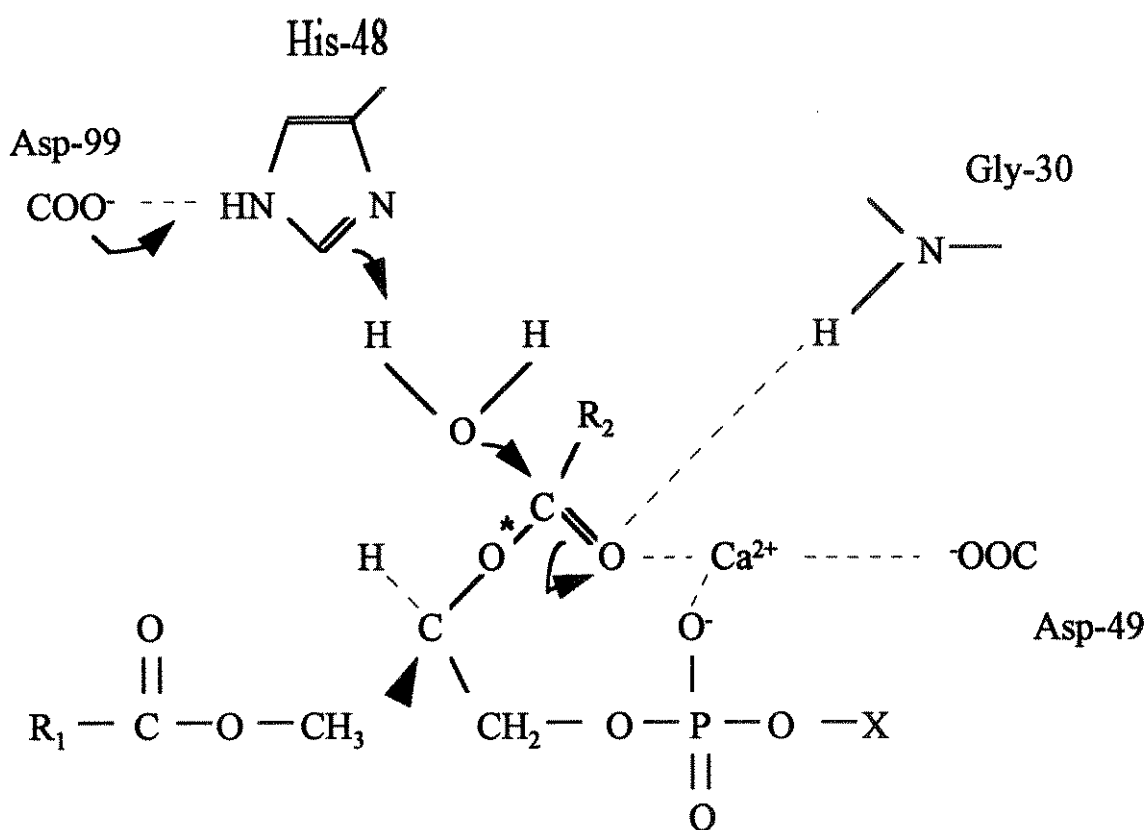


**Figura 1 - Local de hidrólise de diferentes fosfolipases em um fosfolípido (Waite, 1987).**

A unidade catalítica das PLA<sub>2</sub> é constituída pelos resíduos de aminoácido His-48 (posição 48 da cadeia polipeptídica), Asp-99 e uma molécula de água (Figura 2). No mecanismo de catálise proposto, o próton na posição 3 do anel imidazólico da His-48 está envolvido em uma forte interação com o grupo carboxilato do Asp-99, impedindo que ocorra rotação do anel imidazólico, deixando o nitrogênio da posição 1 deste anel (que está envolvido na catálise) em posição espacial apropriada. Uma molécula de água promove então o ataque nucleofílico ao carbono do grupo éster do substrato, e nesse momento o anel imidazólico da His-48 recebe um próton da molécula de água, facilitando a reação. Subsequentemente à hidrólise da ligação acil-éster na posição *sn*-2 do fosfoglicerídeo (substrato), este próton é doado pelo anel imidazólico para o

oxigênio que forma então o grupo álcool do lisofosfolípídeo a ser liberado (Verheij et al., 1980).

O sítio para a ligação de cálcio, metal importante para a catálise, apresenta o cátion ligado pelos oxigênios do grupo carbonil dos resíduos Tyr-28, Gly-30, Gly-32 e pelos oxigênios da cadeia lateral do resíduo Asp-49. No mecanismo da catálise, o cálcio tem dupla função: fixar o fosfato e estabilizar a carga negativa do oxigênio do grupo carbonil da ligação éster da posição *sn*-2 do substrato (Yang, 1994).



**Figura 2 - Representação esquemática do mecanismo catalítico proposto para as PLA<sub>2</sub> (Verheij et al, 1980). \* = ligação hidrolisada por ação da PLA<sub>2</sub>.**

No entanto, os efeitos farmacológicos observados em decorrência da ação de PLA<sub>2</sub> não são necessariamente causados apenas pela quebra de fosfolípidos de membranas biológicas. As PLA<sub>2</sub> parecem apresentar, além do sítio catalítico característico, sítio(s) farmacológico(s) distinto(s) do catalítico (Yang, 1994). Existe um modelo para explicar os efeitos farmacológicos das PLA<sub>2</sub> que distingue nesta enzima os sítios catalítico e farmacológico. O sítio farmacológico da enzima teria alta ou baixa afinidade por determinado sítio-alvo presente na membrana celular. A presença do sítio-alvo distinguiria uma célula-alvo de uma célula-não alvo. Isso determinaria se a ligação da enzima à célula seria específica (presença do sítio-alvo, alta especificidade) ou não-específica (ausência do sítio-alvo, baixa especificidade, ocorre apenas quando há excesso de enzima). Em seguida ocorreria a ação promovida pelo sítio catalítico (quebra de fosfolípidos) e, quando necessário, do(s) sítio(s) farmacológico(s) levando aos efeitos farmacológicos (Kini and Evans, 1989).

### **Atividades de venenos e PLA<sub>2</sub> sobre funções mitocondriais**

Há muito já foi demonstrado que os venenos de serpentes inibem a atividade de um determinado número de desidrogenases e oxidases. A succinato-citocromo c-redutase e a citocromo c-oxidase de coração de rato foram inibidas pelo veneno de *Naja naja atra* (Huang, 1954 ; Lin and Chang, 1957), que também causou inibição na NADH-citocromo c-redutase de músculo peitoral de pombo e de rim de coelho (Lee, 1954).

Muitos estudos sobre o efeito da PLA<sub>2</sub> na morfologia mitocondrial e nos sistemas de transporte de elétrons foram feitos com o veneno total de diversas espécies

de serpentes. Os investigadores que assim o fizeram, atribuíram os efeitos obtidos por esses venenos à ação direta de um componente com atividade fosfolipásica. Entretanto, os resultados obtidos não foram suficientes para comprovar a veracidade dessa afirmação, já que as frações purificadas a partir do veneno total, dentre elas a PLA<sub>2</sub>, não foram testadas (Tu, 1977b).

Em 1954 foram obtidas micrografias eletrônicas que sugeriam que mudanças morfológicas nas mitocôndrias eram causadas pela crotoxina, a principal fração do veneno total de *C. d. terrificus* (Nygaard et al., 1954). Outros pesquisadores também chegaram à mesma conclusão como resultado decorrente do estudo das mudanças na absorvância de suspensões mitocondriais medida a 520nm, indicativas de inchamento mitocondrial ou por cromatografia de camada delgada do sobrenadante resultante da centrifugação de mitocôndrias tratadas com o veneno (Condrea et al., 1965).

Em 1970, com o isolamento de uma PLA<sub>2</sub> do veneno de *Agkistrodon piscivorus* (Augustyn and Elliott, 1970) foi finalmente demonstrado, através de medidas do consumo de oxigênio, que uma PLA<sub>2</sub> alterava a respiração mitocondrial e a fosforilação oxidativa de maneira idêntica à que fazia o veneno total, sendo este efeito dose-dependente. Em baixas concentrações, aumentava a velocidade da respiração mitocondrial; em altas concentrações causava inibição severa no transporte de elétrons e, em concentrações intermediárias, e na presença de ADP, também induzia uma inibição da respiração (Augustyn et al., 1970).

Mitocôndrias, isoladas de tecido cerebral, incubadas com β-bungarotoxina (neurotoxina purificada do veneno de *Bungarus multicinctus* que apresenta atividade fosfolipásica) ou com PLA<sub>2</sub> isolada do veneno de *Vipera russeli* exibiram desacoplamento da fosforilação oxidativa, sendo que quando o meio de reação



apresentava BSA, um quelante de ácidos graxos (Bjorntorp et al., 1964), ocorria uma proteção contra esse efeito desacoplador, sugerindo que os ácidos graxos liberados pelo efeito dessas toxinas é que promoveriam o desacoplamento (Howard, 1975).

Outros autores (Nicholls et al., 1985) demonstraram que a  $\beta$ -bungarotoxina bem como uma PLA<sub>2</sub> isolada do veneno de abelha, agindo em membranas plasmáticas de sinaptossomos intactos, liberavam ácidos graxos que por sua vez difundiam-se para o citossol e interagiam com a membrana interna mitocondrial levando a um efeito desacoplador.

A PLA<sub>2</sub> purificada a partir do veneno de *Naja naja oxiana* causou desacoplamento da fosforilação oxidativa bem como inibição da cadeia do transporte de elétrons (com exceção do Complexo I) em mitocôndrias isoladas de fígado de rato. Neste caso, os autores sugeriram que o ataque da PLA<sub>2</sub> sobre fosfolípidos de membrana próximos a diferentes fragmentos (proteínas ou parte delas) da cadeia respiratória levaria aos efeitos inibitórios sobre esta última (Khole and Khole, 1985).

Em esquilos da espécie *Citellus undulatus* (animais que hibernam) observou-se que quando em hibernação, estes animais apresentavam taxa de respiração mitocondrial bem menor do que quando em atividade. Constatou-se também que a atividade da PLA<sub>2</sub> endógena das mitocôndrias hepáticas era bem menor nos animais hibernantes do que nos animais em atividade, e que a adição de íons Ca<sup>2+</sup> eliminava a inibição da respiração completamente. Além disso, a adição de BSA previnía a ativação da respiração provocada por Ca<sup>2+</sup> sugerindo que os responsáveis pela estimulação da respiração mitocondrial eram os ácidos graxos liberados em decorrência da ação enzimática da PLA<sub>2</sub> endógena sobre os fosfolípidos da membrana mitocondrial (Brustovetsky et al., 1989).

Sabe-se também, que as PLA<sub>2</sub> de membrana parecem estar relacionadas com o processo de senescência em plantas, através da liberação de ácidos graxos insaturados, os quais seriam substratos para lipoxigenases levando à geração de radicais livres que promoveriam a degradação lipoperoxidativa de membranas (Braidot et al., 1993).

No presente trabalho isolamos, a partir do veneno total de *Crotalus durissus terrificus*, diferentes isoformas de PLA<sub>2</sub>. Tais isoformas foram caracterizadas fisico-quimicamente e cada isoforma então, utilizada em estudos de respiração mitocondrial através da medida do consumo de oxigênio em diferentes condições experimentais, bem como em estudos de integridade da membrana interna mitocondrial através da determinação do inchamento mitocondrial. Entendemos que o presente trabalho contribui para o entendimento do mecanismo de ação da PLA<sub>2</sub> sobre a membrana interna mitocondrial.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### Materiais

O veneno bruto de *Crotalus durissus terrificus* foi obtido do Instituto Butantan (São Paulo, Brasil). Todos os solventes foram de grau HPLC e foram obtidos da Applied Biosystems (Foster City, EUA) ou da Aldrich Chemicals (Milwaukee, EUA). Os reagentes para eletroforese foram comprados da Bio-Rad (Richmond, EUA) ou da Sigma Chemical (St. Louis, EUA). Os marcadores de peso molecular foram comprados da Pharmacia Fine Chemicals (Uppsala, Suécia). CAPS, Tween 20, p-nitrofenil fosfato, amido black, membrana de nitrocelulose 0,42µm, rotenona, Hepes, EGTA e BSA foram comprados da Sigma. Sacarose foi comprada da Merck (Darmstadt, Alemanha). A CSA foi gentilmente cedida pela Sandoz do Brasil. Todos os outros reagentes eram produtos de grau P.A.

### Animais utilizados

Os animais utilizados neste trabalho foram mantidos e manipulados de acordo com os princípios éticos na experimentação animal do COBEA - Colégio Brasileiro de Experimentação Animal.

### Cromatografia de exclusão molecular

Procedemos à metodologia já descrita (Landucci et al., 1994), sendo a crotóxina purificada obtida a partir de 100mg de veneno bruto de *Crotalus durissus terrificus* dissolvidos em 2mL de tampão Bicarbonato de amônio 0,1M pH 8,0, e clarificados por

centrifugação a 500g por 15min. a temperatura ambiente. O sobrenadante foi aplicado em uma coluna de vidro (1,6x100cm), empacotada com resina Sephadex G-75 (Pharmacia), previamente equilibrada em tampão Bicarbonato de amônio 0,1M pH 8,0, sendo que a eluição se deu com fluxo constante de 9mL/h no mesmo tampão a 4°C.

As frações resultantes (3mL) foram coletadas em coletor de frações modelo VL (Gilson, Middleton, EUA). Os picos foram selecionados e identificados por leitura da absorbância em espectrofotômetro UV-1201 (Shimadzu Corp., Tokyo, Japão) a 280nm. Para os tubos com leitura de absorbância superior a 2,0 foi feita uma diluição 1/10 de maneira a se poder representar graficamente os pontos acima de 2,0 no eixo das ordenadas.

#### **Determinação da concentração de proteínas**

A dosagem de proteínas foi feita utilizando-se o método já descrito na literatura (Lowry et al, 1951).

#### **Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)**

Utilizamos para o fracionamento da crotoxina (purificada por cromatografia de exclusão molecular) bem como para recromatografia das isoformas de PLA<sub>2</sub> obtidas, um cromatógrafo 991/PDA (Waters, Milford, EUA), equipado com duas bombas modelo 510 (Waters). As amostras foram aplicadas em uma coluna de fase reversa C<sub>18</sub> / $\mu$ Bondapak (0,78x30cm)(Waters), equilibrada em TFA 0,1% pH 2,5 (solvente A ou inicial), utilizando-se um injetor automático UGK (Waters). A cromatografia de fase reversa foi feita utilizando-se um gradiente linear (0-100%) de acetonitrilo 66% em

ácido trifluoroacético 0,1% pH 2,5 (solvente B), em fluxo de 2,0mL/min. A eluição das amostras foi monitorada a 280nm.

### **PAGE em condições desnaturantes**

A eletroforese em gel de poliacrilamida foi realizada seguindo-se metodologia já descrita (Laemmli, 1970).

As placas de poliacrilamida foram feitas de modo descontínuo, apresentando gel de concentração de 5% e gel de corrida de 15% ou um gradiente de concentração de 10 a 20%. As placas foram preparadas utilizando-se uma solução de acrilamida estoque a 30% e N-N-metileno-bisacrilamida a 0,8%, ambas dissolvidas em água deionizada pelo sistema Milli-Q (Millipore Corp., Bedford, EUA) filtradas em papel de filtro (Whatman nº1) e mantidas a 4°C em um frasco ambar. O gel de concentração a 5% foi preparado utilizando-se o tampão Tris-HCl 0,125M, pH 6,8 e o gel de corrida foi feito utilizando-se tampão Tris-HCl 0,3M, pH 8,8. Em ambos os géis foram colocados 0,1%(p/v) de SDS e procedeu-se à polimerização com 0,1%(v/v) de TEMED e 0,01%(v/v) de Persulfato de amônio.

A eletroforese PAGE-SDS foi realizada em um sistema duplo de placas SE 250 Mighty Small II (Hoefer Scientific Instruments, San Francisco, EUA) ou em sistema de eletroforese Mini Protean II (Bio-Rad).

As amostras e os marcadores de peso molecular foram dissolvidos em tampão Tris-HCl 0,08M, pH 6,8 contendo 2%(v/v) de SDS, 10%(v/v) de glicerol e  $10^{-4}$  %(v/v) de azul de bromofenol e, reduzidos com DTT, cuja concentração final foi 0,1M. A eletroforese foi realizada em tampão de corrida (Tris-HCl 0,025M, pH 8,3 contendo glicina 0,192M e 0,1%(m/v) de SDS) a 100 volts constantes.

O gel foi retirado do sistema de placas e corado com solução de Coomassie Blue 0,05%(m/v) em ácido acético, metanol e água na proporção de 1:4:5 (v/v) por 12 horas a temperatura ambiente. Em seguida, foi descorado em solução de ácido acético, metanol e água na proporção de 1:4:5(v/v). Após ter sido descorado, o gel foi imediatamente fotografado e posteriormente seco em secador de géis Drygel Jr modelo SE540 (Hoefler Scientific Instruments).

#### **PAGE em condições não-desnaturantes**

Procedeu-se basicamente à mesma metodologia descrita no ítem anterior mas sem o uso de SDS nem DTT sendo que a coloração foi feita através de impregnação por prata (Merril et al, 1984).

#### **PAGE em condições não desnaturantes para proteínas básicas**

Foram utilizados géis de corrida de poliacrilamida a 10%(m/v) preparados em tampão ácido acético-KOH pH 4,3, segundo metodologia já descrita (Reisfeld et al., 1962). A eletroforese foi realizada em tampão  $\beta$ -alanina-ácido acético 0,03M pH 4,5. As amostras foram dissolvidas no tampão do eletrodo com glicerol a 50%(v/v) e a corrida feita em sistema Mini Protean II. O gel foi corado com solução de Coomassie Blue 0,05%(m/v) em ácido acético, metanol e água na proporção de 1:4:5 (v/v) por 12 horas a temperatura ambiente. Em seguida, foi descorado em solução de ácido acético, metanol e água na proporção de 1:4:5(v/v).

## Degradação automática de Edman

O sequenciador automático de proteínas e peptídeos usa a técnica de degradação de Edman (Edman and 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) com "polibrene", a proteína é hidrofobicamente ligada a este suporte e em seguida colocada 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 aminoácido-ATZ é automaticamente transferido para uma segunda câmara de reação, onde ocorre a conversão para um derivado mais estável, na forma de feniltiohidantoina do correspondente aminoácido (PTH). O aminoácido-PTH é transferido para um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência onde a identificação é realizada em comparação à cromatografia de um padrão de aminoácidos-PTH. O sequenciador utilizado foi o modelo 477A (Applied Biosystems), e, para identificação dos aminoácidos-PTH, um sistema HPLC modelo 120A (Applied Biosystems).

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

Aplicou-se sempre 1,3 nmol de cada amostra por sequência. Para a obtenção de sequências homólogas àquelas por nós sequenciadas, recorreu-se a bancos de dados de proteínas utilizando-se o serviço de rede BLAST (Altschul et al, 1990), sendo os serviços de cálculo computacional prestados pelo NCBI (National Center for Biotechnology Information, Bethesda, USA).

### **Imunização de animais**

Os coelhos foram inoculados com a fração crotoxina, purificada a partir do veneno total de *Crotalus durissus terrificus*, diluída em salina fisiológica e emulsificada em adjuvante completo de Freund (Freund, 1965) na concentração de 250µg por animal.

O esquema de imunização utilizado foi modificado a partir daquele descrito previamente (Oliveira et al., 1970). A primeira inoculação foi realizada com antígeno (250µg de proteína/animal), emulsificado em adjuvante completo de Freund, injetado via intramuscular nas 2 coxas traseiras.

Na segunda inoculação, realizada 15 dias após a primeira, injetou-se antígeno (250µg de proteína/animal) em adjuvante completo de Freund via intramuscular em cada uma das 2 coxas do animal.

Na terceira inoculação (4 semanas após a primeira), administrou-se o antígeno em salina fisiológica ("booster" - 250µg/animal). O material foi injetado via intradérmica em quatro pontos, previamente depilados com o auxílio de uma gilete, localizados no dorso do animal. As injeções intradérmicas foram repetidas de 7 em 7 dias até a obtenção de reação local do tipo Arthus (Roitt et al, 1987).



Foram executadas sangrias a partir de cortes de bordo externo de uma das orelhas do animal. O sangue coletado foi mantido a 37°C em banho-maria por aproximadamente 30min., sendo em seguida centrifugado em uma centrífuga mod. 204-NR (Fanem, São Paulo, Brasil) a 6000rpm durante 20min. Os soros foram coletados com o auxílio de uma pipeta Pasteur, distribuídos em alíquotas de 1mL e mantidos a -20°C.

### **Enzyme-linked immunoassay (ELISA)**

Seguindo metodologia já descrita, (Rostagno et al., 1991), foram adicionados 2µg/poço de fração crotoxina purificada a partir do veneno total de *C.d. terrificus* em uma microplaca de poliestireno (Nunc, Roskilde, Dinamarca), dissolvidos em tampão NaHCO<sub>3</sub> 0,1M pH 9,6, incubando-se por 12 horas a 4°C. Após a incubação, a placa foi lavada duas vezes com TBS (Tris-HCl 10mM pH 7,0; NaCl 150mM e Azida Sódica 0,02%) e o bloqueio feito através da adição de 200µL/poço de TBS contendo 1% de BSA sendo então incubada durante 1 hora a temperatura ambiente.

O anti-soro contra crotoxina (primeira sangria após a terceira inoculação) foi diluído em TBS contendo 0,05% de Tween 20 nas seguintes diluições: 1/20, 1/40, 1/80, 1/160, 1/320, 1/640, 1/1280, 1/2560, 1/5120, 1/10240. De cada diluição foram adicionados 50µL/poço e incubou-se durante 2 horas a temperatura ambiente. Após este procedimento a placa foi lavada 3 vezes com TBS contendo 0,05% de Tween 20 .

Foram então adicionados 50µL/poço de uma solução IgG anti-coelho conjugada à fosfatase alcalina (Bio-Rad), diluída em TBS (1/3000), incubando-se durante 1 hora a

temperatura ambiente. A placa foi então lavada 3 vezes com TBS contendo 0,05% de Tween 20.

Após esta etapa, a placa foi revelada com a adição de 50µL/poço de p-nitrofenilfosfato(5mg em 5mL de dietanolamina a 10% em MgCl<sub>2</sub> 0,5M), incubando-se durante 1 hora a temperatura ambiente.

A reação foi interrompida, adicionando-se 100µL/poço de NaOH 0,4M, e a intensidade de cor quantificada em um Multiscan (Labsystems, Helsinke, Finlândia) a 405nm.

### **"Immunoblotting"**

A técnica de "blotting" permite que proteínas, separadas em gel de poliacrilamida, possam ser transferidas e imobilizadas em membranas de difluoreto de polivinildileno bem como em membranas de nitrocelulose. As bandas, transferidas, são passíveis de análise por autoradiografia, imunodeteção e de eluição para análise de aminoácidos ou sequência de cadeia polipeptídica (Matsudaira, 1987 ; Gershoni and Palade, 1983).

O tampão de transferência (tampão CAPS) foi preparado com 22,13g de CAPS em 900mL de água, sendo titulado a pH 11 com NaOH 2N e completado até 1L com metanol. A membrana de nitrocelulose e o gel de poliacrilamida foram colocados para equilibrar com tampão CAPS por 5 min. O gel foi colocado sobre a membrana em suporte especial e a transferência realizada a 400mA por 50 minutos em sistema refrigerado da série TE (Hoefer Scientific Instruments) a -7°C. Ao terminar a transferência, a membrana foi corada com amido black (amido black 0,1%, metanol 40%

e ácido acético 5%), sendo a canaleta correspondente aos marcadores recortada e guardada.

O resto da membrana foi incubado com leite desnatado a 5% (bloqueando-se desta maneira receptores inespecíficos), agitando por 40min. e em repouso por 80min., tudo a temperatura ambiente. Procedeu-se à lavagem com TBS (Tris 20mM e NaCl 150mM pH 8,0) seguida da adição de TBST (TBS + Tween 20 0,05%) + anti-soro anti-crotoxina 1:200. Agitou-se por 30min. e deixou-se por 12 horas a 4°C.

No dia seguinte, lavou-se a membrana 3 vezes (10min. em agitação por vez) com TBST e adicionou-se uma solução de TBST contendo soro anti-IgG de rato conjugado à peroxidase (Boehringer Mannheim Biochemicals, Mannheim, Alemanha) 1:2000, deixando-se 30min. em agitação e 90min. em repouso, tudo a temperatura ambiente. Lavou-se então a membrana 3 vezes (10min. em agitação por vez) com TBST, sendo então adicionada a solução de revelação(diaminobenzidina 0,3% em Tris-HCl 50mM pH 7,5) seguida de 20µL de água oxigenada comercial. Estando as bandas reveladas, lavou-se com água destilada para interromper a reação, fotografou-se, secou-se (entre 2 folhas de papel de filtro) e guardou-se a membrana a temperatura ambiente.

### **Isolamento de mitocôndrias hepáticas (MFR)**

As mitocôndrias hepáticas foram isoladas por centrifugação fracionada seguindo metodologia já descrita (Schneider and Hogeboom, 1950), a partir do fígado de ratos Wistar, fêmeas, pesando entre 180-250g, mantidos em jejum por 12 horas e sacrificados por concussão cerebral.

O fígado, retirado imediatamente após a morte do animal, foi lavado em solução de sacarose 250mM contendo EGTA 1,0mM tamponada com HEPES 2,0mM pH 7,2,

picado finamente com tesoura e homogeneizado com homogeneizador Potter-Elvehjem(Thomas Scientific, Swedesboro, EUA). Este material passou então por uma primeira centrifugação a 1940g por 10min. Os sobrenadantes foram combinados e centrifugados a 12100g por 10min. A fase lipídica superior foi retirada com uma pipeta Pasteur, o sobrenadante descartado e o sedimento ressuspense em uma solução de sacarose 250mM contendo EGTA 0,3mM tamponada com Hepes 1,0mM e novamente centrifugado a 12100g por 10min. O sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspense em solução de sacarose 250mM (sem EGTA), obtendo-se uma suspensão mitocondrial com concentração aproximada de 100mg de proteína/mL, determinada pelo método do biureto modificado pela adição de colato (Gornal et al., 1949). Todo o processo foi realizado a uma temperatura entre 0 e 4°C.

#### **Determinação do consumo de oxigênio**

A respiração mitocondrial foi medida através do consumo de oxigênio, determinado polarograficamente com eletrodo específico tipo Clark (Yellow Springs Instruments Co., Ohio, EUA), a 30°C. O meio básico continha sacarose 125mM, KCl 65mM, Hepes 10mM pH 7,2,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  e rotenona 4 $\mu\text{M}$ . As MFR isoladas (1mg/mL) foram preincubadas por 3 min. neste meio básico contendo diferentes quantidades (1,0 ; 3,0 ; 6,5 e 12,0 $\mu\text{g}$ ) de fração fosfolipásica (F1, F2 ou F3) por mg de proteína mitocondrial antes da adição de succinato (SUC) 5mM. Os resultados foram representados como a média de pelo menos três repetições por experimento.

A qualidade da preparação mitocondrial foi deduzida em função dos valores do controle respiratório definido como a razão entre a velocidade de respiração obtida após

a adição de ADP (estado respiratório 3) e a velocidade de respiração de repouso subsequente ao término da fosforilação do ADP (estado respiratório 4) (Chance and Williams, 1956). A suspensão mitocondrial foi considerada viável para uso quando esta razão foi igual ou superior a 5,0.

### **Determinação da variação do volume mitocondrial ("Swelling")**

Suspensões mitocondriais são turvas e espalham a luz incidente. A luz espalhada é uma função da diferença no índice de refração entre o conteúdo da matriz e o meio, e qualquer processo que diminua esta diferença irá diminuir a luz espalhada. Um aumento no volume da matriz mitocondrial associado com a entrada de solutos permeáveis resulta numa aproximação entre o índice de refração da matriz e do meio, com consequente diminuição do espalhamento de luz (Nicholls, 1982). Esta propriedade das mitocôndrias "in vitro" fornece um método qualitativo e quantitativo simples para se estudar fluxos de solutos através da membrana mitocondrial interna. As mitocôndrias se prestam bem para a aplicação desta técnica porque sua matriz pode sofrer grandes mudanças de volume, já que a membrana interna sofre apenas desdobramento de seus pregueamentos (Beavis et al., 1985 ; Garlid and Beavis, 1985). O acompanhamento deste processo pode ser feito tanto em função da diminuição da luz absorvida em um espectrofotômetro normal, como, de forma mais sensível, usando-se um fluorímetro ajustado para medir a luz espalhada pela suspensão, diretamente num ângulo de 90 graus entre a incidência do feixe de luz e a célula fotoelétrica (Packer, 1967). Esta técnica tem sido bastante usada porque é um método simples, bastante sensível, rápido e que fornece um registro contínuo da cinética do inchamento (Beavis et al., 1985).

Em nossos experimentos usamos um espectrofotômetro DU 640 (Beckman Instruments, Fullerton, EUA) ajustado para leitura em comprimento de onda de 520nm conforme já descrito (Hunter and Haworth, 1979).

As MFR (0,5mg/mL) foram incubadas por 3 min. em meio básico (descrito acima) contendo diferentes quantidades (1,5 ; 3,0 ; 6,0 e 12,0  $\mu\text{g}$ ) de fração fosfolipásica (F1, F2 ou F3) por mg de proteína mitocondrial. Nos experimentos em que se utilizou CSA 1 $\mu\text{M}$  e/ou CAT 1 $\mu\text{M}$ , o tempo de preincubação foi de 1 min. e apenas duas quantidades de cada fração fosfolipásica foram utilizadas: 1,5 e 6,0  $\mu\text{g}/\text{mg}$  de proteína mitocondrial.

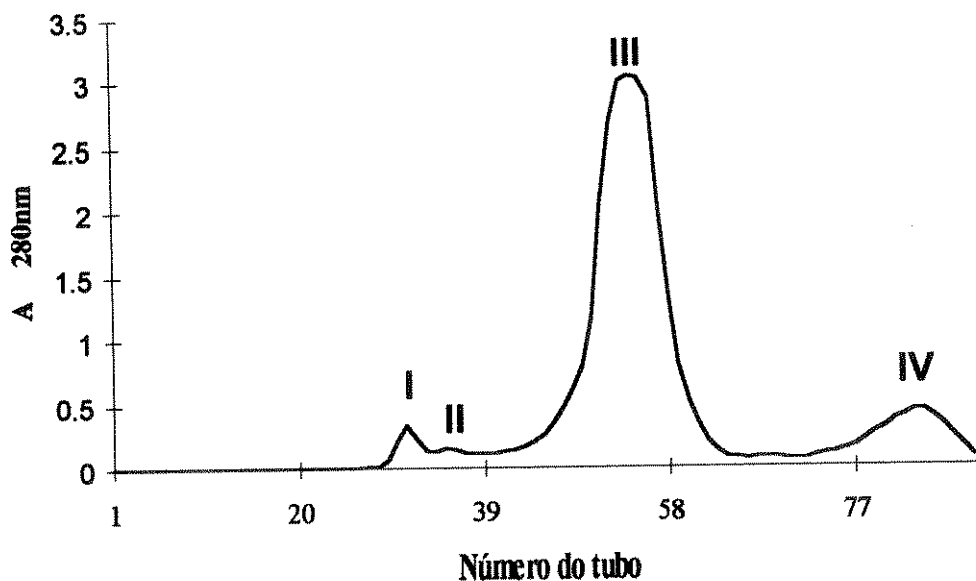
## RESULTADOS

### **Cromatografia de exclusão molecular**

A Figura 3 mostra o fracionamento do veneno total de *Crotalus durissus terrificus* por cromatografia de exclusão molecular. O perfil do cromatograma obtido foi compatível com resultados já publicados (Landucci et al., 1994), tendo sido obtidas 4 frações proteicas (I, II, III e IV). A fração III representa a fração crotoxina tendo sido coletada e liofilizada. As outras frações obtidas foram coletadas, liofilizadas e guardadas. Quando injetada em camundongos, a fração III provocou paralisia flácida do diafragma dos animais, levando-os à morte, sendo tal efeito farmacológico, característico da crotoxina (Brazil, 1966).

### **Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)**

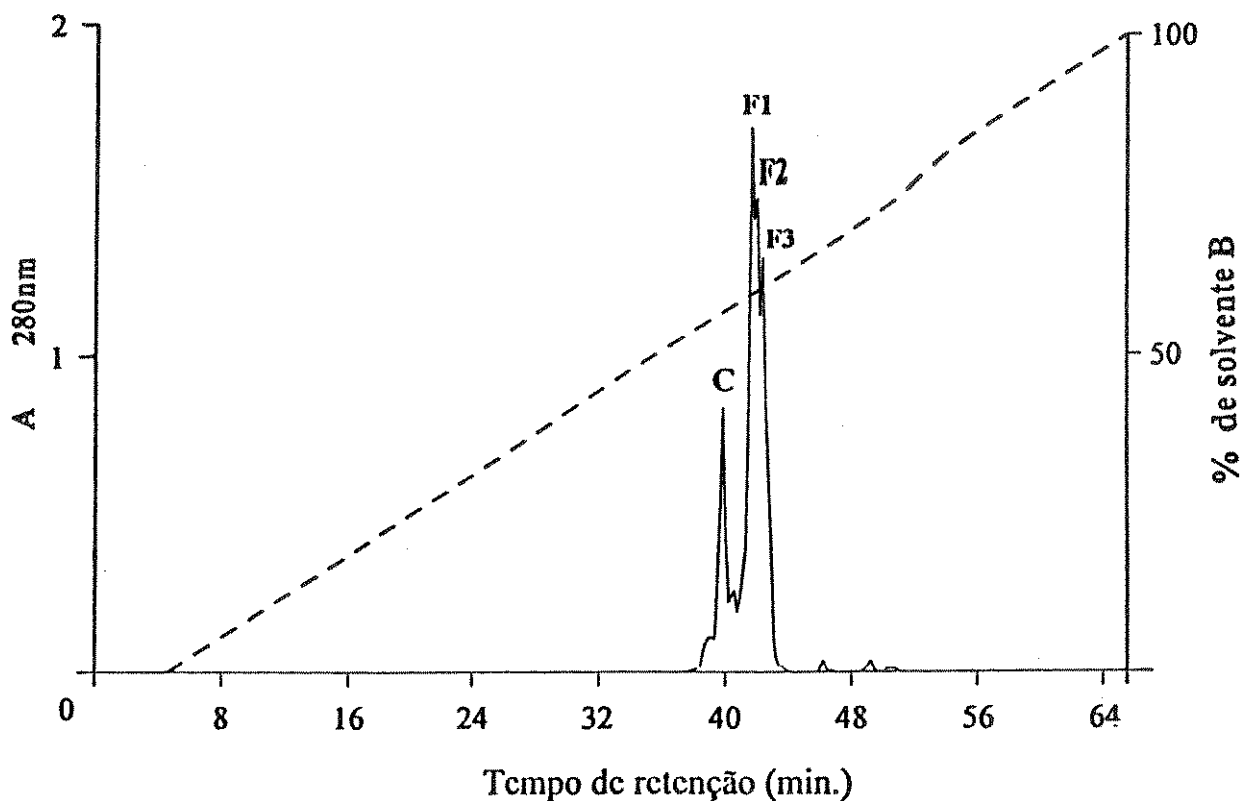
A fração III (crotoxina), obtida por cromatografia de exclusão molecular, foi fracionada por HPLC sendo obtidas então 4 frações proteicas: C, F1, F2 e F3 conforme mostra a Figura 4. A fração C foi eluída em 56% de solvente B e foi identificada como sendo a crotapotina através de testes farmacológicos (Landucci, 1992 ; Landucci et al., 1994). As frações F1, F2 e F3 foram eluídas em 59, 59,5 e 60,3% de solvente B respectivamente e correspondem a fosfolipases.



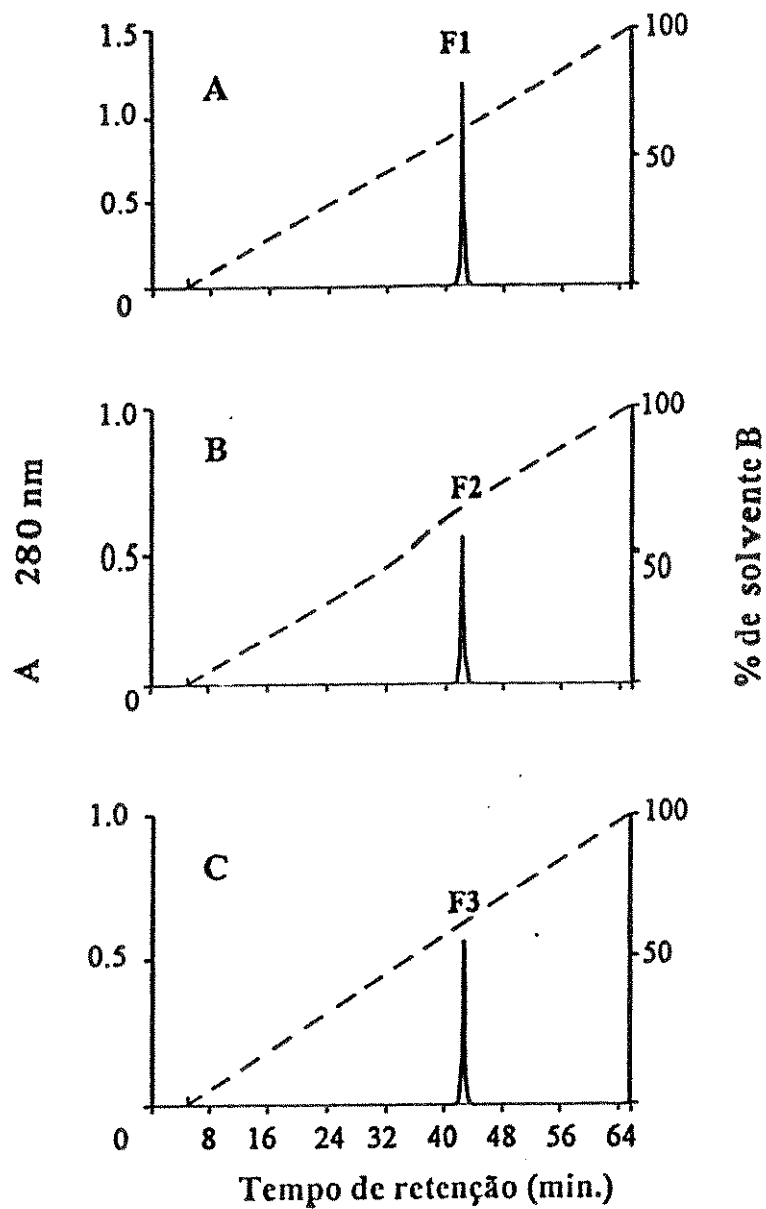
**Figura 3 - Perfil cromatográfico do fracionamento do veneno total de *C.d. terrificus* (100mg) em coluna (1,6x100cm) empacotada com resina Sephadex G-75 equilibrada em tampão Bicarbonato de amônio 0,1M pH 8,0. Fluxo: 9mL/h no mesmo tampão. A fração III corresponde à crotoxina.**

As frações F1, F2 e F3 foram recromatografadas, nas mesmas condições descritas para a Figura 4, para evitar contaminação cruzada, obtendo-se as três frações com elevado grau de pureza como mostra a Figura 5.





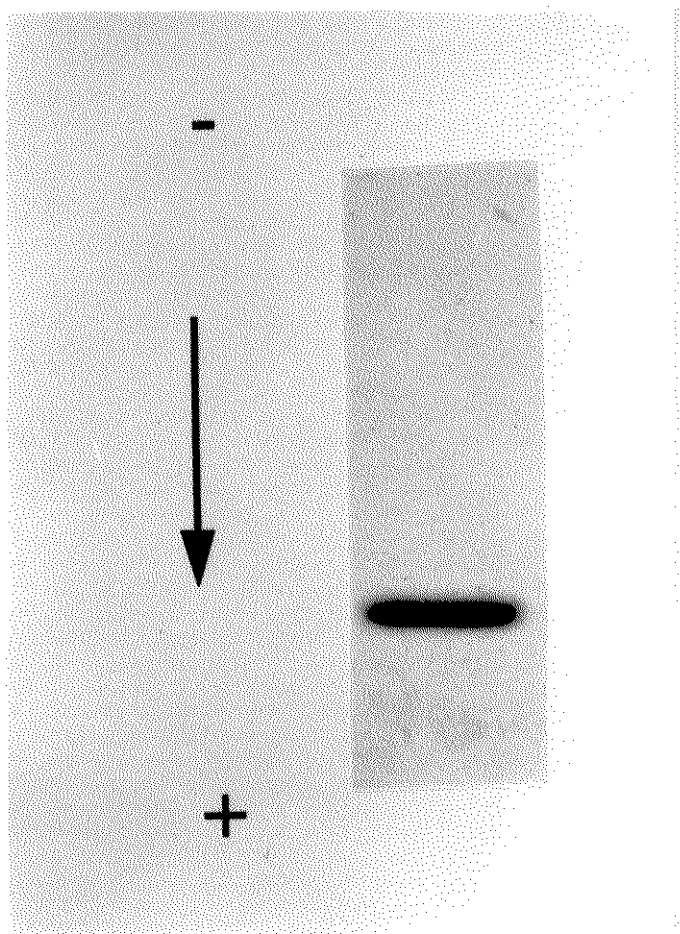
**Figura 4 - Cromatografia em fase reversa da crotoxina usando coluna  $\mu$ Bondapak C<sub>18</sub> (0,78x30cm). Gradiente linear contínuo até 100% de solvente B. Solvente A ou inicial: TFA 0,1%, Solvente B: acetonitrilo 66% em TFA 0,1%. Fluxo:2,0mL/min. C=Crotapotina ; F1,F2 e F3 = Frações de PLA<sub>2</sub>.**



**Figura 5 - Recromatografia em fase reversa de A) F1, B) F2 e C) F3 usando coluna  $\mu$ Bondapak C<sub>18</sub> (0,78x30cm). Gradiente linear contínuo até 100% de solvente B. Solvente A: TFA 0,1%, Solvente B: acetonitrilo 66% em TFA 0,1%. Fluxo:2,0mL/min. F1,F2 e F3 = Frações de PLA<sub>2</sub>.**

## PAGE em condições não-desnaturantes

A crotapotina (fração C - Figura 4) foi submetida a uma eletroforese em condições não-desnaturantes (sem SDS nem DTT) para proteínas ácidas. Foi obtida uma única banda como mostra a Figura 6.



**Figura 6 - PAGE a 15% em condições não-desnaturantes. Perfil da mobilidade eletroforética da crotapotina. Foram aplicados 15 $\mu$ g de proteína no poço. Coloração por nitrato de prata.**

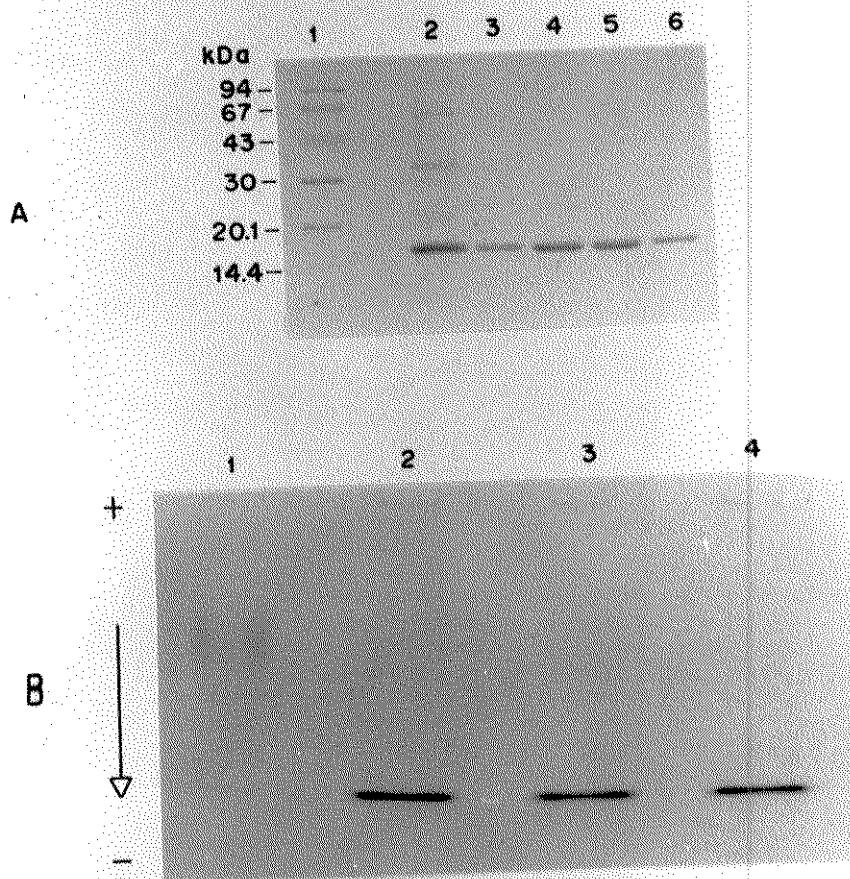
## **PAGE em condições desnaturantes e PAGE em condições não desnaturantes para proteínas básicas**

O veneno total, a fração III do cromatograma mostrado na Figura 3 correspondente à crotoxina e as frações de PLA<sub>2</sub>, F1, F2 e F3 descritas na Figura 4, foram submetidos a uma PAGE em condições desnaturantes (Figura 7A). As frações F1, F2 e F3 apresentaram mesma massa molecular calculada aparente de 15 kDa. Na Figura 7B, pudemos comprovar que além de apresentarem uma massa molecular semelhante, as frações F1, F2 e F3 também apresentaram mobilidade eletroforética similar podendo se inferir então que apresentem cargas líquidas muito parecidas.

### **Degradação automática de Edman**

Alíquotas de 1,3 nmoles de F1, F2 e F3 nativas foram aplicadas, separadamente, em um sequenciador automático de proteínas onde determinou-se a presença de um único resíduo de aminoácido na posição 1 da cadeia polipeptídica de cada fração proteica. Não foram detectados aminoácidos PTH diferentes dos resíduos de sequência nos dois primeiros ciclos.

A estrutura primária da região N-terminal foi realizada para os 20 primeiros resíduos de aminoácidos, estando os resultados obtidos apresentados na Figura 8, juntamente com outras sequências descritas na literatura.



**Figura 7**

**A) PAGE a 15% em condições desnaturantes (SDS a 2%, DTT 0,1M). (1) Marcadores de peso molecular: fosforilase b (94kDa), BSA (67 kDa), ovoalbumina (43kDa), anidrase carbônica (30kDa), inibidor de tripsina de soja (20,1kDa) e  $\alpha$ -lactoalbumina (14,4kDa); (2) Veneno total de *C.d. terrificus*; (3) Crotoxina (C+F1+F2+F3); (4) F1; (5) F2 e (6) F3. Foram aplicados 10 $\mu$ g de proteína por poço. Coloração por Coomassie Blue.**

**B) PAGE a 10% em condições não-desnaturantes para proteínas básicas. (1) Crotoxina; (2) F1; (3) F2 e (4) F3. Foram aplicados 10 $\mu$ g de proteína por poço. Coloração por Coomassie Blue.**

	1	5	10	15	20															
<b>F1</b>	H	L	X	Q	F	N	K	M	I	K	F	E	T	R	K	N	A	V	P	F
<b>F2</b>	S	-	L	X	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	X	-	-
<b>F3</b>	H	-	-	Q	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	I	-
<b>CB</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>CB1</b>	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
<b>CB2</b>	S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	V	-

**Figura 8 - Comparação da sequência N-terminal para os 20 primeiros resíduos de aminoácidos de F1, F2 e F3 do veneno de *C.d.terrificus* com sequências de PLA<sub>2</sub> descritas na literatura. F1 (Fração 1 de PLA<sub>2</sub>) ; F2 (Fração 2 de PLA<sub>2</sub>) ; F3 (Fração 3 de PLA<sub>2</sub>) ; CB (componente básico da crotoxina)(Aird et al., 1986) ; CB1 e CB2 (sequência de aminoácidos de isoformas de PLA<sub>2</sub> deduzidas a partir dos cDNA CB1 e cDNA CB2 respectivamente (Bouchier et al., 1991). Traços (-) indicam que o resíduo de aminoácido é idêntico àquele imediatamente acima. A letra X indica que o resíduo de aminoácido para esta posição não foi identificado.**

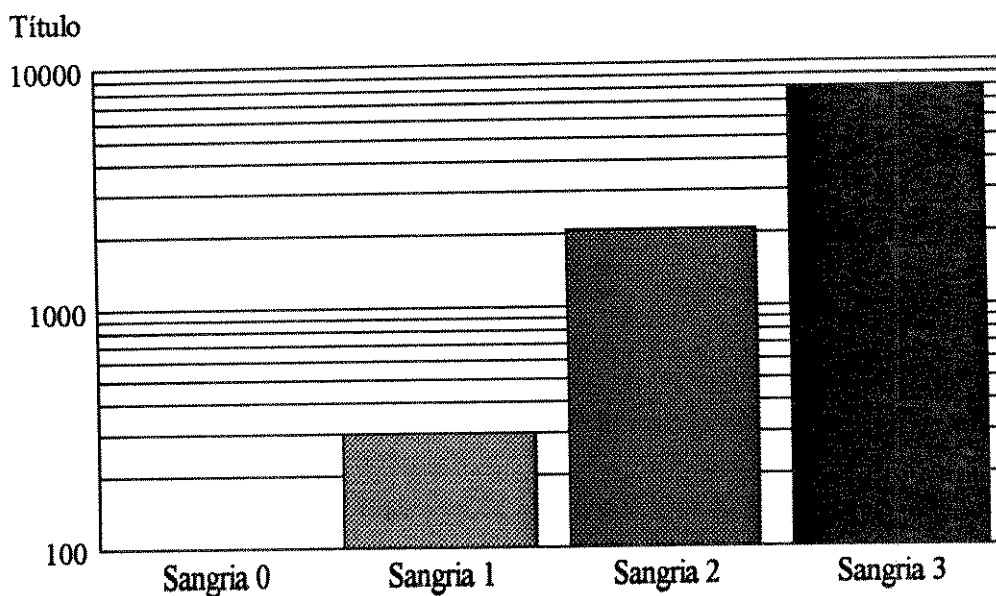
Considerando-se apenas o número de aminoácidos por nós determinados (19 para F1, 18 para F2 e 20 para F3), calculou-se o grau de homologia entre as frações por nós caracterizadas e as da literatura, estando os resultados apresentados na Tabela II.

**Tabela II - Grau de homologia (%) entre as fosfolipases A<sub>2</sub> descritas na Figura 8.**

	F1	F2	F3	CB	CB1	CB2
F1	-	94	95	95	95	95
F2	-	-	94	94	94	100
F3	-	-	-	100	100	90

### **Imunização de animais e ELISA**

Nas imunizações realizadas em coelho para a obtenção de um anti-soro anti-crotoxina obteve-se um alto título de anticorpos titulados pelo método de ELISA (Figura 9).

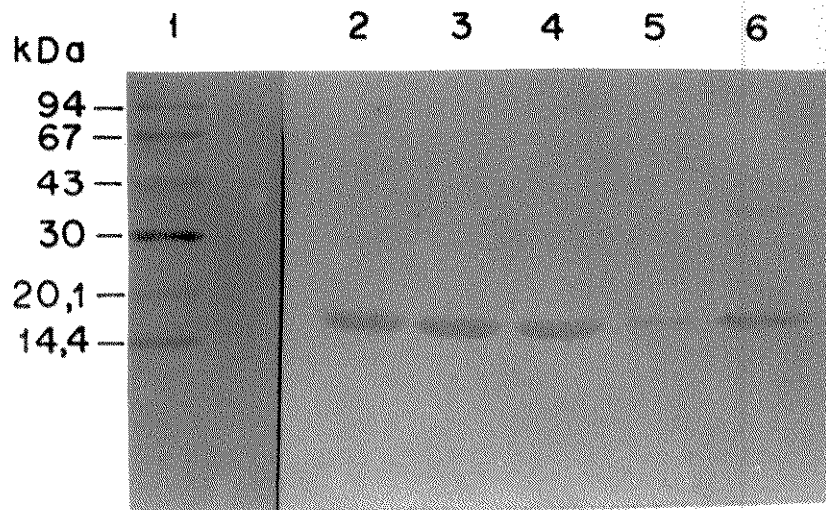


**Figura 9 - Título de anticorpos anti-crotoxina obtidos, medido por ELISA.**

### **"Immunoblotting"**

A Figura 10 apresenta o resultado para o "immunoblotting". Foi realizada uma corrida eletroforética (PAGE a 15% em condições desnaturantes - Figura 7A) e as amostras foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose por 1h a 400mA como descrito na seção Materiais e Métodos. A pista eletroforética contendo os marcadores de peso molecular foi corada com negro de amido 0,1%. O restante da membrana foi incubado com soro de coelho anti-crotoxina (obtido como descrito acima) sendo a membrana incubada com soro de cabra anti-IgG de coelho conjugada à peroxidase e revelada com diaminobenzidina e água oxigenada.





**Figura 10 - "Immunoblotting" do veneno total de *C. d. terrificus*, crotoxina, F1, F2 e F3 revelado por soro de coelho anti-crotoxina. (1) Marcadores de peso molecular: fosforilase B (94kDa), albumina (67kDa), ovoalbumina (43kDa), anidrase carbônica (30kDa), inibidor de tripsina de soja (20,1kDa) e  $\alpha$ -lactoalbumina (14,4kDa); (2) F1; (3) F2; (4) F3; (5) crotoxina e (6) veneno total.**

Podemos observar que o anti-soro reconheceu apenas uma banda imunoreativa com massa molecular aparente igual a 15 kDa nas pistas eletroforéticas 2 até 5 (F1, F2, F3 e crotoxina). Já na pista eletroforética 6 (veneno total), além desta banda de 15 kDa, foi reconhecida fracamente uma outra banda imunoreativa com massa molecular igual a 30 kDa. Esta última poderia ser devida a uma agregação de crotoxina ou das isoformas de PLA<sub>2</sub> (Schalkwijk, C.G. et al, 1991).

Não se observou nenhuma reação à crotapotina pois esta metodologia (PAGE em condições desnaturantes) não é compatível com o peso e a carga da referida proteína (Figura 6)(Landucci et al., 1994).

### **Efeitos das frações fosfolipásicas (F1, F2, e F3) sobre mitocôndrias isoladas em experimentos de determinação do consumo de oxigênio**

Os efeitos de F1, F2 ou F3 sobre o estado respiratório 4 mitocondrial, medidos por consumo de oxigênio, estão mostrados na Figura 11. A Figura 11A mostra que F1 se comportou como um desacoplador de uma maneira dose-dependente, não importando a concentração proteica utilizada. Por outro lado, F2 e F3 mostraram efeitos desacopladores até uma quantidade fixa, 6,5µg/mg para F2 e 3,0µg/mg para F3. Em maiores quantidades, ambas as frações fosfolipásicas apresentaram um efeito inibitório, como pode ser visto nas Figuras 11B e 11C. Nos experimentos em que o consumo de oxigênio foi inibido, a adição de FCCP 0,8µM, após ocorrer a inibição, não estimulou a taxa de consumo de oxigênio (dados não mostrados). Esses efeitos foram abolidos completamente quando estavam presentes no meio de reação BSA 0,1% ou EGTA 0,5mM durante a preincubação das MFR com cada fração fosfolipásica isolada. Esses resultados estão reunidos na Tabela III.

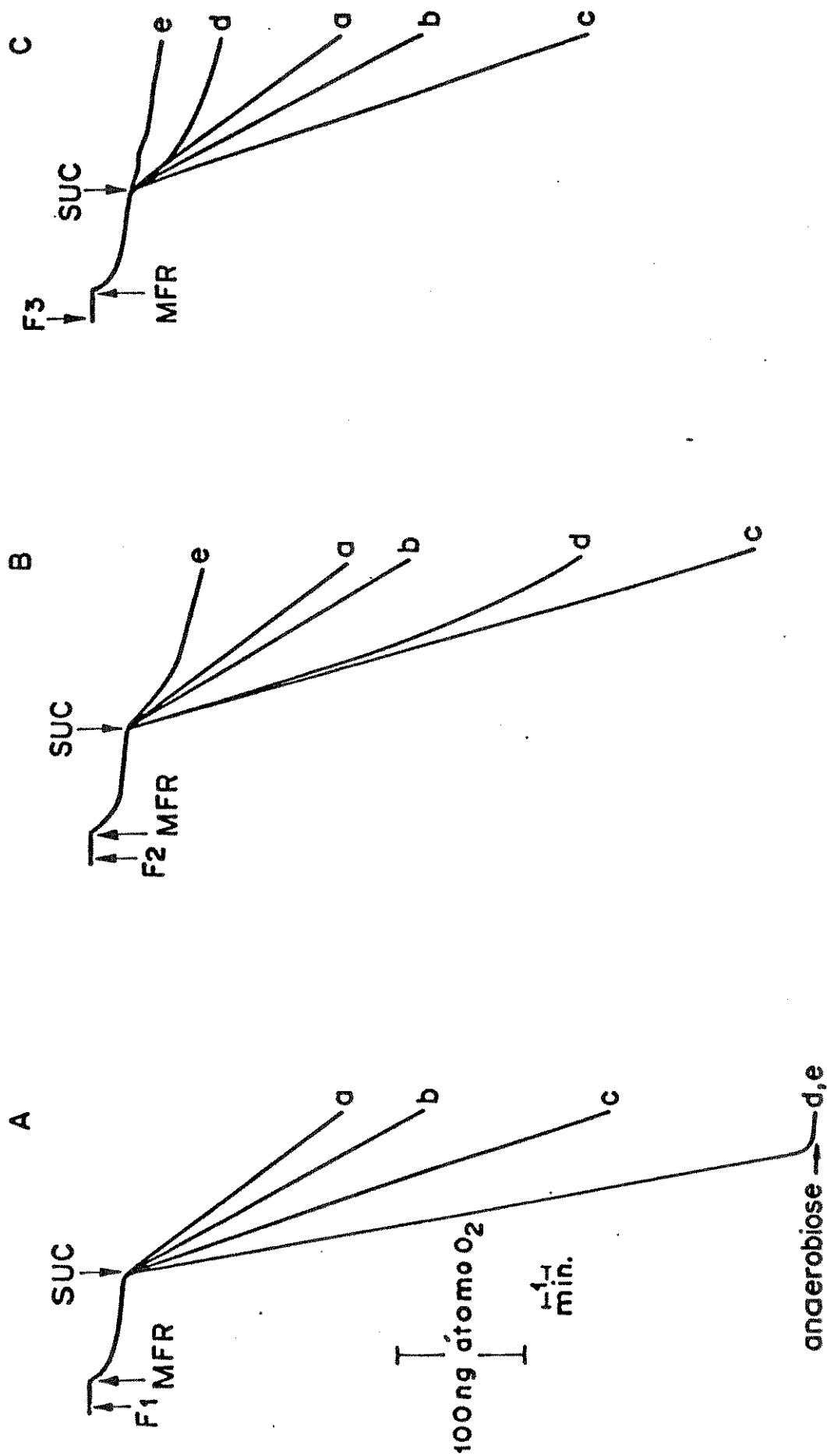


Figura 11 - Efeito da preincubação de diferentes quantidades das frações fosfolipásicas (F1, F2 ou F3), sobre o estado respiratório 4 mitocondrial. MFR (1mg/mL, 30°C, pH 7,4) foram preincubadas por 3 min. com diferentes quantidades de A) F1, B) F2 e C) F3, seguido pela adição de SUC 5mM.

(a) 0 (b) 1 (c) 3 (d) 6,5 (e) 12  $\mu$ g de fração fosfolipásica / mg de proteína mitocondrial.

**Tabela III - Taxa de consumo de oxigênio (estado respiratório 4) de MFR (1mg/mL, 30°C, pH 7,4) preincubadas com 3 e 12µg de F1, F2 ou F3 / mg de proteína mitocondrial na presença ou ausência tanto de EGTA 0,5mM quanto de BSA 0,1%. Os valores representam a média de pelo menos três repetições.**

	Sem EGTA ou BSA ng átomo O <sub>2</sub> /mg/min	EGTA 0,5mM ng átomo O <sub>2</sub> /mg/min	BSA 0,1% ng átomo O <sub>2</sub> /mg/min
Controle	39,94	35,70	32,78
F1 3µg	95,29	30,97	38,4
F1 12µg	135,48	38,03	37,2
F2 3µg	109,01	24,00	24,0
F2 12µg	17,66	27,00	24,0
F3 3µg	81,82	45,82	32,73
F3 12µg	9,82	45,82	32,73

**Efeitos das frações fosfolipásicas (F1, F2, e F3) sobre mitocôndrias isoladas em experimentos de determinação do inchamento mitocondrial**

Os efeitos de F1, F2 ou F3 sobre mudanças na matriz mitocondrial medidas a 520 nm estão mostrados na Figura 12. Nossos resultados indicaram que as frações fosfolipásicas testadas induziram intenso inchamento mitocondrial provavelmente em decorrência de promoverem um ataque à bicamada lipídica da membrana interna

mitocondrial. Nesses experimentos, a presença de BSA 0,1% não preveniu o inchamento mitocondrial provocado pelas frações fosfolipásicas enquanto a presença de EGTA 0,5mM ofereceu proteção total.

Por outro lado, como mostrado na Figura 13, a preincubação com CSA 1 $\mu$ M também foi capaz de oferecer proteção total contra a ação das fosfolipases, principalmente na presença de baixas quantidades de PLA<sub>2</sub> (F1, F2 ou F3). Esse efeito protetor, no entanto, diminuiu com o aumento da quantidade das frações usadas.

A preincubação com CAT 1 $\mu$ M, como mostrado na Figura 14, foi menos eficaz em oferecer proteção contra o inchamento mitocondrial quando comparado à CSA quando se utilizou uma baixa quantidade de PLA<sub>2</sub>. Já com alta quantidade de PLA<sub>2</sub>, o efeito protetor do CAT aparece apenas contra a ação de F3, sendo similar àquele provocado pela CSA.

Finalmente, a Figura 15 mostra que a preincubação com CSA 1 $\mu$ M mais CAT 1 $\mu$ M leva a um desaparecimento do efeito protetor conferido pela CSA, sendo o pouco efeito protetor encontrado semelhante àquele conferido pelo CAT sozinho (Figura 14). Experimentos em que as mitocôndrias isoladas foram incubadas primeiro com CSA e depois com CAT, bem como primeiro com CAT e depois com CSA, não alteram significativamente esse padrão de proteção (dados não apresentados).

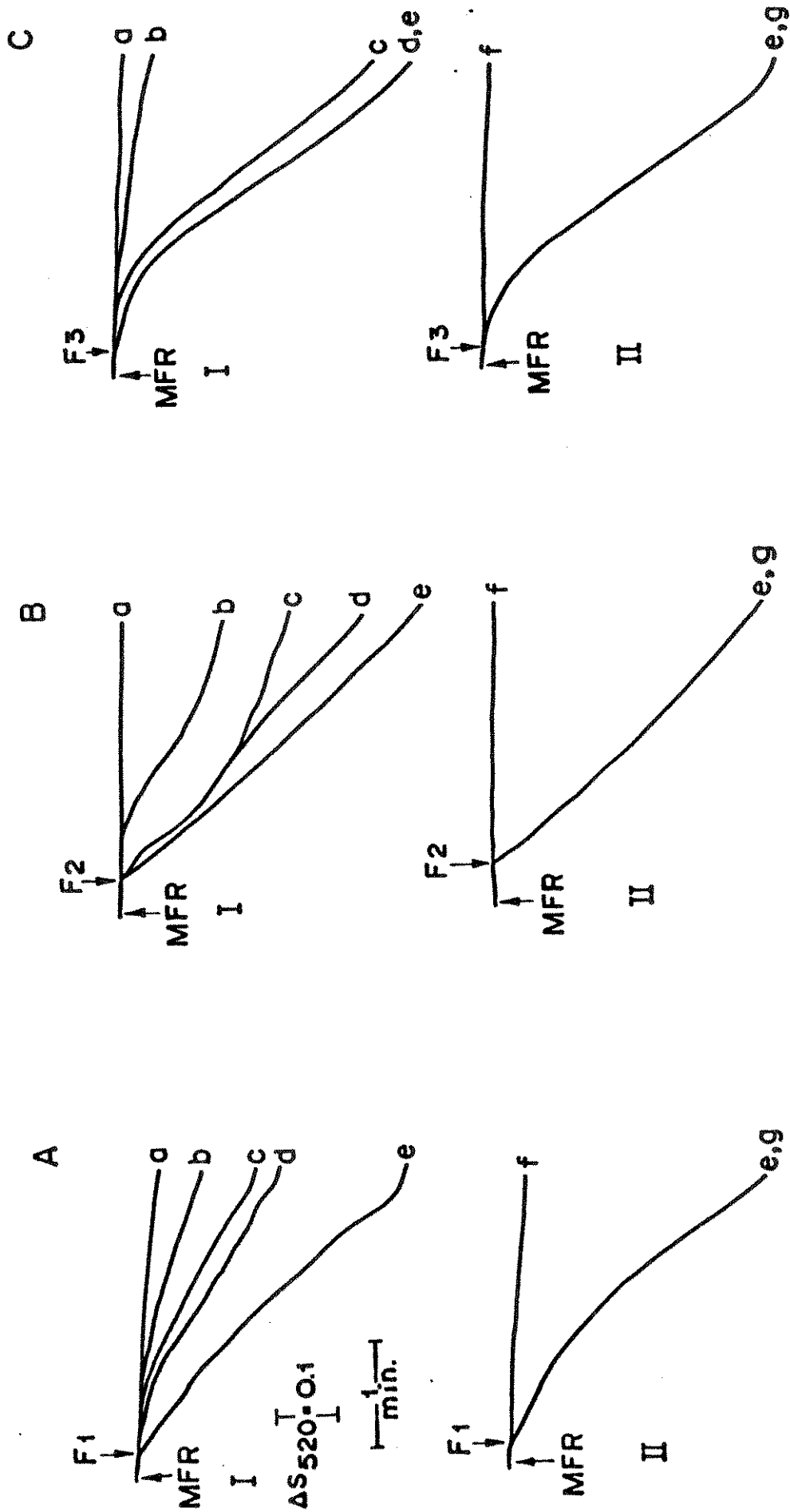


Figura 12 - Efeito da incubação de diferentes quantidades das frações fosfolipásicas (F1, F2 ou F3) sobre o inchamento mitocondrial: o efeito do EGTA ou do BSA. MFR (0,5mg/mL, 30°C, pH 7,4) foram incubadas por 3 min. com diferentes quantidades de A) F1, B) F2 e C) F3.  
 I - (a) 0 (b) 1,5 (c) 3 (d) 6 (e) 12 µg de fração fosfolipásica / mg de proteína mitocondrial.  
 II - (e) 12 µg de fração fosfolipásica (f) 12 µg de fração fosfolipásica mais EGTA 0,5mM (g) 12 µg de fração fosfolipásica mais BSA 0,1%.

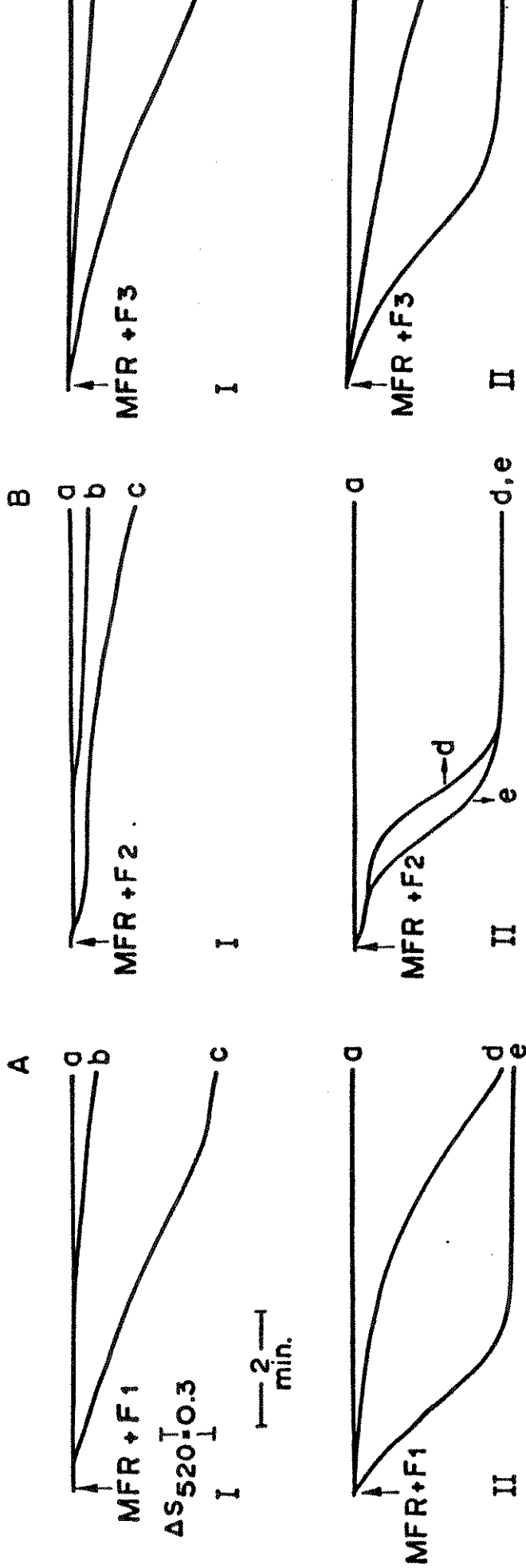


Figura 13 - Efeito protetor da preincubação com CSA contra o inchamento mitocondrial causado pelas frações fosfolipásicas (F1, F2 ou F3). MFR (0,5mg/mL, 30°C, pH 7,4) foram previamente incubadas por 1 min. com CSA 1 $\mu$ M seguido pela adição de A) F1, B) F2 e C) F3.  
 I - (a) sem fração fosfolipásica (b) 1,5  $\mu$ g de fração fosfolipásica mais CSA 1 $\mu$ M (c) 1,5  $\mu$ g de fração fosfolipásica / mg de proteína mitocondrial.  
 II - (a) sem fração fosfolipásica (d) 6  $\mu$ g de fração fosfolipásica mais CSA 1 $\mu$ M (e) 6  $\mu$ g de fração fosfolipásica / mg proteína mitocondrial.

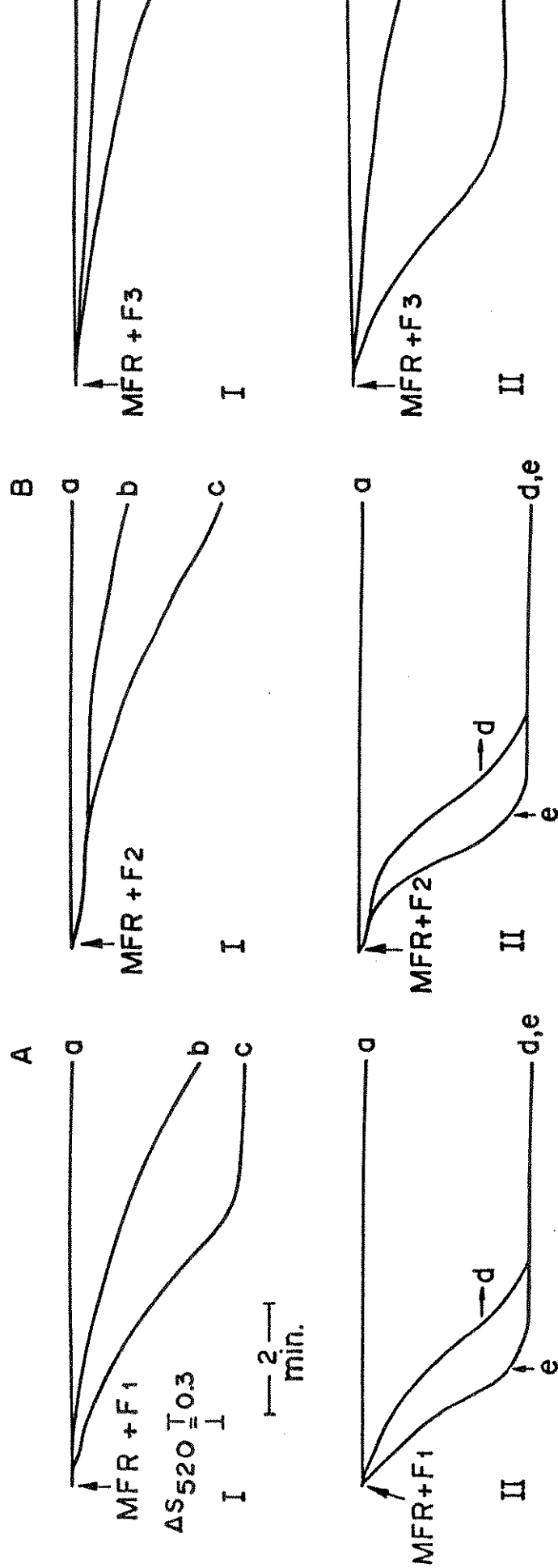


Figura 14 - Efeito protetor da preincubação com CAT contra o inchamento mitocondrial causado pelas frações fosfolipásicas (F1, F2 ou F3). MFR (0,5mg/mL, 30°C, pH 7,4) foram previamente incubadas por 1 min. com CAT 1 $\mu$ M seguido pela adição de A) F1, B) F2 e C) F3.  
 I - (a) sem fração fosfolipásica (b) 1,5  $\mu$ g de fração fosfolipásica mais CAT 1 $\mu$ M (c) 1,5  $\mu$ g de fração fosfolipásica / mg de proteína mitocondrial.  
 II - (a) sem fração fosfolipásica (d) 6  $\mu$ g de fração fosfolipásica mais CAT 1 $\mu$ M (e) 6  $\mu$ g de fração fosfolipásica / mg proteína mitocondrial.



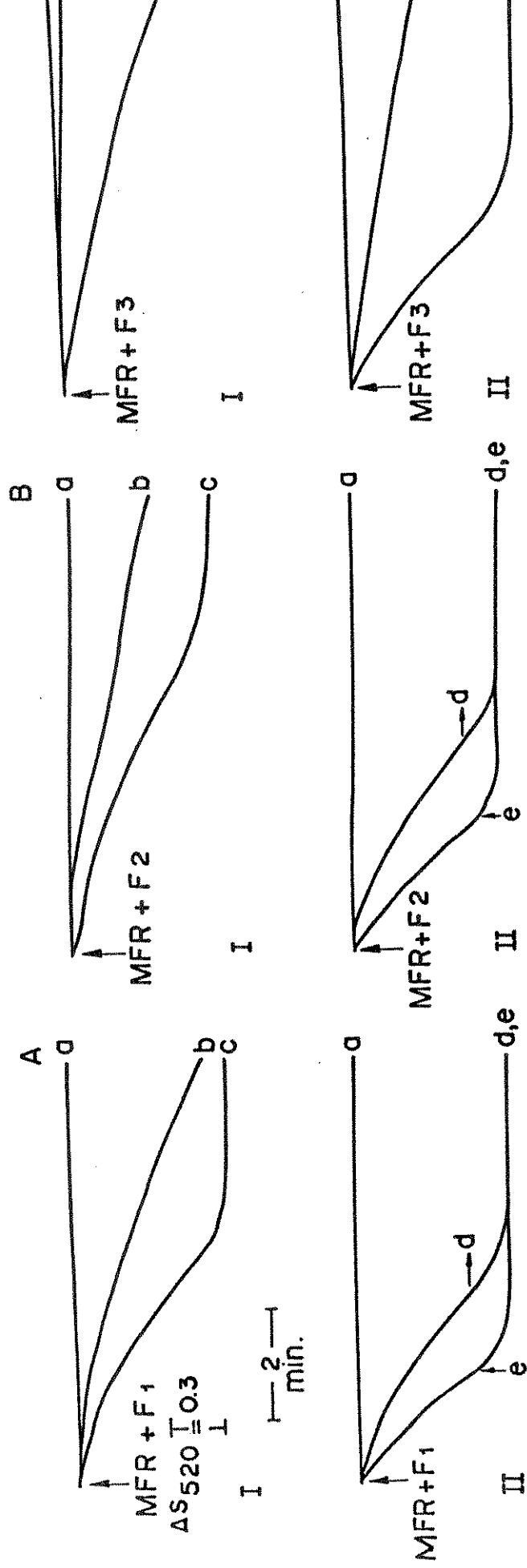


Figura 15 - Efeito protetor da preincubação com CSA mais CAT contra o inchamento mitocondrial causado pelas frações fosfolipásicas (F1, F2 ou F3). MFR (0,5mg/mL, 30°C, pH 7,4) foram previamente incubadas por 1 min. com CSA 1µM mais CAT 1µM seguido pela adição de A) F1, B) F2 e C) F3.  
 I - (a) sem fração fosfolipásica (b) 1,5 µg de fração fosfolipásica mais CSA 1µM mais CAT 1µM (c) 1,5 µg de fração fosfolipásica / mg de proteína mitocondrial.  
 II - (a) sem fração fosfolipásica (d) 6 µg de fração fosfolipásica mais CSA 1µM mais CAT 1µM (e) 6 µg de fração fosfolipásica / mg proteína mitocondrial

## DISCUSSÃO

A partir do veneno total de *Crotalus durissus terrificus* foi possível obter, por cromatografia de exclusão molecular, a fração crotoxina purificada. A presença de uma única banda em PAGE/SDS é utilizada como critério de pureza da fração.

Em seguida, através de cromatografia de alta eficiência em fase reversa, fracionamos a crotoxina em quatro componentes: crotapotina e 3 frações fosfolipásicas (F1, F2 e F3). O grau de pureza da crotapotina isolada foi comprovado através de PAGE em condições não-desnaturantes para proteínas ácidas seguido de impregnação por prata (Figura 6), que mostra a presença de apenas uma banda proteica.

O grau de pureza das frações fosfolipásicas isoladas foi comprovado através de recromatografia em HPLC (Figura 5), eletroforese (Figuras 7A e 7B) e detecção de apenas um resíduo de aminoácido para a posição 1 da cadeia polipeptídica durante o sequenciamento N-terminal de cada fração fosfolipásica (Figura 8). Além disso, a ocorrência de apenas uma única banda imunoreativa para crotoxina e suas frações fosfolipásicas F1, F2 e F3 como revelou o "immunoblotting" (Figura 10) é mais um critério de pureza tanto em relação ao anti-soro empregado (anti-soro anti-crotoxina obtido após inoculação do antígeno em coelhos) quanto em relação às frações proteicas (crotoxina, F1, F2 e F3).

Já foi descrita na literatura a existência de isoformas de PLA<sub>2</sub> no veneno de *C.d. terrificus*, as quais seriam moléculas de massa molecular igual a 14,5 kDa apresentando apenas pequenas diferenças entre si com relação à sua estrutura primária, ou seja, aminoácidos diferentes em determinadas posições de suas cadeias polipeptídicas (Faure and Bon, 1988). As frações fosfolipásicas por nós isoladas (F1, F2 e F3), apresentam massa molecular aparente igual a 15kDa (Figura 7A). Além disso, a homologia sequencial dos 20 resíduos N-terminais entre F1, F2 e F3 e outras fosfolipases descritas na literatura (Figura 8), apresentou 100% de homologia entre F3, CB1 e CB quando

comparadas entre si, bem como entre F2 e CB2 (Tabela II). Já F1 difere em um aminoácido (posição 18 da cadeia polipeptídica, Val  $\Rightarrow$  Ile) em relação a CB1 e CB. Assim sendo as frações fosfolipásicas F1, F2 e F3 podem ser denominadas de isoformas de PLA<sub>2</sub>.

Os efeitos de F1, F2 e F3 (isoformas de PLA<sub>2</sub>) nos experimentos de consumo de oxigênio durante o estado respiratório 4, mostrados nas Figuras 11A, B e C, indicam que das 3 isoformas testadas, apenas F1 foi capaz de induzir exclusivamente desacoplamento mitocondrial enquanto F2 e F3, em maiores quantidades, também induziram outros efeitos, levando à uma inibição da cadeia respiratória. Nesse caso, a adição de FCCP (um desacoplador clássico) não levou à restauração da taxa de consumo de oxigênio.

Já foi demonstrado que frações puras de PLA<sub>2</sub> mostram efeitos inibitórios marcantes sobre várias funções mitocondriais, reduzindo as atividade da NADH-oxidase, das succinato e NADH-desidrogenase e da capacidade de fosforilação (Khole and Khole, 1985). Sabe-se também que a bicamada hidrofóbica tem importante papel na manutenção da organização estrutural de moléculas proteicas incorporadas na fase lipídica. O estado da fase lipídica da membrana pode assim assumir um papel na regulação da atividade funcional de várias enzimas ligadas à membrana. Substâncias, como as PLA<sub>2</sub>, que podem modificar a microviscosidade da fase lipídica da membrana podem, através desse mecanismo, regular vários processos metabólicos (Amler et al., 1986).

No entanto, em nossos experimentos, a modificação do microambiente lipídico não parece ser responsável pela inibição de proteínas respiratórias, o que pode demonstrar que a inibição de tais proteínas está diretamente relacionada com a liberação de ácidos graxos livres em decorrência da ação da PLA<sub>2</sub> sobre a membrana. Essa hipótese é apoiada pelo fato de que a BSA (quelante de ácidos graxos) não protegeu a mitocôndria do inchamento induzido pelas isoformas, como demonstram as Figuras

12A, B e C, indicando que o microambiente lipídico foi alterado mas, ofereceu proteção efetiva nos experimentos de consumo de oxigênio (Tabela III). Além disso pode-se concluir que a proteção oferecida pela BSA, nos experimentos de consumo de oxigênio, não pode ser devida a uma possível interação desta com as isoformas diretamente. Nossos resultados indicam que ácidos graxos livres são os responsáveis diretos pelos efeitos induzidos pelas isoformas de PLA<sub>2</sub> nesses experimentos. Outros pesquisadores (Rauchová et al., 1993) propuseram que ácidos graxos livres podem interagir diretamente com sítios de ligação para substrato e então, inibir competitivamente a glicerol-3-fosfato desidrogenase (EC 1.1.1.8.). Por outro lado, a presença de EGTA (quelante de cálcio) no meio de reação preveniu todos os efeitos induzidos pelas isoformas isoladas tanto nos experimentos de consumo de oxigênio (Tabela III) quanto nos de inchamento mitocondrial (Figuras 12A, B e C), mostrando que essas isoformas são dependentes de cálcio, estando em consonância com a literatura (Verheij et al., 1981).

Apesar de serem moléculas semelhantes, resultados preliminares indicam que cada isoforma de PLA<sub>2</sub> libera diferentes ácidos graxos da membrana mitocondrial (R.H. Valente, 1995, resultados não-publicados), o que poderia explicar o efeito diferente de cada isoforma sobre os experimentos de consumo de oxigênio.

Ácidos graxos de cadeia longa são desacopladores naturais da fosforilação oxidativa em mitocôndrias. O mecanismo protonofórico de sua ação é atribuído ao movimento trans-membrana do ácido graxo não-dissociado em uma direção e a passagem de seu ânion na direção oposta, apesar da passagem deste ânion ainda não estar bem compreendida (Wojtczak and Schonfeld, 1993).

O desacoplamento causado por palmitato, em mitocôndrias isoladas de músculo esquelético e de fígado, é parcialmente abolido por inibidores específicos do carreador ADP/ATP: atracilato, carboxiatracilato (CAT) e boncrecato. Parece que o carreador ADP/ATP, o qual troca ânions de nucleotídeo de adenina, também aumenta de alguma

maneira a permeabilidade da membrana para o ânion  $\text{RCCO}^-$ , assumindo-se que esse grupo hidrofóbico se liga ao carreador de uma maneira não-específica (Andreyev et al., 1989). Outro fator que reforça a possível participação do carreador no desacoplamento causado por ácidos graxos, é que este possui significativa homologia de sequência de aminoácidos, peso molecular bem como disposição de domínios semelhantes ao da UCP (proteína desacopladora) (Aquila et al., 1985; Bouillaud et al., 1986), proteína especial encontrada no tecido adiposo marrom que aumenta a condutância de  $\text{H}^+$  através da membrana mitocondrial interna, na presença de concentrações muito baixas de ácidos graxos (Heaton and Nicholls, 1976).

Além disso, em decorrência de uma permeabilização transitória dependente de cálcio da membrana mitocondrial, a qual foi recentemente considerada como consequência da indução de um poro dependente de cálcio, ácidos graxos podem induzir desacoplamento mitocondrial sendo que este pode ser inibido por CSA (Mokhova et al., 1993).

Em nossos experimentos de inchamento mitocondrial com as isoformas de  $\text{PLA}_2$  observamos que a presença de CSA no meio de incubação oferece proteção às MFR (Figuras 13A, B e C). Nesse caso houve uma inibição do inchamento mitocondrial induzido pelas isoformas, especialmente quando estas estavam presentes em baixa concentração (à exceção de F2 em alta concentração). CSA é sabidamente um inibidor específico da abertura de um poro reversível dependente de cálcio na membrana mitocondrial interna, apesar de não estar definido se a CSA se liga ao poro em si ou a uma proteína envolvida de alguma maneira no mecanismo de abertura desse poro (Crompton and Costi, 1988 ; Crompton et al., 1988).

Alguns autores sugerem que existe uma participação direta do carreador ADP/ATP na formação do poro (Halestrap and Davidson, 1990) enquanto outros postulam que o poro seria uma estrutura diferente, apesar de poder estar intimamente relacionada ao carreador (Hunter and Haworth, 1979 ; Novgorodov et al., 1992 ;

Novgorodov et al., 1994). Em defesa da primeira hipótese, Halestrap e Davidson (Halestrap and Davidson, 1990) sugeriram que quando o sítio de ligação do carreador ADP/ATP está direcionado para o lado citossólico, ele pode se ligar a cálcio. Nessas condições, quando pirofosfato e fosfato inorgânicos, ao invés de nucleotídeos de adenina, estão ligados aos sítios ligadores de substrato, se propõe que um dos resíduos de prolina do carreador seja capaz de se ligar à peptidil-prolil *cis-trans* isomerase matricial, também conhecida como ciclofilina (Fischer et al., 1989). Essa interação deve causar mudanças na estrutura do carreador suficientes para criar um poro. Este poro é bloqueado ou fechado na presença de CSA, a qual sabidamente interage com a ciclofilina (Takahashi et al., 1989), causando a dissociação desta última do carreador e restaurando então a integridade da membrana.

O efeito protetor da CSA contra o inchamento mitocondrial induzido pelas isoformas de PLA<sub>2</sub>, demonstrado no presente trabalho, indica claramente que existe um sítio de ligação para a CSA na membrana mitocondrial além da ciclofilina (presente na matriz). Corroborando esta hipótese, foi recentemente demonstrada a existência de uma proteína de membrana de massa molecular aproximada igual a 10 kDa, a qual pode ser parte de um receptor para CSA presente no poro ativado por cálcio (Andreeva and Crompton, 1994).

No passado, foi proposto que a ativação de PLA<sub>2</sub> intramitocondrial seria responsável pelo processo de permeabilização ativado por cálcio (Beatrice et al., 1980 ; Broekemeier et al., 1985). Nossos resultados indicam que a ligação da CSA a um sítio de membrana mitocondrial previne o ataque das isoformas de PLA<sub>2</sub>. A combinação dessas observações poderia explicar o papel da CSA abolindo o efeito deletério do cálcio sobre mitocôndrias isoladas expostas à adição de PLA<sub>2</sub> exógenas, apesar de alguns autores sugerirem que a PLA<sub>2</sub> mitocondrial provavelmente não deva ser o sítio de interação específico da CSA (Broekemeier et al., 1989).

A indução de perturbações da membrana está intimamente ligada à presença de íons cálcio na matriz e parece ser modulada pelo carreador ADP/ATP. Ou seja, os efeitos deletérios do íon cálcio são potencializados na presença de CAT ou atractilato (inibidores específicos do carreador) enquanto que, por outro lado, na presença dos seus substratos ADP e ATP ou de boncrecato (outro inibidor específico) há uma proteção da membrana (Le Quoc and Le Quoc, 1988).

Nos experimentos de inchamento mitocondrial quando incubamos previamente as mitocôndrias isoladas com CAT (como demonstram as Figuras 14A, B e C) observamos que a proteção não é tão eficaz quanto aquela oferecida pela CSA, contra o efeito induzido pelas isoformas de PLA<sub>2</sub>. Além disso, nos experimentos em que utilizamos CAT e CSA no meio de incubação, o pequeno efeito protetor do CAT prevaleceu, e os resultados foram muito semelhantes aos do CAT sozinho, como demonstram as Figuras 15A, B e C. Assim sendo, aparentemente a ligação do CAT ao seu sítio no carreador ADP/ATP impede a proteção conferida pela CSA.

O estabelecimento do modelo experimental desenvolvido nesta tese propiciará estudos mais aprofundados sobre o modo de ação dos ácidos graxos, liberados em decorrência do ataque à membrana mitocondrial pelas isoformas de PLA<sub>2</sub>, sobre o metabolismo energético mitocondrial. Tais ácidos graxos, a partir do momento em que forem identificados, podem ser administrados diretamente às mitocôndrias isoladas estabelecendo-se desta maneira uma correlação mais definitiva entre os efeitos por nós observados e ácidos graxos em particular. Além disso, os estudos com CSA e CAT devem ser aprofundados para se compreender melhor o papel do poro inespecífico dependente de Ca<sup>2+</sup> bem como do carreador ATP/ADP nesses fenômenos induzidos pelos ácidos graxos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AIRD, S.D.; KAISER, I.I.; LEWIS, R.V. AND KRUGGEL, W.G. (1985). Rattlesnake presynaptic neurotoxins: Primary structure and evolutionary origin of the acidic subunit. *Biochemistry*, **24(25)**:7054-7058.

AIRD, S.D.; KAISER, I.I.; LEWIS, R.V. AND KRUGGEL, W.G. (1986). A complete amino acid sequence for the basic subunit of crotoxin. *Arch.Biochem.Biophys.*, **249(2)**:296-300.

AIRD, S.D.; YATES III, J.R.; MARTINO, P.A.; SHABANOWITZ, J.; HUNT, D.F. AND KAISER, I.I. (1990). The amino acid sequence of the acidic subunit B-chain of crotoxin. *Biochim.Biophys.Acta*, **1040**:217-224.

ALTSCHUL, S.F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E.W. AND LIPMAN, D.J. (1990). Basic local alignment search tool. *J.Mol.Biol.*, **215**:403-410.

AMARAL, C.F.S.; REZENDE de, N.A.; SILVA da, O.A.; RIBEIRO, M.M.F.; MAGALHAES, R.A.; REIS dos, R.J.; CARNEIRO, J.G. AND CASTRO, J.R.S. (1986). Insuficiência renal aguda secundária a acidentes ofídicos botrópico e crotálico. Análise de 63 casos. *Rev.Inst.Med.Trop.SaoPaulo*, **28(4)**:220-227.



AMLER, E.; RAUCHOVÁ, H.; SVOBODOVA, J. AND DRAHOTA, Z. (1986). Regulation of glycerol 3-phosphate oxidation in mitochondria by changes in membrane microviscosity. **FEBS Lett.**, **206(1)**:1-3.

ANDREEVA, L. AND CROMPTON, M. (1994). An ADP-sensitive cyclosporin A-binding protein rat liver mitochondria. **Eur.J.Biochem.**, **221**:261-268.

ANDREYEV, A.Y.; BONDAREVA, T.O.; DEDUKHOVA, V.I.; MOKHOVA, E.N.; SKULACHEV, V.P.; TSOFINA, L.M.; VOLKOV, N.I. AND VYGODINA, T.V. (1989). The ATP/ADP-antiporter is involved in the uncoupling effects of fatty acids on mitochondria. **Eur.J.Biochem.**, **182**:585-592.

AQUILA, H.; LINK, T.A. AND KLINGENBERG, M. (1985). The uncoupling protein from brown fat mitochondria is related to the mitochondrial ADP/ATP carrier. Analysis of sequence homologies and of folding of the protein membrane. **EMBO J.**, **4(9)**:2369-2376.

AUGUSTYN, J.M. AND ELLIOTT, W.B. (1970). Isolation of a phospholipase A from *Agkistrodon piscivorus* venom. **Biochim.Biophys.Acta**, **206**:98-108.

AUGUSTYN, J.M.; PARSA, B. AND ELLIOT, W.B. (1970). Structural and respiratory effects of *Agkistrodon piscivorus* phospholipase A on rat liver mitochondria. **Biochim.Biophys.Acta**, **197**:185-196.

BEAVIS, A.D.; BRANNAN, R.D. AND GARLID, K.D. (1985). Swelling and contraction of the mitochondrial matrix. I. A structural interpretation of the relationship between light scattering and matrix volume. **J.Biol.Chem.**, **260(25)**:13424-13433.

BEATRICE, M.C.; PALMER, J.W. AND PFEIFFER, D.R. (1980). The relationship between mitochondrial membrane permeability, membrane potential, and the retention of  $\text{Ca}^{2+}$  by mitochondria. **J.Biol.Chem.**, **255(18)**:8663-8671.

BJORNTORP, P.; ELLS, H.A. AND BRADFORD, R.H. (1964). Albumin antagonism of fatty acid effects on oxidation and phosphorylation reactions in rat liver mitochondria. **J.Biol.Chem.**, **239(1)**:339-344.

BOMALASKI, J.S. AND CLARK, M.A. (1993). Phospholipase  $\text{A}_2$  and arthritis. **Arthritis and Rheumatism**, **36(2)**:190-198.

BON, C.; CHANGEUX, J.-P.; JENG, T.-W. AND FRAENKEL-CONRAT, H. (1979). Postsynaptic effects of crotoxin and of its isolated subunits. **Eur.J.Biochem.**, **99**:471-481.

BOUCHIER, C.; BOULAIN, J.-C.; BON, C. AND MENEZ, A. (1991). Analysis of cDNAs encoding the two subunits of crotoxin, a phospholipase  $\text{A}_2$  neurotoxin from rattlesnake venom: the acidic non enzymatic subunit derives from a phospholipase  $\text{A}_2$ -like precursor. **Biochim.Biophys.Acta**, **1088**:401-408.

BOUILLAUD, F.; WEISSENBACH, J. AND RICQUIER, D. (1986). Complete cDNA-derived amino acid sequence of rat brown fat uncoupling protein. *J.Biol.Chem.*, **261(4)**:1487-1490.

BRAIDOT, E.; VIANELLO, A.; PETRUSSA, E. AND MACRI, F. (1993). Dissipation of the electrochemical proton gradient in phospholipase-induced degradation of plant mitochondria and microsomes. *Plant Sci.*, **90**:31-39.

BRAZIL, O.V. (1966). Pharmacology of crystalline crotoxin. II. Neuromuscular blocking action. *Mem.Inst.Butantan*, **33(3)**:981-992.

BREITHAUPT, H.; RUBSAMEN, K. AND HABERMANN, E. (1974). Biochemistry and pharmacology of crotoxin complex: biochemical analysis of crotopotin and the basic *Crotalus* phospholipase A<sub>2</sub>. *Eur.J.Biochem.*, **49**:333-345.

BROEKEMEIER, K.M.; DEMPSEY, M.E. AND PFEIFFER, D.R. (1989). Cyclosporin A is a potent inhibitor of the inner membrane permeability transition in liver mitochondria. *J.Biol.Chem.*, **264(14)**:7826-7830.

BROEKEMEIER, K.M.; SCHMID, P.C.; SCHMID, H.H.O. AND PFEIFFER, D.R. (1985). Effects of phospholipase A<sub>2</sub> inhibitors on ruthenium red-induced Ca<sup>2+</sup> release from mitochondria. *J.Biol.Chem.*, **260(1)**:105-113.

BRUSTOVETSKY, N.N.; MAEVSKII, E.I.; GRISHINA, E.V.; GOGVADZE, V.G. AND AMERKHANOV, Z.G. (1989). Regulation of the rate of respiration and oxidative phosphorylation in liver mitochondria from hibernating ground squirrels *Citellus undulatus*. **Comp.Biochem.Physiol.**, **94B(3):537-541**.

BÜCHERL, W. (1980). "Sou a Cascável" in **Acúleos que matam**, Livraria Kosmos Ed., Rio de Janeiro, Brasil, p.122.

CHANCE, B. AND WILLIAMS, G.R. (1956). The respiratory chain and oxidative phosphorylation. **Adv.Enzymol.**, **17:65-134**.

CHANG, C.C. AND LEE, J.D. (1977). The presynaptic neuromuscular blocking action of taipoxin. A comparison with beta-bungarotoxin and crotoxin. **Toxicon**, **15:571-576**.

CHANG, C.C. AND SU, M.J. (1982). Presynaptic toxicity of the histidine-modified, phospholipase A<sub>2</sub>-inactive, beta-bungarotoxin, crotoxin and notexin. **Toxicon**, **20(5):895-905**.

CHANG, J.; MUSSER, J.H. AND MCGREGOR, H. (1987). Phospholipase A<sub>2</sub>: function and pharmacological regulation. **Biochem.Pharmacol.**, **36(15):2429-2436**.

CONDREA, E.; AVI-DOR, Y. AND MAGER, J. (1965). Mitochondrial swelling and phospholipid splitting induced by snake venoms. **Biochim.Biophys.Acta**, **110:337-347**.

CROMPTON, M. AND COSTI, A. (1988). Kinetic evidence for a heart mitochondrial pore activated by  $\text{Ca}^{2+}$ , inorganic phosphate and oxidative stress. A potential mechanism for mitochondrial dysfunction during cellular  $\text{Ca}^{2+}$  overload. **Eur.J.Biochem.**, 178:489-501.

CROMPTON, M.; ELLINGER, H. AND COSTI, A. (1988). Inhibition by cyclosporin A of a  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent pore in heart mitochondria activated by inorganic phosphate and oxidative stress. **Biochem.J.**, 255:357-360.

CUPO, P.; AZEVEDO-MARQUES, M.M. AND HERING, S.E. (1990). Acute myocardial infarction-like enzyme profile in human victims of *Crotalus durissus terrificus* envenoming. **Trans.R.Soc.Trop.Med.Hyg.**, 84:447-451.

DELOT, E. AND BON, C. (1993). Model for the interaction of crotoxin, a phospholipase  $\text{A}_2$  neurotoxin, with presynaptic membranes. **Biochemistry**, 32(40):10708-10713.

DENNIS, E.A. (1994). Diversity of group types, regulation, and function of phospholipase  $\text{A}_2$ . **J.Biol.Chem.**, 269(18):13057-13060.

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

FAURE, G. AND BON, C. (1987). Several isoforms of crotoxin are present in individual venoms from the South American rattlesnake *Crotalus durissus terrificus*. **Toxicon**, **25(2)**:229-234.

FAURE, G. AND BON, C. (1988). Crotoxin, a phospholipase A<sub>2</sub> neurotoxin from the South American rattlesnake *Crotalus durissus terrificus*: Purification of several isoforms and comparison of their molecular structure and of their biological activities. **Biochemistry**, **27(2)**:730-738.

FAURE, G.; CHOUMET, V.; BOUCHIER, C.; CAMOIN, L.; GUILLAUME, J.-L.; MONEGIER, B.; VUILHORGNE, M. AND BON, C. (1994). The origin of the diversity of crotoxin isoforms in the venom of *Crotalus durissus terrificus*. **Eur.J.Biochem.**, **223**:161-164.

FAURE, G.; GUILLAUME, J.-L.; CAMOIN, L.; SALIOU, B. AND BON, C. (1991). Multiplicity of acidic subunit isoforms of crotoxin, the phospholipase A<sub>2</sub> neurotoxin from *Crotalus durissus terrificus* venom, results from posttranslational modifications. **Biochemistry**, **30(2)**:8074-8083.

FISCHER, G.; WITTMANN-LIEBOLD, B.; LANG, K.; KIEFHABER, T. AND SCHMID, F.X. (1989). Cyclophilin and peptidyl-prolyl cis-trans isomerase are probably identical proteins. **Nature**, **337(2)**:476-478.

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

GARLID, K.D. AND BEAVIS, A.D. (1985). Swelling and contraction of the mitochondrial matrix. II. Quantitative application of the light scattering technique to solute transport across the inner membrane. *J.Biol.Chem.*, 260(25):13434-13441.

GERSHONI, J.M. AND PALADE, G.E. (1983). Protein Blotting: Principles and applications. *Anal.Biochem.*, 131:1-15.

GLENN, J.L. AND STRAIGHT, R.C. (1982). The Rattlesnakes and their venom yield and lethal toxicity in *Rattlesnake venoms*, Marcel Dekker Inc., New York, USA, p. 3.

GOPALAKRISHNAKONE, P.; DEMPSTER, D.W.; HAWGOOD, B.J. AND ELDER, H.Y. (1984). Cellular and mitochondrial changes induced in the structure of murine skeletal muscle by crotoxin, a neurotoxic phospholipase A<sub>2</sub> complex. *Toxicon*, 22(1):85-98.

GORNAL, A.G.; BARWILL, C.I. AND DAVID, M.M. (1949). *J.Biol.Chem.*, 177:751-757.

HALESTRAP, A.P. AND DAVIDSON, A.M. (1990). Inhibition of Ca<sup>2+</sup>-induced large-amplitude swelling of liver and heart mitochondria by cyclosporin is probably caused by the inhibitor binding to mitochondrial-matrix peptidyl-prolyl cis-trans

isomerase and preventing it interacting with adenine nucleotide translocase. **BiochemistryJ.**, 268:153-160.

HANADA, K.; KINOSHITA, E.; ITOH, M.; HIRATA, M.; KAJIYAMA, G. AND SUGIYAMA, M. (1995). Human pancreatic phospholipase A<sub>2</sub> stimulates the growth of human pancreatic cancer cell line. **FEBS Lett.**, 373:85-87.

HEATON, G.M. AND NICHOLLS, D.G. (1976). Hamster brown-adipose-tissue mitochondria. The role of fatty acids in the control of the proton conductance of the inner membrane. **Eur.J.Biochem.**, 67:511-517.

HENDON, R.A. AND FRAENKEL-CONRAT, H. (1971). Biological role of the two components of crotoxin. **Proc.Natl.Acad.Sci.**, 68(7):1560-1563.

HOWARD, B.D. (1975). Effects of beta-bungarotoxin on mitochondrial respiration are caused by associated phospholipase A activity. **Biochem.Biophys.Res.Commun.**, 67(1):58-65.

HUANG, P.-C. (1954). Prevention and reversal of succinate-cytochrome c reductase inhibition caused by cobra venom. **J.Form.Med.Assoc.**, 53(6):353-359.

HUNTER, D.R. AND HAWORTH, R.A. (1979). The Ca<sup>2+</sup>-induced membrane transition in mitochondria. I.The protective mechanisms. **Arch.Biochem.Biophys.**, 195(2):453-459.



KHOLE, V. AND KHOLE, V. (1985). Effect of pure venom phospholipase A<sub>2</sub> from the Central Asian cobra (*Naja naja oxiana* Eichwald) on oxidative functions of rat liver mitochondria. **Indian J.Exp.Biol.**, **23**:198-200.

KINI, R.M. AND EVANS, H.J. (1989). A model to explain the pharmacological effects of snake venom phospholipases A<sub>2</sub>. **Toxicon**, **27(6)**:613-635.

LAEMMLI, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins among the assembly of the head of the bacteriophage T<sub>4</sub>. **Nature (London)**, **227**:680-685.

LANDUCCI, E.C.T. (1992). Purificação e atividade biológica da crotoxina e de suas sub-unidades, crotopotina e fosfolipase A<sub>2</sub>, sobre agregação de plaquetas humanas. **Tese de mestrado UNICAMP**.

LANDUCCI, E.C.T.; ANTUNES, E.; DONATO, J.L.; FARO, R.; HYSLOP, S.; MARANGONI, S.; OLIVEIRA, B.; CIRINO, G. AND NUCCI de, G. (1995). Inhibition of carrageenin-induced rat paw oedema by crotopotin, a polypeptide complexed with phospholipase A<sub>2</sub>. **British J.Pharmacol.**, **114**:578-583.

LANDUCCI, E.C.T.; CONDINO-NETO, A.; PEREZ, A.C.; HYSLOP, S.; CORRADO, A.P.; NOVELLO, J.C.; MARANGONI, S.; OLIVEIRA, B.; ANTUNES, E. AND NUCCI de, G. (1994). Crotoxin induces aggregation of human washed platelets. **Toxicon**, **32(2)**:217-226.

LEE, Y.-P. (1954). Effects of snake venoms on diphosphopyridine nucleotide-cytochrome c reductase and cytochrome c oxidase. **J.Form.Med.Assoc.**, **53(6)**:361-367.

LE QUOC, K. AND LE QUOC, D. (1988). Involvement of the ADP/ATP carrier in calcium-induced perturbations of the mitochondrial inner membrane permeability. Importance of the orientation of the nucleotide binding site. **Arch.Biochem.Biophys.**, **265(2)**:249-257.

LIN, Y.-C. AND CHANG, L.-T. (1957). Effect of heat treatment on the inhibition of succinate-cytochrome c reductase by Cobra venom and its lecithinase A. **J.Form.Med.Assoc.**, **56(7)**:38-41.

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

MATSUDAIRA, P. (1987). Sequence from picomole quantities of proteins electroblotted onto polyvinylidene difluoride membranes. **J.Biol.Chem.**, **262(21)**:10035-10038.

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

MOKHOVA, E.N.; STARKOV, A.A. AND BOBYLEVA, V.A. (1993). Uncoupling of oxidative phosphorylation by fatty acids in liver and muscle mitochondria. **Biochemistry(Moscow)**, **58(10)**:1105-1112.

MUKHERJEE, A.B.; MIELE, L. AND PATTABIRAMAN, N. (1994). Phospholipase A<sub>2</sub> enzymes: regulation and physiological role. **Biochem.Pharmacol.**, **48(1)**:1-10.

NICHOLLS, D. (1982). In **Bioenergetics, and Introduction to the chemiosmotic theory**, Academic Press, London.

NICHOLLS, D.; SNELLING, R. AND DOLLY, O. (1985). Bioenergetic actions of beta-bungarotoxin, dendrotoxin and bee-venom phospholipase A<sub>2</sub> on guinea-pig synaptosomes. **Biochem.J.**, **229(3)**:653-662.

NOVGORODOV, S.A.; GUDZ, T.I.; BRIERLEY, G.P. AND PFEIFFER, D.R. (1994). Magnesium ion modulates the sensitivity of the mitochondrial permeability transition pore to cyclosporin A and ADP. **Arch.Biochem.Biophys.**, **311(2)**:219-228.

NOVGORODOV, S.A.; GUDZ, T.I.; MILGROM, Y.M. AND BRIERLEY, G.P. (1992). The permeability transition in heart mitochondria is regulated synergistically by ADP and cyclosporin A. **J.Biol.Chem.**, **267(23)**:16274-16282.

NYGAARD, A.P.; DIANZANI, M.U. AND BAHR, G.F. (1954). The effect of lecithinase A on the morphology of isolated mitochondria. **Exp.Cell R.**, **6**:453-458.

OLIVEIRA, B.; OSLER, A.G.; SIRAGANIAN, R.P. AND SANDBERG, A.L. (1970).  
The biologic activities of guinea pig antibodies. I. Separation of gamma-1 and gamma-2  
immunoglobulins and their participation in allergic reactions of the immediate type.  
**J.Immunol.**, 104(2):320-328.

PACKER, L. (1967). Energy-linked low amplitude mitochondrial swelling.  
**Meth.Enzymol.**, 10:685-689.

RAUCHOVÁ, H.; BELEZNAI, Z. AND DRAHOTA, Z. (1993). Dual role of free  
fatty acids in regulation of mitochondrial L-glycerol-3-phosphate dehydrogenase.  
**Biochem.Mol.Biol.Inter.**, 30(1):139-148.

REISFELD, R.A.; LEWIS, U.J. AND WILLIAMS, D.E. (1962). Disk electrophoresis  
of basic proteins and peptides on polyacrylamide gels. **Nature**, 195:281-283.

ROSENFELD, G. (1971). Symptomatology, pathology and treatment of snake bites in  
South America in **Venomous animals and their venoms**, Bucherl, W. and Buckley, E.E.  
Ed., New York Academic Press, II:345.

ROITT, I.; BROSTOFF, J. AND MALE, D. (1987). The Arthus Reaction in  
**Immunology**, Gower Medical Publishing, London, p.21.4.

ROSTAGNO, A.A.; FRANGIONE, B. AND GOLD, L. (1991). Biochemical studies on the interaction of fibronectin with Ig. **J.Immunol.**, **146(8):2687-2693.**

SANTOS dos, M.C.; FERREIRA, L.C.L.; SILVA da, W.D. AND FURTADO, M.F.D. (1993). Caracterizacion de las actividades biologicas de los venenos "amarillo" y "blanco" de *Crotalus durissus ruruima* comparados con el veneno de *Crotalus durissus terrificus*. Poder neutralizante de los antivenenos frente a los venenos de *Crotalus durissus ruruima*. **Toxicon**, **31(11):1459-1469.**

SCHALKWIJK, C.G.; MARKI, F.; WIESENBERG, I. AND VAN DEN BOSCH, H. (1991). The detection of multimeric forms of phospholipase A<sub>2</sub> upon SDS polyacrylamide electrophoresis. **J.Lipid Mediators**, **4(1):83-96.**

SCHNEIDER, W.C. AND HOGEBOOM, G.H. (1950). Intracellular distribution of enzymes. V. Further studies on the distribution of cytochrome c in rat liver homogenates. **J.Biol.Chem.**, **183:123-128.**

SEKI, C.; VIDAL, J.C. AND BARRIO, A. (1980). Purification of gyroxin from a South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*) venom. **Toxicon**, **18:235-247.**

SIMPSON, L.L.; LAUTENSLAGER, G.T.; KAISER, I.I. AND MIDDLEBROOK, J.L. (1993). Identification of the site at which phospholipase A<sub>2</sub> neurotoxins localize to produce their neuromuscular blocking effects. **Toxicon**, **31(1):13-26.**

TAKAHASHI, N.; HAYANO, T. AND SUZUKI, M. (1989). Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase is the cyclosporin A-binding protein cyclophilin. *Nature*, **337(2)**:473-475.

TU, A.T. (1977a). Venoms of Crotalidae (Crotalids, Pit Vipers) in **Venoms: chemistry and molecular biology**, John Wiley & Sons ed., New York, p.211.

TU, A.T. (1977b). Phospholipase A<sub>2</sub> in **Venoms: chemistry and molecular biology**, John Wiley & Sons ed., New York, p.23.

TZENG, M.-C.; YEN, C.-H.; HSEU, M.-J.; TSENG, C.-C.; TSAI, M.-D. AND DUPUREUR, C.M. (1995). Binding proteins on synaptic membranes for crotoxin and taipoxin, two phospholipases A<sub>2</sub> with neurotoxicity. *Toxicon*, **33(4)**:451-457.

VAN DEN BOSCH, H. (1980). Intracellular phospholipases A. *Biochim.Biophys.Acta*, **604**:191-246.

VERHEIJ, H.M.; SLOTBOOM, A.J. AND HAAS DE, G.H. (1981). Structure and function of phospholipase A<sub>2</sub>. *Rev.Physiol.Biochem.Pharmacol.*, **91**:91-203.

VERHEIJ, H.M.; VOLWERK, J.J.; JANSEN, E.H.J.M.; PUYK, W.C.; DIJKSTRA, B.W.; DRENTH, J. AND HAAS DE, G.H. (1980). Methylation of histidine-48 in pancreatic phospholipase A<sub>2</sub>. Role of histidine and calcium ion in the catalytic mechanism. *Biochemistry*, **19(4)**:743-750.

YANG, C.C. (1994). Structure-function relationship of phospholipase A<sub>2</sub> from snake venoms. **J.Toxicol.**, **13(2):125-177.**

WAITE, M. (1987). The phospholipases in **Handbook of Lipid Research 5**, Plenum Press, New York.

WOJTCZAK, L. AND SCHONFELD, P. (1993). Effect of fatty acids on energy coupling processes in mitochondria. **Biochim.Biophys.Acta**, **1183:41-57.**

## COMUNICAÇÕES EM CONGRESSO REFERENTES A ESTE TRABALHO

### Iniciação Científica

a)Valente,R.H.; Marangoni,S.; Landucci,E.C.T.; Novello,J.C.; Oliveira,B.; Pereira-da-Silva,L. and Macedo,D.V. (1992). Efeito da fração fosfolipase A<sub>2</sub> purificada a partir do veneno total de *Crotalus durissus terrificus* sobre o metabolismo energético mitocondrial. Livro de resumos da VII Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental (FESBE), 14.12.

b)Valente,R.H.; Novello,J.C.; Marangoni,S.; Oliveira,B.; Macedo,D.V. and Pereira-da-Silva,L. (1993). Effect of two components of phospholipase A<sub>2</sub> from *Crotalus durissus terrificus* on liver mitochondria. Livro de resumos da XXII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular (SBBq), P-39.

c)Valente,R.H.; Novello,J.C.; Marangoni,S.; Oliveira,B.; Macedo,D.V. and Pereira-da-Silva, L. (1994). The uncoupler effect of three different phospholipases from *Crotalus durissus terrificus* venom. Livro de resumos da XXIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular (SBBq), P-5.

d)Valente,R.H.; Novello,J.C.; Oliveira,B. and Marangoni,S. (1994). PLA<sub>2</sub> isoforms from *Crotalus durissus terrificus* crotoxin: purification and biological characterization. Livro de resumos da XXIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular (SBBq), M-46.

### Mestrado

e)Valente,R.H.; Novello,J.C.; Marangoni,S.; Oliveira,B.; Pereira-da-Silva,L.; Guimarães,F.; Cavalcanti,T.C. and Macedo,D.V. (1995). PLA<sub>2</sub> isoforms from *Crotalus durissus terrificus* venom distinction through CsA and CAT effects and free fatty acids release in mitochondria. Livro de resumos da XXIV Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular (SBBq), P-31.



## **AUXÍLIOS FINANCEIROS REFERENTES A ESTE TRABALHO**

- a) Bolsa de Iniciação Científica do SAE-UNICAMP no período de maio de 1992 a abril de 1993.
  
- c) Bolsa de Iniciação Científica do SAE-UNICAMP no período de maio a junho de 1993.
  
- d) Bolsa de Iniciação Científica da Fundação de Amparo à Pesquisa no Estado de São Paulo (FAPESP), processo nº 93/0223-4, no período de junho de 1993 a dezembro de 1994.
  
- e) Bolsa de Mestrado da agência CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) com início em março de 1995 e vigência de 30 meses.
  
- f) Projeto FAEP-UNICAMP nº 0639/95 no valor de US\$ 1,800.00 para compra de materiais para auxiliar na execução do presente trabalho.

## TRABALHOS SUBMETIDOS PARA PUBLICAÇÃO

1. Revista: Archives of Biochemistry and Biophysics

Data da submissão: 10 de novembro de 1995

Título: **Phospholipase A<sub>2</sub> isoforms from Crotalus durissus terrificus venom and their effect on isolated mitochondria.**

Autores: Richard H. Valente, José C. Novello, Sérgio Marangoni, Benedito

Oliveira, Lúcia Pereira-da-Silva and Denise V. Macedo.