

LUCIMARA JÚLIO MARTINS

**ESTUDO DA ATIVIDADE HEMOLÍTICA INDUZIDA PELO
VENENO DE *BOTHROPS LANCEOLATUS*
(Fer de Lance) *in vitro***

Este exemplar corresponde à versão final da Dissertação de Mestrado, apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas - UNICAMP, para obtenção do Título de Mestre em Farmacologia da Farmacêutica – Lucimara Júlio Martins.

Campinas, 25 de janeiro de 2006.
Alôbo de Araújo
Profa. Dra. Albetiza Lôbo de Araújo
- Orientadora -

CAMPINAS

2006

LUCIMARA JÚLIO MARTINS

**ESTUDO DA ATIVIDADE HEMOLÍTICA INDUZIDA PELO
VENENO DE *BOTHROPS LANCEOLATUS*
(Fer de Lance) *in vitro***

*Dissertação de Mestrado apresentada à Pós-Graduação da
Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual
de Campinas para obtenção do Título de Mestre em
Farmacologia.*

ORIENTADORA: PROFA. DRA ALBETIZA LÔBO DE ARAÚJO

CAMPINAS

2006



1150068949



FCM

T/UNICAMP M366e

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP

Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

M366e Martins, Lucimara Júlio
“ Estudo da atividade hemolítica induzida pelo veneno de *Bothrops lanceolatus* (Fer de Lance) in vitro” / Lucimara Júlio Martins.
Campinas, SP : [s.n.], 2006.

Orientador : Albetiza Lobo de Araújo
Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas.

1. *Bothrops lanceolatus*. 2. Veneno. 3. Hemólise. I. Araújo, Albetiza Lobo de. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

Slp/fcm

Título em ingles: Hemolytic activity study induced by in vitro *Bothrops lanceolatus* (fer de Lance) venom.

Keywords: • *Bothrops Lanceolatus*
• Venom
• Hemolysis

Titulação: Mestrado

Banca examinadora: Profa. Dra. Albetiza Lobo de Araújo

Profa. Dra. Angélica de Fátima de Assunção Braga

Profa. Dra. José Carlos Cogo

Data da defesa: 17/02/2006

UNIDADE	FCM
Nº CHAMADA	T/unicamp
	M 6044
V	EX
TOMBO BC/	68949 / FCM/3404
PROC.	16. P.00/23.06
C	<input type="checkbox"/>
	D <input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	11,00
DATA	12/06/06
Nº CPD	

Bib ID 383134



UNICAMP

Banca Examinadora da Dissertação de Mestrado

Orientador:

Profa. Dra. Albetiza Lôbo de Araújo

Membros:

Profa. Dra. Albetiza Lôbo de Araújo

Prof. Dr. José Carlos Cogo

Profa. Dra. Angélica de Fátima de Assunção Braga

Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 25/01/2006

2006.1.2.163

DEDICATÓRIA

Ao meu Deus e Pai, por mais uma vez satisfazer o desejo do meu coração.

*Aos meus queridos pais, pelo amor e ternura,
pelos princípios de vida, e por toda dedicação
dispensada a mim.*

*Ao meu esposo Adilson, pelo amor e
compreensão, e por fazer parte da minha vida.*

*À minha irmã **Luciana** e ao meu cunhado **César**,
pelo carinho, apoio, e amizade.*

*Aos meus tios, primos e à minha avó, por
partilharem dos melhores momentos de minha
vida.*

À minha orientadora, Profa. Dra. Albetiza Lôbo de Araújo, pela orientação, oportunidade de crescimento pessoal e intelectual, e pela confiança e amizade.

Ao Prof. Dr. Paulo Maria Ferreira de Araújo, pela amizade, atenção dispensada a este trabalho, colaboração nos estudos imunológicos e pela oportunidade do uso de seu laboratório.

Ao Prof. Dr. Stephen Hyslop pela co-orientação, pelas brilhantes sugestões, e pela oportunidade de trabalhar em seu laboratório, o que foi imprescindível para a realização deste trabalho.

Às amigas Alessandra Stroka, Christina, Carol, Paula, Renata, Silvia, Raquel e amigos Daniel, Marcelo e Paulo Anselmo pela companhia e amizade. Agradeço também a Christiane, Thomas, Lourdes, Gustavo pelos auxílios dedicados.

Aos técnicos de laboratórios Alessandra Priscila, José Ilton, Célia, José Ray e Gildo, pela amizade, convívio e auxílio no desenvolvimento deste trabalho.

Aos funcionários do Departamento de Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp, pelo convívio e pela utilização dos recursos deste Departamento.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente, na realização deste trabalho e na minha formação pessoal e profissional.

A Deus, por vocês, por este trabalho e por sempre estar ao meu lado!

“Nem olhos viram, nem ouvidos ouviram, nem jamais penetrou em coração humano o que Deus tem preparado para aqueles que o amam”.

I Corintios 2:9

	<i>PÁG.</i>
RESUMO.....	xvi
ABSTRACT.....	xviii
1- INTRODUÇÃO.....	20
1.1- Breve histórico do ofidismo no contexto Brasil Colônia.....	21
1.2- Acidente por animais peçonhentos.....	21
1.3- Características gerais das toxinas animais.....	22
1.4- Toxinas nos venenos de serpentes.....	23
1.5- Enzimas Fosfolipases A₂ nos venenos de serpentes.....	24
1.5.1- Atividade catalítica das Fosfolipases A ₂	25
1.5.2- “Sítios-Alvo” e Especificidade farmacológica das Fosfolipases A ₂ ..	26
1.5.3- Atividade catalítica das Fosfolipases A ₂ e Efeitos farmacológicos..	28
1.6- Fosfolipídios das membranas plasmáticas.....	31
1.7- Principais atividades fisiopatológicas do veneno botrópico.....	34
1.8- <i>Bothrops lanceolatus</i>.....	35
2- OBJETIVOS.....	38
3- MATERIAL E MÉTODOS.....	40
3.1- Material.....	41
3.2- Métodos.....	41
3.2.1- Atividade hemolítica indireta <i>in vitro</i> do veneno de <i>B. lanceolatus</i> em hemácias de diferentes espécies animais.....	41

3.2.2- Influência da Concentração sobre a Atividade hemolítica indireta <i>in vitro</i> do veneno de <i>B. lanceolatus</i>	42
3.2.3- Influência da temperatura na atividade hemolítica indireta <i>in vitro</i> do veneno de <i>B. lanceolatus</i>	43
3.2.4- Inibição da atividade fosfolipásica do veneno de <i>B. lanceolatus</i>	43
3.2.5- Determinação da atividade hemolítica indireta <i>in vitro</i> após inibição da atividade fosfolipásica do veneno de <i>B. lanceolatus</i>	44
3.2.6- Isolamento e Purificação da fosfolipase do veneno de <i>B. lanceolatus</i>	44
3.2.7- Testes Imunoquímicos de Imunodifusão e Imunoeletroforese.....	45
3.2.8- Determinação da atividade hemolítica indireta <i>in vitro</i> na fração fosfolipásica isolada do veneno de <i>B. lanceolatus</i>	45
4- RESULTADOS	46
5- DISCUSSÃO	60
6- CONCLUSÃO	64
7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	66

LISTA DE ABREVIATURAS

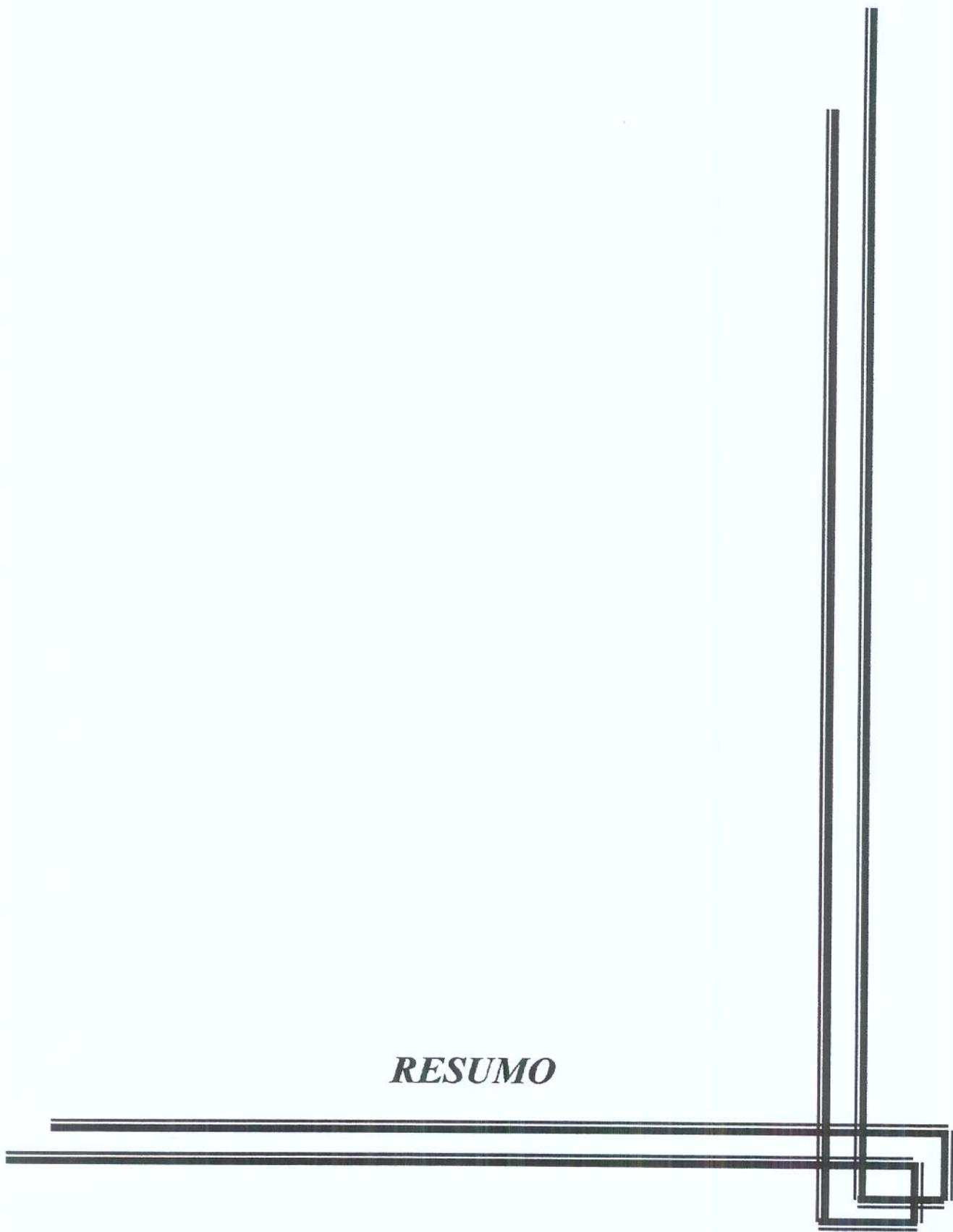
Abs	Absorbância
<i>B.lanceolatus</i>	<i>Bothrops lanceolatus</i>
h	Hora(s)
l	litro(s)
M	Molar
mg	Miligrama(s)
min	Minuto(s)
ml	mililitro(s)
mM	milimolar
nm	nanômetro(s)
OD	Óptic Density
PLA₂	Fosfolipase A ₂
PBS	Fosfato de sódio 0,01M
Tris	Tris (hidroximetil)-aminometano
µg	Micrograma(s)
µL	Microlitro(s)
VBL	veneno de <i>Bothrops. Lanceolatus</i>

LISTA DE TABELAS

	<i>PÁG.</i>
Tabela 1- Inibição da atividade fosfolipásica do veneno de <i>B. lanceolatus</i> com brometo de <i>p</i> -bromofenacil.....	53

	<i>PÁG.</i>
Figura 1- Hidrólise na posição ns-2 do fosfolipídio.....	26
Figura 2- Interação da PLA ₂ com o sítio-alvo na membrana plasmática.....	28
Figura 3- Atividade enzimática da PLA ₂ sobre os fosfolipídios de membrana.....	29
Figura 4- Sítio ativo da Histidina na PLA ₂	30
Figura 5- Metabolismo das fosfatidilcolinas na membrana plasmática.....	33
Figura 6- <i>Bothrops lanceolatus</i>	37
Figura 7- Efeito do veneno de <i>B. lanceolatus</i> (6.7µg/ml)sobre a suspensão de hemácias de diferentes espécies animais.....	50
Figura 8- Efeito de diferentes concentrações do veneno de <i>B. lanceolatus</i> sobre a suspensão de hemácias de carneiro.....	51
Figura 9- Efeito da temperatura sobre a atividade hemolítica induzida pelo veneno de <i>B. lanceolatus</i> (10µg/ml).....	52
Figuras 10- Cromatografia de Exclusão em Sephadex G-50.....	54
Figuras 11- Cromatografia de Troca Iônica em CM-celulose.....	55
Figuras 12- Refiltração em Sephadex G-50.....	56
Figura 13- Imunodifusão em gel de agarose a 1% em meio salino.....	57
Figura 14- Imunoeletroforese em gel de agarose a 1% em tampão veronal 50mM pH 8,4.....	58
Figura 15- Atividade hemolítica induzida pela fração fosfolipásica do veneno de <i>B. lanceolatus</i> sobre a suspensão de hemácias de carneiro.....	59

RESUMO



O veneno de *Bothrops lanceolatus* exerce várias atividades biológicas, dentre elas a atividade hemolítica indireta. Neste trabalho verificamos algumas das características desta atividade *in vitro*.

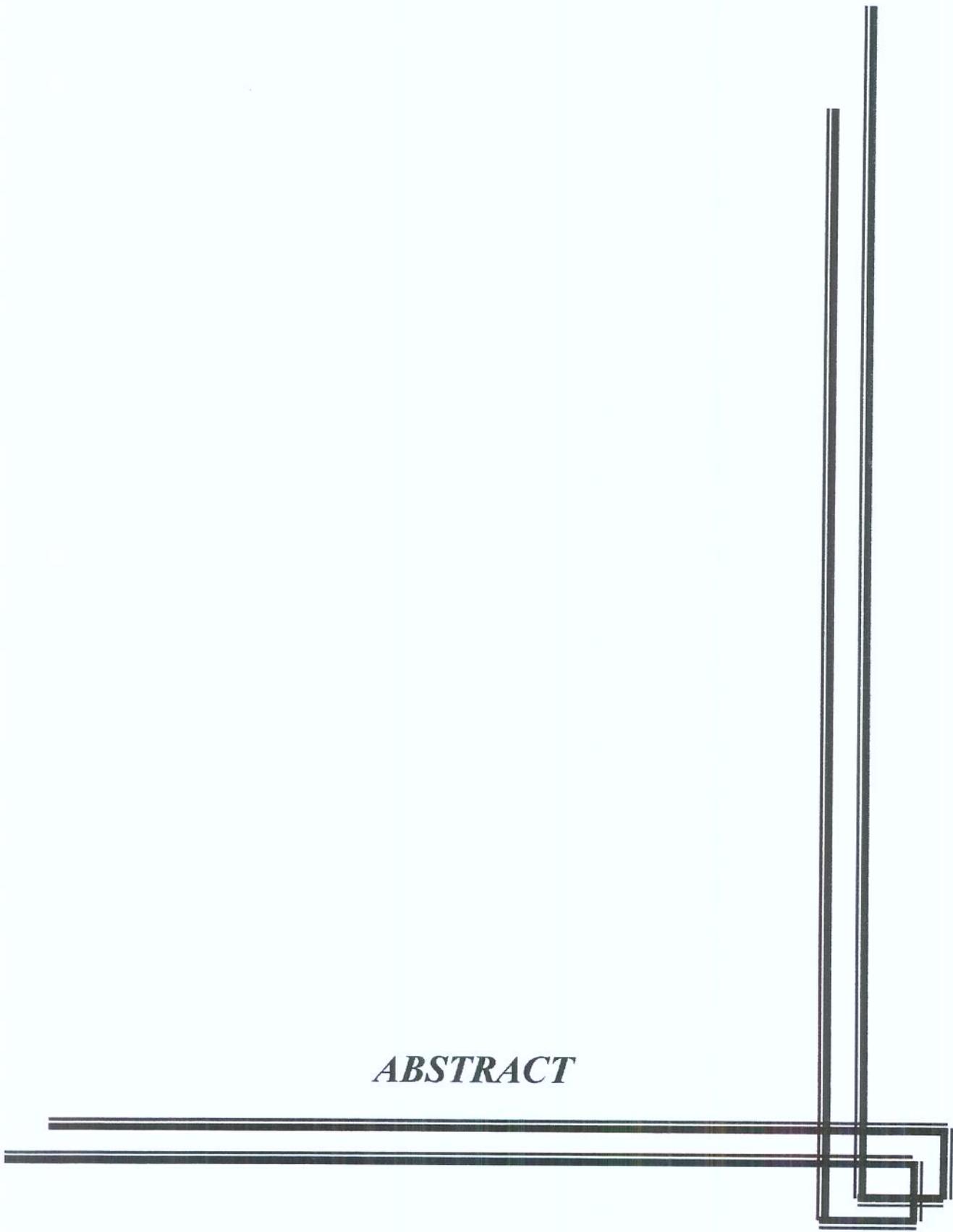
O veneno induziu hemólise indireta em eritrócitos de cavalo, boi, rato e carneiro, sendo que, dentre essas espécies, a primeira foi mais sensível; não houve atividade hemolítica direta. A hemólise foi concentração-dependente e atenuada em temperaturas $>40^{\circ}\text{C}$.

O tratamento do veneno com brometo de p-bromofenacil aboliu a atividade da fosfolipase A₂ (PLA₂) do veneno e impediu a hemólise.

Corroborando estes achados, uma PLA₂ ácida purificada deste veneno também induziu hemólise. Esta PLA₂ reagiu contra o anti-soro do veneno de *B. lanceolatus*.

Estes resultados indicam que atividade hemolítica do veneno de *B. lanceolatus* é mediada pela PLA₂. A reação cruzada da PLA₂ com o anti-soro sugere que a atividade desta enzima pode eficazmente ser neutralizada durante a terapia sorológica.

ABSTRACT



Bothrops lanceolatus venom exerts a variety of biological activities, including indirect hemolysis. In this work, we examined some of the characteristics of this activity *in vitro*.

The venom caused indirect hemolysis in horse, ox, rat and sheep erythrocytes, with the first of these species being the most sensitive; there was no direct hemolysis. The hemolysis was concentration-dependent and was markedly attenuated at $>40^{\circ}\text{C}$.

Treatment of the venom with *p*-bromophenacyl bromide abolished the phospholipase A₂ (PLA₂) activity of the venom and prevented the hemolysis.

In agreement with this finding, an acidic PLA₂ purified from this venom also caused hemolysis. This PLA₂ reacted with antivenom against *B. lanceolatus* venom.

These results indicate that the hemolytic activity of *B. lanceolatus* venom is mediated by PLA₂. The cross-reactivity of the PLA₂ with antivenom suggests that the activity of this enzyme may be effectively neutralized during antivenom therapy.

1- INTRODUÇÃO

1.1- Breve histórico do ofidismo no contexto Brasil Colônia

Os animais fazem parte do cotidiano e imaginário humano, especialmente as serpentes, servindo de inspiração para muitas crenças, lendas e mitos. No Brasil Colônia o conhecimento sobre esses animais se devem às informações tomadas não só dos observadores, mas também a partir de relatos dos índios e dos “línguas” (brancos que sabiam falar a língua dos nativos), resultando em uma mistura dos universos mitológicos: indígena e europeu. Além disso, poderia-se dizer de modo simplificado, que nessa etapa do conhecimento do outro, estabelece-se o paralelismo – índio / animal / demônio – pedra fundamental para a construção da justificativa ideológica da conquista e dominação. Em outras palavras, torna-se necessário aos conquistadores justificar a força e violência empregada em relação ao nativo: deve-se subjugar-lo, assim como se devem subjugar os animais e o demônio. É, portanto, dentro desse quadro, que, em linhas gerais, comparecem os animais peçonhentos na literatura colonial: subordinados à visão que o europeu tem do nativo (FREDERICO, 2003).

1.2- Acidentes por animais peçonhentos

Na Terra existem aproximadamente 3.000 espécies de serpentes, sendo que apenas 410 são consideradas venenosas (BARRAVIERA & PEREIRA, 1994).

As serpentes venenosas pertencem a cinco famílias: Hydrophiidae, Elapidae, Colubridae, Crotalidae e Viperidae (WÜSTER, GOLAY, WARRELL, 1997), esta última dividindo-se em três subfamílias: Viperinae, Azemiopinae e Crotalinae (FRANCO, 2003).

No Brasil, existem aproximadamente 321 espécies de serpentes (FRANCO, 2003), sendo que as venenosas pertencem às famílias Elapidae e Viperidae. O único gênero da família Elapidae no país é o *Micrurus*, cujas espécies são popularmente conhecidas por corais. Na subfamília Crotalinae, incluem-se as serpentes dos gêneros *Bothrops*, *Crotalus* e *Lachesis* (BRASIL, 2002)¹

¹ <http://www.funasa.gov.br/pub/GVE/GVE0501A.htm>

Dentre os acidentes por animais peçonhentos, o ofidismo é o principal deles, pela sua frequência e gravidade. Ocorre em todas as regiões e estados brasileiros e é um importante problema de saúde, quando não se institui a soroterapia de forma precoce e adequada. Cerca de 75% dos casos notificados são atribuídos às serpentes do gênero *Bothrops* (sendo que no estado de São Paulo é responsável por mais de 90% dos casos de acidentes ofídicos atendidos no Hospital Vital Brasil (JORGE & RIBEIRO, 1991)), 7% ao gênero *Crotalus*, 1,5% ao gênero *Lachesis*; 3% devido às serpentes não peçonhentas e 0,5% provocados pelas *Micrurus*. Em aproximadamente 13% das notificações, não são especificados os gêneros das serpentes envolvidas nos acidentes (BRASIL, 2002)².

1.3- Características Gerais das Toxinas Animais

Um grande número de toxinas animais é representado por secreções coloidais protéicas conhecidas como venenos. Os venenos de serpentes são exemplos típicos dessa classe, são secretados por glândulas altamente especializadas e podem ser tóxicos mesmo para o próprio hospedeiro se introduzido em outro tecido. Muitos dos componentes protéicos possuem propriedades enzimáticas e causam degradação de moléculas biológicas ou componentes celulares; podendo ser termolábeis e apresentar natureza antigênica.

As proteínas menores ou peptídeos presentes nos venenos de serpentes ou de outros animais apresentam propriedades biológicas muito específicas, efeitos rápidos e / ou mesmo irreversíveis e, por isso, são frequentemente responsáveis por muitas injúrias. Tais proteínas e peptídeos são susceptíveis a proteases presentes no trato digestivo, assim para produzir seu efeito máximo devem ser introduzidos por via parenteral. Sua ingestão, no entanto, não é absolutamente segura, visto que moléculas menores podem ser absorvidas através de feridas ou áreas ulceradas na mucosa superior ao trato gastrointestinal. Frequentemente, apenas uma pequena quantidade de toxina é necessária para produzir um efeito tóxico.

² <http://www.funasa.gov.br/pub/GVE/GVE0501A.htm>

Uma variedade de amins biologicamente ativas, ácidos, ou outras moléculas menores são encontradas em várias toxinas animais. Algumas são altamente irritantes pelo contato direto, outras são absorvidas pelos tecidos e produzem efeitos específicos, como por exemplo, no sistema nervoso.

Notáveis similaridades têm sido observadas em componentes tóxicos de venenos de serpentes pertencentes a diferentes gêneros, e ainda uma ampla variedade pode ser encontrada na composição de venenos de serpentes de uma mesma espécie. Os efeitos produzidos pelas toxinas podem ser tão variados quanto às associações químicas entre elas (SHARMA & TAYLOR, 1987).

1.4- Toxinas nos Venenos de Serpentes

Os venenos de serpentes são misturas complexas de proteínas, peptídeos, amins biogênicas, nucleotídeos, carboidratos, lipídeos, e substâncias não protéicas, como materiais inorgânicos, principalmente metais. A composição de veneno é altamente variada, dependendo da espécie, sexo, e idade do animal. Aproximadamente 90 a 95% do veneno seco consistem de proteínas, apresentando propriedades enzimáticas, diretamente tóxicas ou facilitadoras de outros componentes tóxicos (SHARMA & TAYLOR, 1987).

Nenhum outro produto natural apresenta uma mistura tão efetiva de diferentes fatores, exercendo simultaneamente efeitos tóxicos sobre os sistemas: sangüíneo, respiratório, cardiovascular e nervoso. Conseqüentemente, o uso do veneno bruto ou frações impuras nas investigações científicas muitas vezes leva a observações e resultados contraditórios ou dúbios. Assim, para se compreender a extrema complexidade dos venenos é importante isolar seus constituintes e examinar suas propriedades individuais para se obter resultados mais conclusivos, e um melhor entendimento dos efeitos e mecanismos de ação ao nível molecular.

Não é raro encontrar nestas investigações, que uma mesma toxina se apresente sob várias formas, diferindo apenas em alguns aminoácidos, como é o caso da crotoxina do veneno de cascavel, exibida em dez formas diferentes.

Os novos métodos e técnicas bioquímicas desenvolvidas constituem valiosos instrumentos de pesquisa, pois permitem o uso de proteínas puras e bem caracterizadas nos estudos farmacológicos e fisiopatológicos (FAURE & BON, 1987).

1.5- Enzimas Fosfolipases A₂ nos venenos de serpentes

Misturas complexas de proteínas enzimáticas e não enzimáticas são encontradas nos venenos de serpentes. Embora as proteínas não enzimáticas sejam relativamente mais tóxicas, o efeito total do envenenamento é uma combinação de efeitos produzidos por ambos os tipos de proteínas (SHARMA & TAYLOR, 1987).

Dentre as proteínas com atividades enzimáticas, as fosfolipases A₂ (PLA₂s) são particularmente abundantes nos venenos do gênero *Bothrops* (ROSENBERG, 1990; VALENTIN & LAMBEAU, 2000). Estas enzimas têm sido muito estudadas devido suas propriedades químicas e atividades biológicas (VARANDA & GIANNINI, 1994), tais como, neurotóxica, miotóxica, hemolítica, anticoagulante, edematogênica, entre outras (KINI & EVANS, 1989).

As PLA₂s têm sido isoladas de venenos de serpentes, de abelhas, escorpiões, e pâncreas de mamíferos. Estas enzimas suportam altas temperaturas sem perder suas atividades, como é o caso das PLA₂s do veneno de *Naja naja atra*, que são estáveis a 90°C / 5 min. (VARANDA e GIANNINI, 1994). O peso molecular é de 9 – 15 kDa; exceto em algumas espécies, que se apresentam como dímeros (20 – 30 kDa) (SHARMA & TAYLOR, 1987).

As PLA₂s dos venenos de serpentes e mamíferos são similares na estrutura e função catalítica. Contudo, as PLA₂s dos venenos, além do provável papel na digestão, em contraste com as de mamíferos são em sua maioria, tóxicas e induzem um amplo espectro de efeitos farmacológicos, por interferir em processos fisiológicos normais (KINI, 1997a), como por exemplo, as PLA₂s neurotóxicas (GUBENSEK et al., 1997; BON, 1997), e as miotóxicas (FLETCHER et al., 1997).

Até o momento, mais de 280 PLA₂s foram seqüenciadas (DANSE et al., 1997; TAN et al., 2003) e, apesar de exibirem diferentes propriedades farmacológicas, compartilham 40-99% de semelhança na seqüência de aminoácidos, e significante semelhança nas estruturas terciárias (SCOTT, 1997). Sendo assim, a similaridade estrutural torna complexa a relação *estrutura-função*, que hoje representa um enigma complexo para bioquímicos de proteínas, biólogos, toxinologistas, farmacologistas e fisiologistas. Em 2003, Kini, em seu trabalho sobre PLA₂s dos venenos de serpentes, propôs que essas enzimas, por se ligarem a proteínas de membrana, induzem efeitos farmacológicos, dependentes ou não de atividade catalítica.

A maioria das PLA₂s dos venenos de serpentes exibem efeitos farmacológicos por si só, por exemplo, a notexina, e a amoditoxina (GUBENSEK, *et al.*, 1997). No entanto, algumas só atingem seu limiar de ação farmacológica quando são complexadas com outro(s) fator(s). Esses complexos conservam-se unidos por ligações covalentes; como na β-bungarotoxina, onde a PLA₂ se liga por pontes dissulfeto a uma segunda subunidade; ou por ligações não-covalentes, como a crotoxina, toxina mojave, taipoxina e textilotoxina. Nos complexos onde as ligações são não covalentes, uma subunidade é a própria PLA₂, e as demais, molécula(s) “PLA₂-like”, com ou sem atividade catalítica (BON, 1997).

1.5.1- Atividade catalítica das Fosfolipases A₂

As PLA₂ são enzimas altamente solúveis em água, capazes de hidrolisar a ligação na posição sn-2 de fosfolípidios insolúveis em água (Figura 1). A atividade catalítica mais intensa é observada quando o substrato está na forma micelar (VERHEIJ et al., 1981), e apesar das PLA₂ exibirem preferências distintas entre grupos funcionais dos fosfolípidios, a eficiência catalítica é determinada através de propriedades físicas dos agregados fosfolipídicos, tais como densidade, temperatura de transição de fase, presença de outras moléculas etc (VERHEIJ et al., 1981; VERNON & BELL, 1992).

Baseado nas diferentes ligações interfaciais, a hidrólise pode ocorrer de acordo com dois modelos diferentes. No modelo “pure hopping”, a ligação e dissociação ocorrem durante o ciclo catalítico. No modelo “scooting”, a enzima permanece ligada à interface entre um ciclo e outro. As implicações destes modelos distintos para os efeitos farmacológicos ainda não estão claras.

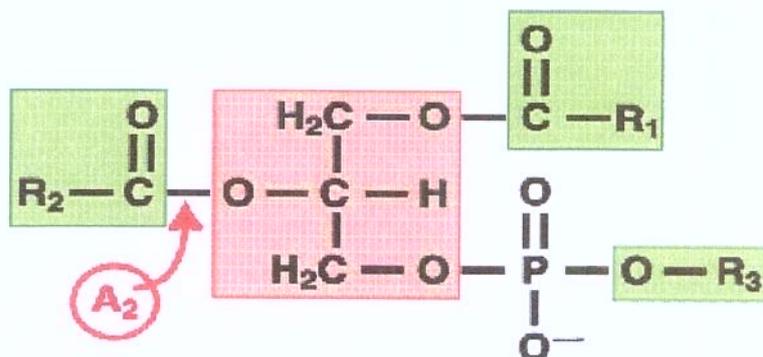


Figura 1- Hidrólise na posição *sn*-2 do fosfolipídio (Fonte: cd-rom illustrated lecture notes on tropical medicine)³.

1.5.2- “Sítios-Alvo” e Especificidade farmacológica das Fosfolipases A₂.

Apesar das PLA₂ serem responsáveis por um grande espectro de efeitos farmacológicos, cada PLA₂ é responsável por apenas um efeito, por exemplo, a β-bungarotoxina exerce seus efeitos somente sobre os sítios pré-sinápticos na transmissão de acetilcolina (STRONG *et al.*, 1976), mas não na adrenérgica, e de glutamato, mesmo em altas concentrações (ABE *et al.*, 1977). Similarmente, cada isoenzima do veneno de *Vipera russelli* é responsável por apenas um efeito farmacológico. Quando injetadas intraperitonalmente, uma induz hemorragia no fígado e no rim (VISHWANATH *et al.*, 1985), outra induz hemorragia no pulmão (KASTURI & GOWDA, 1989), e outra provoca efeitos neurotóxicos (GOWDA, comunicação pessoal).

³ Mode of action of phospholipase A1, A2, C en D, components of snake, Copyright ITM. Disponível em: www.itg.be/.../imagehtml/ppages/CD_1063_010c.htm

Para explicar a susceptibilidade de um órgão a uma determinada PLA₂, foi proposto a presença de ‘sítios-alvo’ na superfície de células ou tecidos (KINI & EVANS, 1989). Estes sítios são reconhecidos pelos ‘sítios farmacológicos’ nas moléculas das PLA₂s, que são independentes do sítio catalítico da enzima, podendo algumas vezes sobrepor-se a estes últimos (ROSENBERG, 1986). Os sítios-alvo e os farmacológicos são mutuamente complementares em termos de cargas, hidrofobicidade e contatos superficiais por forças de van der Waal, e a alta afinidade entre eles determina a especificidade do efeito farmacológico (KINI & EVANS, 1989).

Os sítios-alvo citados acima poderiam ser lipídios ou proteínas (glicoproteínas) de membrana (Figura 2). De acordo com o modelo sugerido, as afinidades de interações, PLA₂ - proteína-alvo e PLA₂-fosfolipídio ocorrem em escala nanomolar e micromolar, respectivamente. Tal diferença de magnitude entre essas interações explica porque a interação da PLA₂ - proteína-alvo governa a especificidade do efeito farmacológico (KINI & EVANS, 1989). Contudo, os fosfolipídios nas proximidades das proteínas-alvo poderiam contribuir com o efeito farmacológico. É importante notar que diferentes PLA₂s podem exibir um mesmo efeito farmacológico por mecanismos distintos. Para isso, é necessária a presença de diferentes sítios -alvo responsáveis por este efeito (KINI, 2003).

Várias PLA₂s e proteínas-alvo foram isoladas e identificadas por pesquisadores, que demonstraram a ligação específica entre as mesmas (REHM & BETZ, 1982, 1984; OTHMAN et al., 1982; TZENG et al., 1986; BLACK et al., 1988; LAMBEAU et al., 1989, 1990; STEFANSSON et al., 1990; KRIZAJ et al., 1994, 1995, 1997; KERNS et al., 1999; KRIZAJ & GUBENSEK, 2000). Um exemplo a ser citado é o fator de coagulação Xa, que é uma proteína alvo para uma PLA₂ com atividade anticoagulante (STEFANSSON et al., 1989 e 1990; EVANS & KINI, 1997; MOUNIER et al., 1998; KERNS et al., 1999).

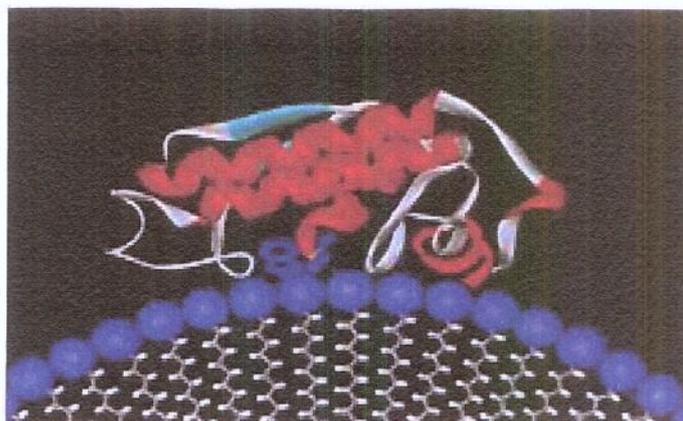


Figura 2- Interação da PLA₂ com o sítio-alvo na membrana plasmática
(Fonte: ZHAO et al.,2004).

1.5.3- Atividade Catalítica das Fosfolipases A₂ e Efeitos farmacológicos

Nos mecanismos que dependem da atividade catalítica, a hidrólise dos fosfolipídios e a liberação de produtos, como, lisofosfolipídios e ácidos graxos (Figura 3) são responsáveis pelo efeito farmacológico (KINI & EVANS, 1989). Nos mecanismos que independem dessa atividade, a hidrólise catalítica dos fosfolipídios também ocorre, porém, apenas nas proximidades das proteínas-alvo, não interferindo nos efeitos farmacológicos (STEFANSSON et al., 1990; EVANS & KINI, 1997; MOUNIER et al., 2000). Em alguns casos, o efeito farmacológico é devido à uma combinação de ambos mecanismos, dependente e independente da atividade catalítica (KINI & EVANS, 1995). Por esta razão é difícil determinar o papel da referida atividade na indução dos efeitos farmacológicos (KINI, 2003).

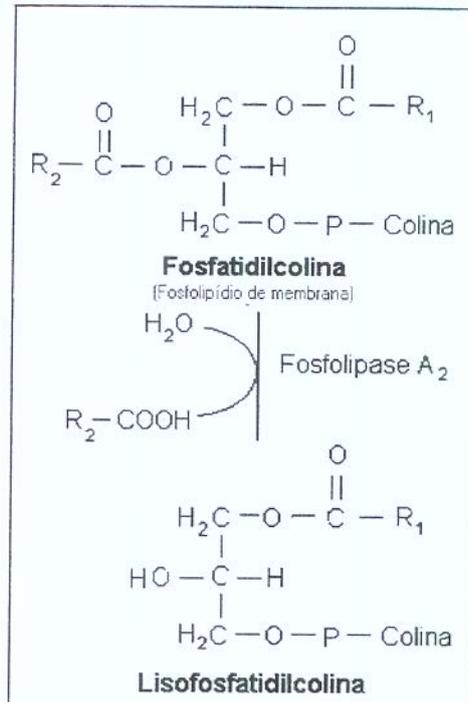


Figura 3- Atividade enzimática da PLA₂ sobre os fosfolípidos de membrana.
(Fonte: MAYES, 2002)

No entanto, a importância da atividade catalítica pode ser esclarecida por diferentes metodologias, a saber:

➤ *Uso de quelantes ou íons metais bivalentes.*

Visto que o Ca²⁺ é indispensável na atividade catalítica das PLA₂s, a sua remoção através do uso de EDTA (quelante) inibe totalmente a atividade enzimática (KINI & EVANS, 1988). Por outro lado, os íons Ca²⁺ são passíveis de substituição por outros íons metais, tais como Ba²⁺ e Sr²⁺ (KELLY, et al., 1979), embora algumas vezes, o íon substituído não seja tão eficiente na ativação catalítica, quanto o íon Ca²⁺.

Os efeitos farmacológicos independentes da atividade catalítica, em nada são influenciados com o uso de quelantes ou íons, porém, o mesmo não pode ser dito para os efeitos que dependem de catálise (KINI, 2003).

➤ *Uso de inibidores específicos das PLA₂s.*

A Histidina-48 (Figura 4), aminoácido presente nas PLA₂s, tem um papel significativo na hidrólise dos fosfolipídios (SCOTT, 1997), sua alquilação pelo brometo de *p*-bromofenacil ou pelo metil *p*-nitrobenzenosulfonato conduz à perda completa da atividade catalítica, permitindo identificar a participação ou não da atividade enzimática no efeito farmacológico (YANG & KING, 1980; VERHEIJ et al., 1980).

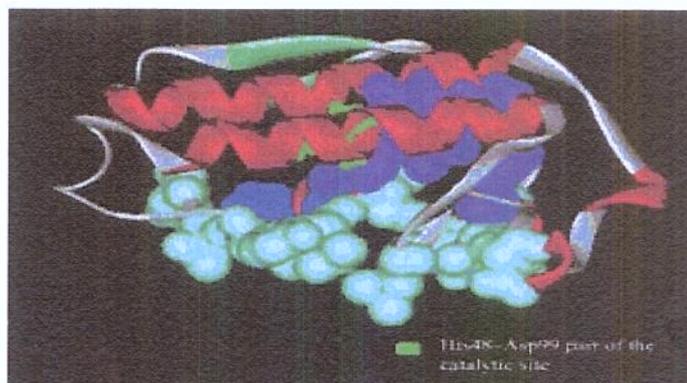


Figura 4- Sítio ativo da Histidina na PLA₂ (Fonte:ZHAO et al., 2004).

Geralmente, existe uma tendência em correlacionar a habilidade hidrolítica *in vitro* das PLA₂s com seus efeitos farmacológicos. Esta é uma conduta equivocada, pois *in vivo* a atividade catalítica é grandemente influenciada por vários fatores, tais como, a preferência de ligação às proteínas específicas, presença de diferentes classes de fosfolipídios nas proximidades de proteínas-alvo, e habilidade de penetração das PLA₂s (ROSENBERG, 1979, 1986, 1997).

A penetrabilidade das PLA₂s é particularmente importante, tanto nos efeitos farmacológicos dependentes como independentes da atividade catalítica.

Grande parte das PLA₂s básicas apresenta maior poder de penetração quando comparadas às neutras e ácidas (VERHEIJ et al., 1980a), provavelmente devidas à abundância de resíduos positivos, o que lhes conferem maior potência na indução de efeitos farmacológicos, como, danos teciduais, toxicidade etc. No entanto, é importante ter em mente que, a basicidade e penetrabilidade, não são as únicas variáveis que determinam a potência farmacológica (KINI, 2003).

1.6- Fosfolipídios das Membranas Plasmáticas

As membranas plasmáticas são estruturas organizadas constituídas principalmente de proteínas e lipídios. As fosfatidilcolinas são fosfoacilgliceróis que contêm colina, e constituem os fosfolipídios mais abundantes das membranas celulares. Nos processos fisiológicos, os fosfolipídios são ativamente catalisados em virtude da presença de enzimas que promovem a catálise parcial seguida de ressíntese. As PLA₂s, como já referidas anteriormente, catalisam a hidrólise da ligação éster da posição β (C₂) dos glicerofosfolipídeos para formar um ácido graxo livre e um lisofosfolipídeo, o qual por sua vez pode ser reacilado pela acil-CoA na presença de uma aciltransferase. Alternativamente, o lisofosfolipídeo (por exemplo, a lisolecitina) é atacado pela lisofosfolipase, que remove o grupo 1-acila remanescente para formar a base gliceroil-fosforil correspondente. Essa última é cindida por uma hidrólise liberando o glicerol-3-fosfato mais base (Figura 5). A lisolecitina (lisofosfatidilcolina) pode ser formada ainda por uma via que envolve a lecitina: colesterol-aciltransferase (LCAT). Esta enzima, encontrada no plasma e sintetizada no fígado, catalisa a transferência de um resíduo de ácido graxo da posição 2 da lecitina para o colesterol formando o éster do colesterol das lipoproteínas plasmáticas e lisolecitina (MAYES, 2002).

Nos envenenamentos ofídicos, que envolvem a PLA₂ com atividade hemolítica, a hidrólise da ligação 2-acila das fosfatidilcolinas (e fosfatidiletanolaminas) libera ácidos graxos e lisofosfolipídeos. Os fosfolipídios (por exemplo, as lisolecitinas) são compostos tenso-ativos que, mesmo em doses pequenas alteram a permeabilidade das membranas celulares, produzindo hemólise indireta. As PLA₂s, todavia, com raras exceções

(por exemplo, a crotoxina) não produzem hemólise *in vivo*. No caso dos venenos de abelhas, a atividade hemolítica da PLA₂ é reforçada pela melitina, também presente neste veneno (VITAL BRAZIL, 1982).

Nos sistemas *in vitro*, essas enzimas não atuam em eritrócitos lavados, pois as porções hidrofóbicas dos lipídeos da membrana, ao contrário das lipoproteínas séricas, não são acessíveis. Algumas substâncias como a gramicidina S, copolímeros sintéticos básicos de α -aminoácidos (poli-Orn-Leo, poli-Orn-Leo-Alfa e poli-Lis-Leo) e o Fator Lítico Direto (FLD) facilitam a ação das PLA₂s com atividade hemolítica. Estes compostos básicos atacam a membrana por atração eletrostática e expõem os fosfolipídeos das membranas celulares às PLA₂s (VITAL BRAZIL, 1982).

As membranas das plaquetas são mais suscetíveis ao veneno da *Vipera russelli* do que as membranas dos eritrócitos. A alta suscetibilidade dos fosfolipídeos de membrana das plaquetas em comparação com a dos eritrócitos sugere que o arranjo dos lipídeos seja diferente nestes dois tipos de células. Portanto, o rompimento das células depende de muitos fatores, como o tipo de células envolvidas, presença de fosfolipídios, FLD, dentre outros (VARANDA e GIANINI, 1994).

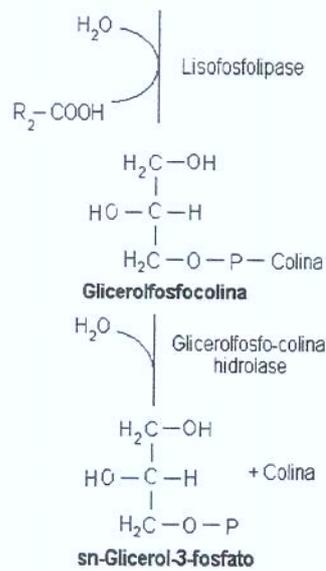
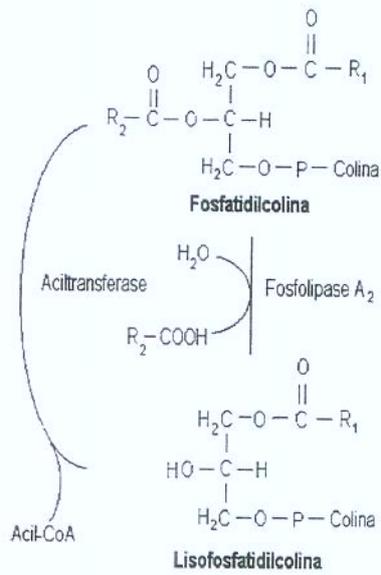


Figura 5- Metabolismo das fosfatidilcolinas na membrana plasmática.
 (Fonte: MAYES, 2002).

1.7- Principais Atividades Fisiopatológicas dos Venenos Botrópicos

De modo didático, são descritas três atividades fisiopatológicas dos venenos botrópicos: proteolíticas, mais bem definidas como inflamatória aguda, coagulante e hemorrágica (ROSENFELD, 1971). Evidentemente, essas atividades são extremamente complexas, e podem, usualmente, ser atribuídas a componentes específicos. No entanto, diferentes toxinas podem atuar sinergicamente para induzir um efeito, e uma dada toxina pode ter várias atividades (FRANÇA & MÁLAQUE, 2003).

✓ **Atividade Inflamatória aguda**

A atividade inflamatória aguda é causada por um conjunto de frações do veneno botrópico, bioquimicamente heterogêneas, com especificidades diversas, responsáveis pelos fenômenos locais. São exemplos: aminas biogênicas pré-formadas do tipo histamina, pequenos peptídeos ou proteínas como a PLA₂, esterases, proteases, enzimas liberadoras de cininas (calicreínas, cininogenases) e lectinas. As frações do veneno, freqüentemente, têm atividade indireta, induzindo ou liberando potentes autacóides, como a bradicinina, prostaglandinas, leucotrienos, prostaciclina, que atuam de maneira complexa e interrelacionada.

É necessário ressaltar que na indução do processo inflamatório local agudo há a participação da atividade coagulante desencadeando a formação de trombos na microvasculatura, com conseqüente hipóxia, agravamento do edema e necrose tecidual e, que a atividade hemorrágica, determinada por hemorraginas, pode ampliar o quadro inflamatório, através da sua atividade sobre o fator de necrose tumoral (FNT) pré-formado, liberando a citocina ativa que tem potente atividade inflamatória (FRANÇA & MÁLAQUE, 2003).

✓ **Atividade sobre a Coagulação e Plaquetas**

O veneno botrópico possui capacidade de ativar fatores de coagulação sanguínea, ocasionando consumo de fibrinogênio e formação de fibrina intravascular, induzindo freqüentemente, incoagulabilidade sangünea. A maioria das serpentes do gênero *Bothrops* possui, isolada ou simultaneamente, substâncias capazes de ativar fibrinogênio,

protrombina e fator X. Em estudos comparativos realizados com venenos de *Bothrops* sp foram encontradas variações na intensidade da atividade coagulante em diferentes espécies e subespécies. Embora já tenha sido observado *in vitro* efeito anticoagulante, em alguns casos, esse achado parece não apresentar importância maior no acidente humano. Trombocitopenia pode ocorrer nas primeiras horas e, eventualmente, persistir por dias (FRANÇA & MÁLAQUE, 2003).

✓ **Atividade hemorrágica**

É atribuída fundamentalmente a componentes específicos, denominados hemorraginas, metaloproteinases que contêm zinco. As hemorraginas podem romper a integridade do endotélio vascular e têm atividade desintegrina. Degradam vários componentes da matriz extracelular, como o colágeno tipo 4, fibronectinas e laminina. Além disso, são potentes inibidoras da agregação plaquetária. Têm como possíveis mecanismos de ação a digestão enzimática da lâmina basal da microcirculação, e ruptura completa das células endoteliais ou formação de “gaps”. As clivagens específicas em pontos-chave desencadeariam mecanismos endógenos amplificadores, sendo que, atualmente, há clara evidência de ataque proteolítico à lâmina basal vascular (BJARNASON & FOX, 1988/1989; KAMIGUTI et al., 1994).

1.8- *Bothrops lanceolatus*

A *Bothrops lanceolatus* (Figura 6), serpente de grande porte, que habita as regiões úmidas da Ilha de Martinica, no Caribe (CAMPBELL & LAMAR, 1989), é responsável por cerca de 20 acidentes por ano (THOMAS et al., 1995, 1998). O veneno desta espécie possui atividade caseinolítica, fosfolipásica, esterásica e hemorrágica (LÔBO de ARAÚJO et al., 1989). Algumas das enzimas responsáveis por estas atividades já foram isoladas e caracterizadas. A primeira delas, a fosfolipase, foi caracterizada como ácida e não tóxica em camundongos e pintainhos (LÔBO de ARAÚJO et al., 1994), sendo a primeira fosfolipase anticoagulante descrita nos venenos botrópicos (LÔBO de ARAÚJO et al., 2001). Também foi isolada uma enzima fibrino(geno)lítica, de 38,1 kDa, capaz de

degradar as cadeias α e β do fibrinogênio (LÔBO de ARAÚJO et al., 1998). Dando continuidade à caracterização desta proteína, recentemente, foi determinada, por espectrofotometria de massa, a seqüência de aminoácidos e sua atividade direta sobre o substrato cromogênico (S2251), específico para plasmina, indicando-a como uma enzima plasmina “símile” (SANT’ANA et al., submetido).

O veneno de *B. lanceolatus*, quando injetado em patas de camundongos, produz edema, acompanhado de infiltrado leucocitário (LÔBO de ARAÚJO et al., 2000). Em patas de ratos, o tratamento físico (calor) (FARIA et al., 2001), ou químico (EDTA) do veneno, reduz o edema e a hemorragia. Em ambos os casos, o edema ocorre com liberação de metabólitos do ácido araquidônico, pela via da lipoxigenase, bem como da histidina, bradicinina, e serotonina (GUIMARÃES et al., 2004). Ainda em relação ao processo inflamatório, o veneno de *B. lanceolatus* induz migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal de camundongos, corroborando quanto à participação desta via no processo inflamatório (ARRUDA et al., 2003). Também, o veneno de *B. lanceolatus* produz contratura e bloqueio neuromuscular em preparações biventer cervicis de pintainhos e diafragma isolado de camundongos. A ação neuromuscular também foi demonstrada com a fração caseinolítica, de 27,5 kDa, isolada a partir deste veneno, e esta proteína apresentou ação exclusivamente pós-sináptica (LÔBO de ARAÚJO et al., 2002). A ação nos receptores colinérgicos nicotínicos pós-sinápticos foi confirmada utilizando o veneno total, em placa terminal em miniatura, onde se observou progressivo decréscimo na amplitude e na frequência dos potenciais. Esses efeitos foram revertidos tanto pela neostigmina como pela 4-aminopiridina (RIBEIRAL et al., 2004). Uma outra fração protéica, de 28 kDa, foi isolada do veneno de *B. lanceolatus* e identificada como uma metaloproteinase hemorrágica, denominada B1aH1, cujas atividades assemelham-se às outras hemorraginas isoladas de veneno botrópico (STROKA et al., 2005).



Figura 6- *Bothrops lanceolatus* (Fonte: CAMPEBELL & LAMAR, 1989).

2- OBJETIVOS

Os objetivos deste trabalho foram:

- Avaliar o potencial de hemólise indireta *in vitro* do veneno total de *B. lanceolatus* em hemácias de diferente espécies animais;
- Verificar a influência da concentração do veneno sobre a atividade hemolítica expressa;
- Verificar a influência do fator físico, temperatura, e do fator químico, brometo de p-bromofenacil, sobre a atividade hemolítica indireta *in vitro*.
- E, por fim, identificar o componente responsável por esta atividade, bem como suas características imunológicas, utilizando cromatografias de exclusão e de troca iônica, e ensaios imunoquímicos.

3- MATERIAL E MÉTODOS

3.1- MATERIAL

3.1.1- Veneno

O veneno de *Bothrops lanceolatus* (VBL) foi gentilmente cedido pela “Unité des Venins” do Instituto Pasteur (Paris – França). A solução mãe de VBL (10.000µg/ml) foi preparada em salina 0,9%, tamponada com fosfato de sódio 0,01M pH 7,2 (PBS).

3.1.2- Hemácias

As hemácias foram obtidas do sangue de carneiro (Biotério Boa Vista), boi, cavalo (matadouro de Pedreira), e rato “Wistar” (Centro de Bioterismo da Unicamp).

3.1.3- Reagentes

Ácido Acético, Formato de Amônio (Prolabo); Cloreto de Sódio, Fosfato de Sódio Monobásico Monohidratado (J.T.Baker); Fosfato de Sódio Dibásico Anidro (Synth); Brometo de p-Bromofenacil (Sigma); Sephadex G-50 (Pharmacia) e CM 52 (Whatman Biochemicals Ltd).

3.1.4- Análise estatística

Os resultados foram representados pela média \pm erro padrão da média (EPM). A significância das diferenças entre os grupos e tratamentos foi avaliada utilizando-se a análise de variância (ANOVA) seguido pelo teste de Tukey.

3.2- MÉTODOS

3.2.1- Atividade hemolítica indireta *in vitro* do veneno de *B. lanceolatus* em diferentes espécies animais

O efeito hemolítico do veneno total de *B. lanceolatus* foi estimado utilizando-se hemácias lavadas, e suplementadas com gema de ovo conforme descrito por GUTIERREZ et al., (1984). A suspensão de hemácias foi obtida do sangue de diferentes

espécies (rato, carneiro, boi e cavalo), por punção venosa com solução de Alsever como anticoagulante. Ensaios preliminares foram realizados, para padronização da concentração mais adequada do veneno a ser utilizada.

O plasma foi separado por centrifugação e as hemácias lavadas 3 vezes em salina tamponada com PBS, para eliminação de todo e qualquer fator sorológico, sobre o qual o veneno pudesse vir a exercer alguma ação biológica. Após a lavagem, as hemácias foram suspensas a 2,5% no mesmo tampão.

Para este ensaio, 50µl do veneno diluído (400µg/ml), também em PBS, mais 50µl de uma suspensão de gema de ovo (1 gema em 100ml de PBS) foram adicionados a 600µl da suspensão de hemácias lavadas, sendo o volume final ajustado para 3ml. A concentração final do veneno após diluição na suspensão de hemácia correspondia a 6,7µ/ml. Após 30min de incubação a 37°C, os tubos foram centrifugados por 10 minutos a 600xg, e os sobrenadantes lidos a 540nm.

As amostras foram comparadas ao controle negativo, incubado sem o veneno, e ao hemolisado, constituído por H₂O destilada no lugar do tampão.

A atividade hemolítica foi expressa em valores relativos (%).

3.2.2- Influência da Concentração sobre a Atividade hemolítica indireta *in vitro* do veneno de *B. lanceolatus*

O ensaio hemolítico foi realizado como descrito anteriormente (3.2.1), utilizando 50µl das amostras de veneno (300, 400, 500, 600, 700 e 800µg/ml), que foram adicionadas a suspensão de hemácias do sangue de carneiro. A concentração final do veneno após diluição na suspensão de hemácia correspondia a 5,0; 6,7; 8,3; 10,0; 11,7; 13,3µ/ml respectivamente.

Optou-se pelas hemácias de carneiro para dar continuidade aos demais experimentos hemolíticos, devido à prática comum de seu uso em ensaios sorológicos, e por ser o laboratório fornecedor dessas, de alta capacitação e qualificação em suas

atribuições, permitido assim, a confiabilidade nos resultados. Deste modo, as concentrações de veneno foram ajustadas de maneira a se obter o protocolo mais adequado.

3.2.3- Influência da temperatura na atividade hemolítica indireta *in vitro* do veneno de *B. lanceolatus*

O veneno de *B. lanceolatus* (600µg/ml) foi submetido a diferentes temperaturas, (25, 40, 50 e 70°C) por 30min, e em seguida o ensaio hemolítico foi processado como descrito anteriormente (3.2.1). A concentração final do veneno após diluição na suspensão de hemácia correspondia a 10,0µ/ml.

3.2.4- Inibição da atividade fosfolipásica do veneno de *B. lanceolatus*.

A inibição da atividade fosfolipásica do veneno de *B. lanceolatus* com brometo de p-bromofenacil foi realizada conforme o método descrito por Nishida et al. (1985).

O veneno total (800µg/ml) foi dissolvido em soro fisiológico. A 900µl desta solução foi adicionado 100µl de solução alcoólica de brometo de p-bromofenacil (800µg/ml) e incubada durante 1 hora a 37°C. Para o ensaio de Cinética da Atividade fosfolipásica, uma alíquota de 40µl da solução de veneno previamente incubado foi adicionada a 200µl de solução salina contendo gema de ovo (1 gema para 1000ml de salina) e Ca^{2+} 2mM.

A amostra controle foi realizada sem a solução de brometo de p-bromofenacil. Após o período de incubação as amostras foram lidas durante 40min a 750nm, com intervalos de 5min, a 37°C.

3.2.5- Determinação da atividade hemolítica indireta *in vitro* após inibição da atividade fosfolipásica do veneno de *B. lanceolatus*.

A determinação da atividade hemolítica do veneno de *B. lanceolatus* após o tratamento com brometo de p-bromofenacil (3.2.4), foi realizada como descrito anteriormente (3.2.1), utilizando 50µl do veneno (720µg/ml). A concentração final do veneno após diluição na suspensão de hemácia correspondia a 12µ/ml.

3.2.6- Isolamento e Purificação da fosfolipase do veneno de *B. lanceolatus*

O isolamento e caracterização do veneno de *B. lanceolatus* foram realizados de acordo com Lôbo de Araújo et al. (1994).

Cromatografia de exclusão:

O veneno liofilizado (2g) de *B. lanceolatus* foi dissolvido durante uma hora de agitação a 4°C em 65ml de ácido acético 5% pH 2,3. Após a eliminação do precipitado por centrifugação a 3020xg, durante 30min. a 4°C, o sobrenadante foi aplicado à coluna (5x120cm) de Sephadex G-50 previamente equilibrada a 4°C com a mesma solução. O material foi eluído a uma velocidade de 50ml/hora, coletando-se amostras de 15ml/tubo. A absorbância das amostras foi medida a 280nm, utilizando cubetas de quartzo de 1 cm de caminho óptico. As atividades fosfolipásicas e TAME-esterásicas foram analisadas individualmente em cada amostra, utilizando-se os substratos lecitina de ovo e TAME, respectivamente. As frações foram agrupadas, liofilizadas e conservadas a -20°C em frascos hermeticamente fechados.

Cromatografia de Troca Iônica:

A fração 3 (F₃) (500mg) obtida da cromatografia em Sephadex G-50 da primeira etapa do fracionamento foi solubilizada em 140ml de tampão formato de amônio 50mM pH 4,0 e centrifugada a 3020xg, durante 30min. a 4°C. O sobrenadante foi aplicado à coluna (4 x 15 cm) de CM-celulose (CM 52) equilibrada a 4°C. A eluição do material foi

iniciada com o tampão formato de amônio 50mM pH 4,0 em volume 2 vezes superior ao da coluna seguida de um gradiente linear de NaCl de 0 a 0,5M dissolvido no mesmo tampão. As amostras de 20 ml/tubo foram coletadas numa velocidade de 90 ml/hora, e as absorbâncias determinadas a 280nm. As atividades enzimáticas foram medidas como Na cromatografia anterior (de exclusão). A fração que apresentou atividade fosfolipásica foi liofilizada e conservada a -20°C. A fração F₃₁, com atividade fosfolipásica, obtida da cromatografia em CM 52 foi refiltrada em Sephadex G-50, nas mesmas condições descritas na primeira etapa do fracionamento. A fração F₃₂, contendo a fosfolipase foi agrupada e liofilizada.

3.2.7- Testes Imunoquímicos de Imunodifusão e Imunoelektroforese

Na técnica de imunodifusão as amostras foram analisadas em gel de agarose a 1% em meio salino segundo OUCHTERLONY (1967). A imunoelektroforese foi realizada conforme as indicações de GRABAR e BURTIN (1964) empregando-se placa de vidro (12x9cm) contendo uma camada de 1,5mm de agarose a 1% em tampão veronal 50mM pH 8,4 e um gradiente de potencial de 6 volts/cm durante 1 hora. Passado esse tempo a placa foi lavada com solução de NaCl 150mM, colocadas para secar a 37°C e coradas com solução de azul de comassie.

3.2.8- Determinação da atividade hemolítica indireta *in vitro* na fração fosfolipásica isolada do veneno de *B. lanceolatus*

A atividade hemolítica da fração fosfolipásica isolada do veneno de *B. lanceolatus* (1,47mg/ml) foi realizada conforme descrito por GUTIERREZ et al. (1984) (3.2.1), utilizando-se 10 µl de amostra. A concentração final da fração fosfolipásica após diluição na suspensão de hemácia correspondia a 5µg/ml.

4- RESULTADOS

4.1- Atividade hemolítica indireta *in vitro* do veneno de *B. lanceolatus* em diferentes espécies animais

Dentre as espécies animais estudadas, a atividade hemolítica do veneno de *B. lanceolatus* foi mais pronunciada quando analisada em hemácias de cavalo, e menos em hemácias de carneiro (Fig. 7).

4.2- Influência da Concentração sobre a Atividade hemolítica indireta *in vitro* do veneno de *B. lanceolatus*

A atividade hemolítica do veneno *B. lanceolatus* ocorreu de modo crescente, de acordo com a concentração utilizada (Fig. 8), e atingiu um platô da atividade hemolítica a partir da concentração de 10 µg/ml, com hemólise em torno de 95%.

4.3- Influência da temperatura na atividade hemolítica indireta *in vitro* do veneno de *B. lanceolatus*.

Conforme ilustrada na Figura 9, a atividade hemolítica do veneno *B. lanceolatus* mostrou-se bastante sensível à elevação da temperatura. A inibição a 40°C foi de aproximadamente 85%, e a partir de 50°C foi completa (100%).

4.4- Inibição da atividade fosfolipásica do veneno de *B. lanceolatus*.

A atividade fosfolipásica do veneno foi inibida em torno de 95% após tratamento com solução alcoólica de brometo de p-bromofenacil por 1 hora a 37°C. A média da velocidade máxima de reação das amostras do veneno inibido foi de $3,67 \pm 0,01$ Abs/min, e a do veneno não inibido foi de $74,02 \pm 0,01$ Abs./min (n=4). (Tabela 1)

4.5- Determinação da atividade hemolítica indireta *in vitro* após inibição da atividade fosfolipásica do veneno de *B. lanceolatus*.

Praticamente, toda a atividade hemolítica (em torno de 90%) foi inibida após o tratamento do veneno com a solução alcoólica de brometo de *p*-bromofenacil por 1 hora a 37°C (Fig. 15). Média ± E.P.M (n=4), p<0,05.

4.6- Isolamento e Purificação da fosfolipase do veneno de *B. lanceolatus*

A purificação da fração fosfolipásica do veneno de *B. Lanceolatus* apresentou o mesmo perfil cromatográfico e enzimático daquele anteriormente mostrado por Lôbo de Araújo, 1990.

Fig. 10: O perfil cromatográfico mostrou a existência de 4 frações designadas por F₁ a F₄. As atividades esterásica e fosfolipásica foram detectadas nas frações F₂ e F₃ respectivamente. A atividade fosfolipásica do veneno foi eluída como um pico simples (F₃) contaminado pela atividade TAME-esterásica oriunda da fração F₂. Essas frações foram agrupadas e liofilizadas.

Fig. 11: Entre as frações resultantes, uma foi proeminente, formando um largo pico. Nesta fração, denominada F₃₁, predominou a atividade fosfolipásica. Essa fração foi imediatamente liofilizada e submetida a gel filtração nas mesmas condições da primeira etapa do fracionamento.

Fig. 12: Nesta etapa foi obtido um pico estreito (F₃₂), onde se concentrou a atividade fosfolipásica, contaminada na fase ascendente com atividade TAME-esterásica do pico menor antecedente.

4.7- Testes Imunoquímicos de Imunodifusão e Imunoelektroforese

Os resultados obtidos com o veneno de *B. lanceolatus* e a fração fosfolipásica (F32) em imunodifusão mostraram que o anti-soro identificou diferentes componentes no veneno total e aparentemente apenas um componente na fração fosfolipásica. (Fig. 13).

O mesmo sistema analisado por imunoelektroforese mostrou que apesar da complexidade de linhas precipitantes entre o veneno total e o anti-soro, a fração fosfolipásica apresentou um sistema precipitante principal e um segundo interno, em baixa concentração (Fig. 14).

4.8- Determinação da atividade hemolítica indireta *in vitro* da fração fosfolipásica isolada do veneno de *B. lanceolatus*.

A fração fosfolipásica do veneno de *B. lanceolatus* hemolisou 100% da suspensão de hemácias de carneiro (Fig. 15).

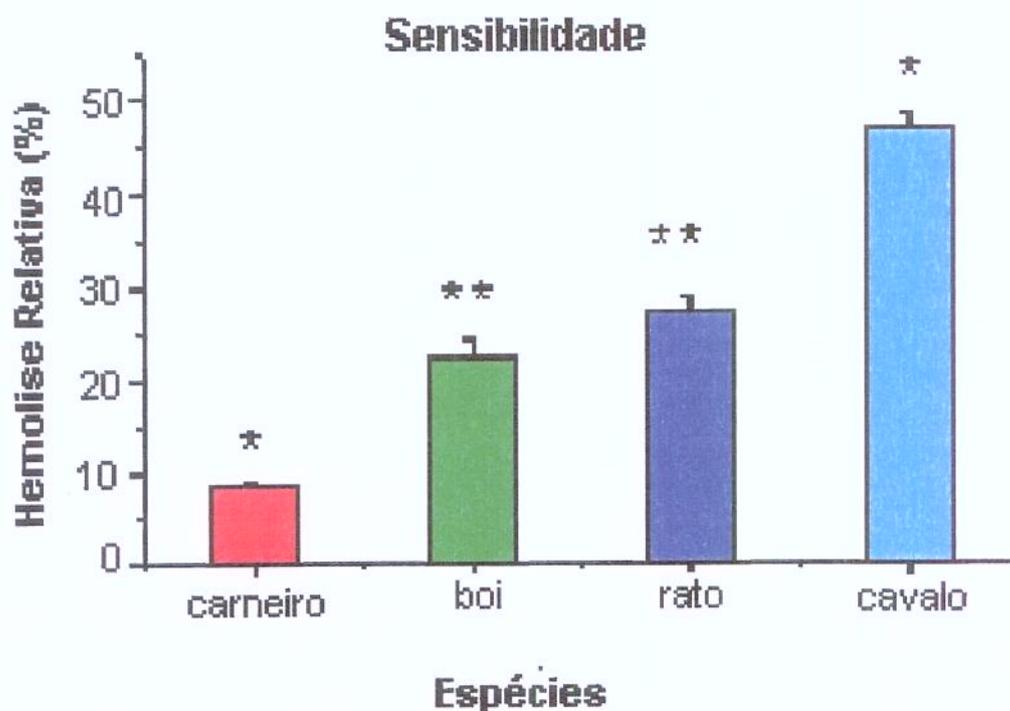


Figura 7- Efeito do veneno de *B. lanceolatus* ($6,7\mu\text{g/ml}$) sobre a suspensão de hemácias de diferentes espécies animais (2,5%) em PBS pH 7,2, contendo gema de ovo. Cada coluna representa a média \pm E.P.M (n=4). Teste ANOVA e Tuckey, com $p<0,05$.

*Significativamente diferente dos demais.

**Significativamente diferente do carneiro e cavalo.

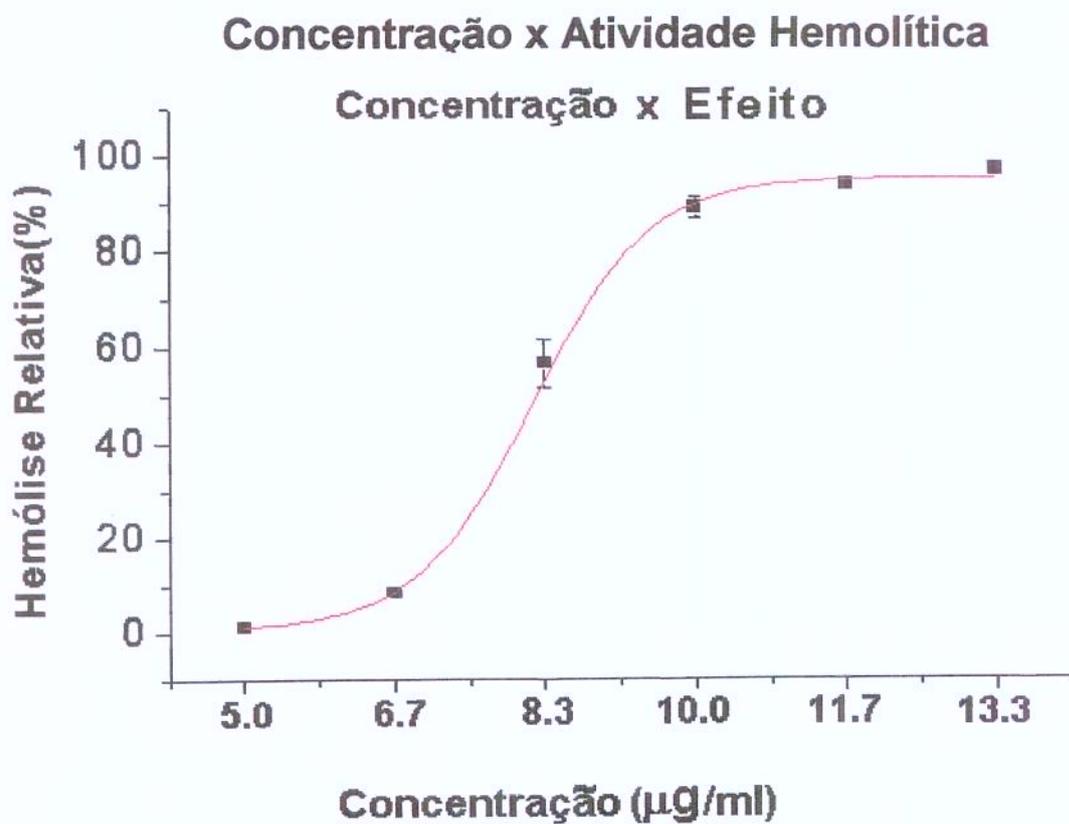


Figura 8- Influência de diferentes concentrações do veneno de *B. lanceolatus* sobre a suspensão de hemácias de carneiro (2,5%) em PBS pH 7,2, contendo gema de ovo. Cada ponto representa a média \pm E.P.M (n=4).

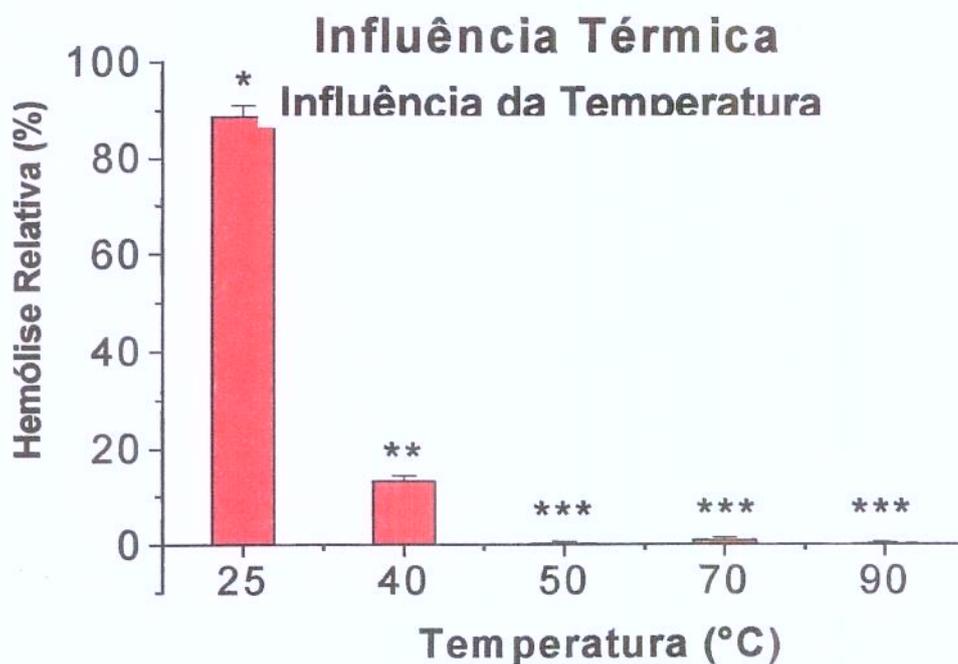


Figura 9- Efeito da temperatura sobre a atividade hemolítica induzida pelo veneno de *B. lanceolatus* (10,0µg/ml) sobre suspensão de hemácias de carneiros (2,5%) em PBS pH7,2, contendo gema de ovo. Cada coluna representa a média ± E.P.M (n=4). Teste ANOVA e Tuckey, com $p < 0,05$.

*Significativamente diferente dos demais.

**Significativamente diferente dos demais.

**Significativamente diferente de 25 e 40°C.

Tabela 1- Inibição da atividade fosfolipásica do veneno total de *B. lanceolatus* com brometo de p-bromofenacil. Resultados da média \pm E.P.M (n=4), Teste ANOVA e Tukey, com $p < 0,05$.

Velocidade Máxima de Reação (Abs/min)	
Veneno Total não inibido	Veneno Total Inibido
*74,02	3,67

- Significativamente diferente da velocidade Máxima de Reação, exercida pelo Veneno Total Inibido.

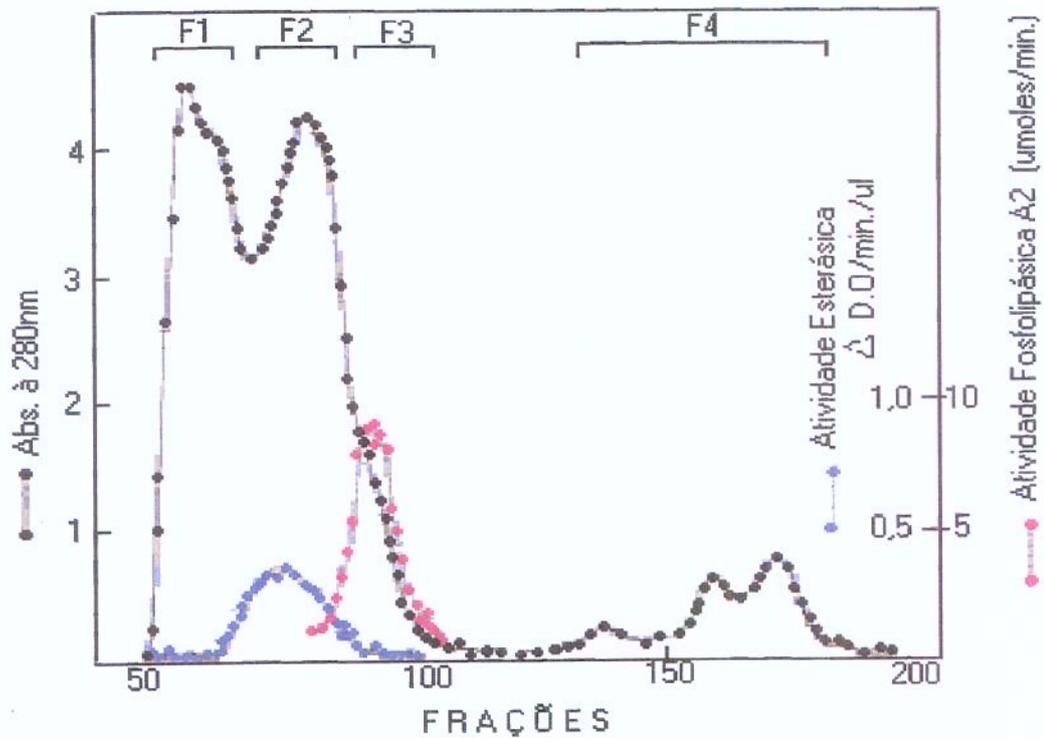


Figura 10- Cromatografia de Exclusão em Sephadex G-50 do veneno de *B. lanceolatus* em ácido acético 5% pH 2,3 a 4°C; coluna 120x5,0 cm; fluxo 50ml / h e coletado 15 ml / tubo.

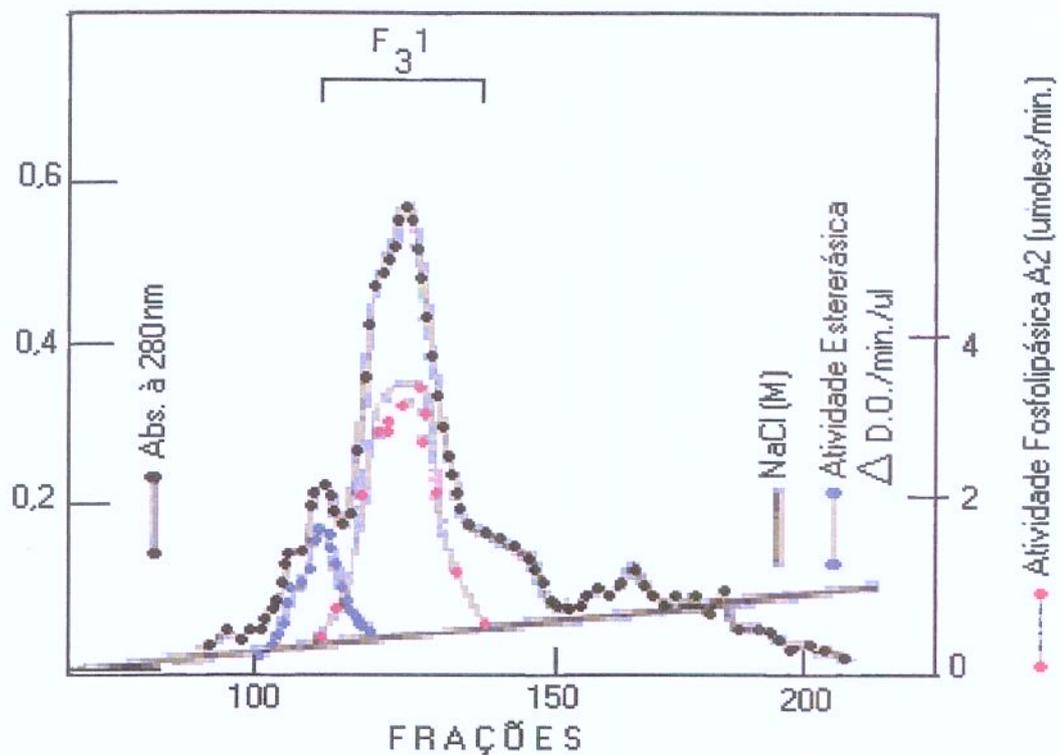


Figura 11- Cromatografia de Troca Iônica em CM-celulose da fração F₃ (Figura 10) em formato de amônio 50mM pH 4.0 a 4°C; coluna 15x4 cm; fluxo 90ml/h e coletados 20ml / tubo. A eluição foi realizada com um sistema tampão em gradiente linear de NaCl.

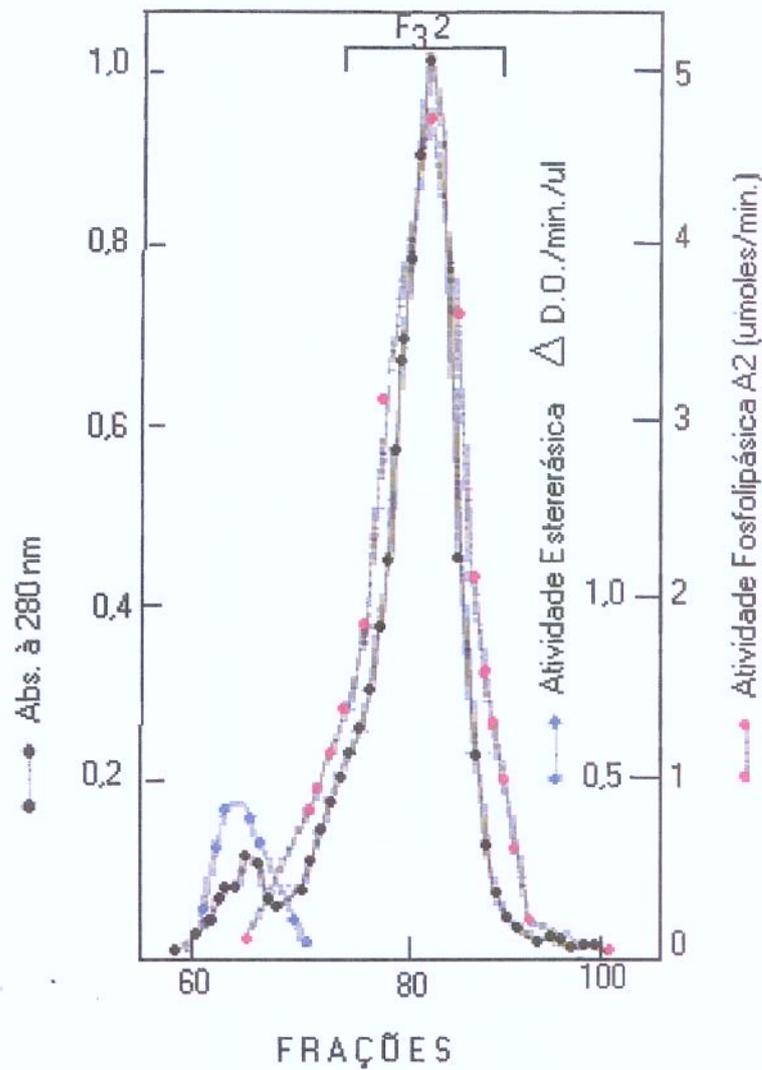


Figura 12- Refiltração em Sephadex G-50 da fração F₃₁ (Fig. 11). Condições idênticas às da Fig. 10.

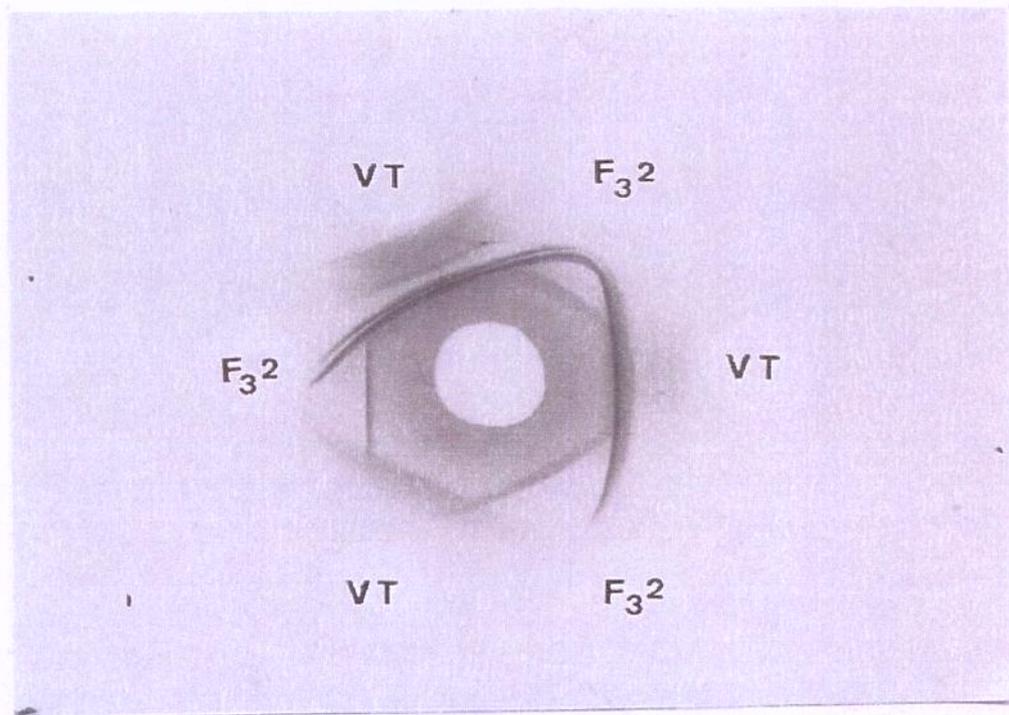


Figura 13- Imunodifusão em gel de agarose a 1% em meio salino: análise comparativa entre o veneno total (VT) e a fração fosfolipásica (F₃₂) frente ao anti-soro de *B. lanceolatus*, utilizando-se diferentes concentrações do antígeno, a saber: 100, 500 e 1000 µg/ml.

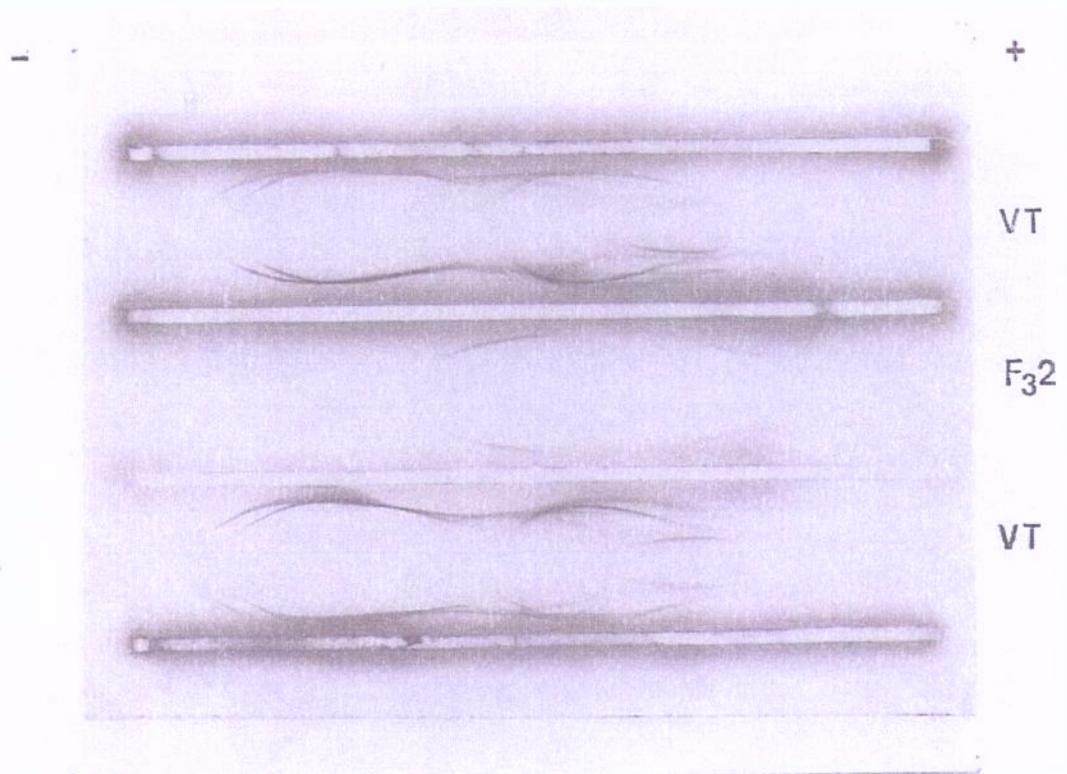


Figura 14- Imunoeletroforese em gel de agarose a 1% em tampão veronal 50mM pH 8,4. Análise comparativa entre o veneno total (VT) e a fração fosfolipásica (F₃₂) frente ao anti-soro de *B. lanceolatus*. Concentração dos antígenos 2mg/ml.

Atividade Hemolítica induzida pela fosfolipase A₂ do veneno de *B. lanceolatus*

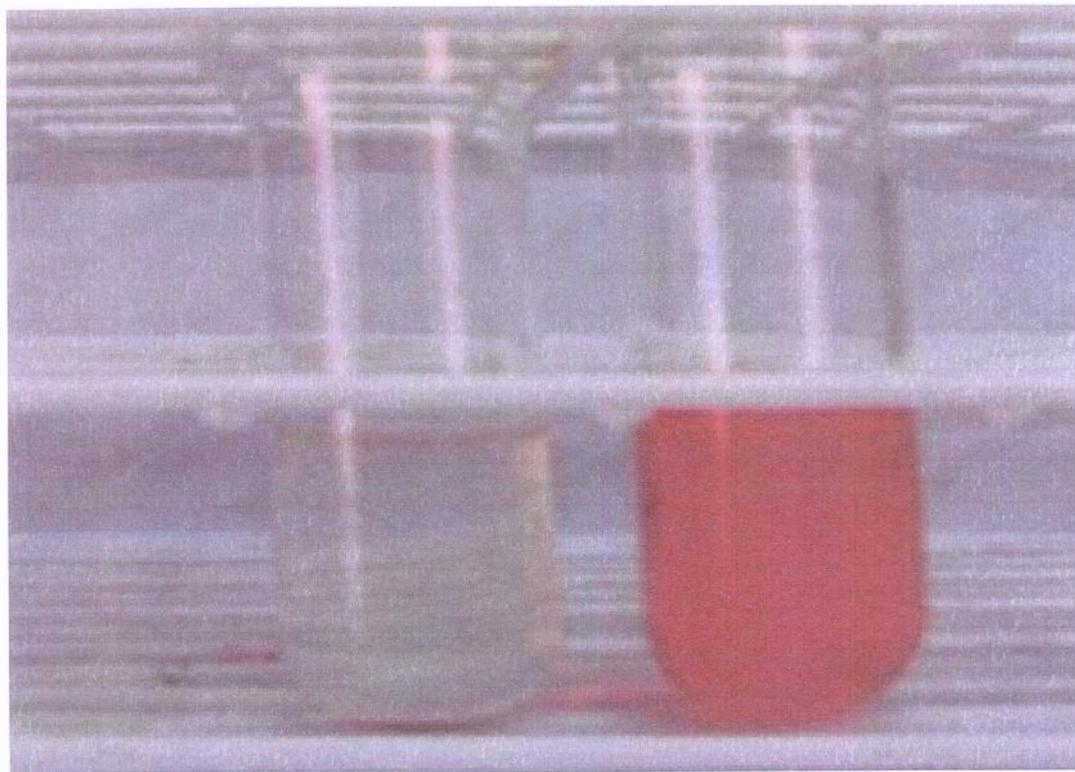


Figura 15- Atividade Hemolítica induzida pela fração fosfolipásica (5µg/ml) de *B. lanceolatus* sobre suspensão de hemácias de carneiro (2,5%) em PBS pH 7,2, contendo gema de ovo. Tubo da esquerda: (controle), tubo da direita: (fração fosfolipásica).

5- DISCUSSÃO

O veneno de *Bothrops lanceolatus* quando comparado com outras espécies de *Bothrops* brasileiras apresentou alta atividade caseinolítica, hemorrágica, fosfolipásica e esterásica sobre TAME (LÔBO de ARAÚJO et al., 1989). Esses achados foram decisivos para o prosseguimento dos trabalhos com este veneno.

Também neste veneno, a exemplo do que ocorre com outros venenos de serpentes viperídicas, foi detectada atividade hemolítica indireta (LOBÔ de RARÚJO, tese de doutorado, 1990). Sabendo que essa atividade poderia estar relacionada à atividade fosfolipásica, foi realizado isolamento dessa fração e análise de suas propriedades. Para isso, foi utilizada cromatografia de exclusão e troca iônica, etapas essas realizadas anteriormente por Lôbo de Araújo (1994).

No presente trabalho foi analisada a atividade hemolítica no veneno total e na fração fosfolipásica.

Tanto o veneno total quanto a fração isolada foram capazes de induzir atividade hemolítica indireta *in vitro*, sendo essa mais pronunciada na fração fosfolipásica. Este resultado está de acordo com França e Málaque (2003), quando verificaram atividade hemolítica em alguns venenos botrópicos, bem como, quando Ketelhut et al. (2003) também a relatou na isoforma SIIISPIIB do veneno de *B. jararacussu*. Tal semelhança já havia sido igualmente constatada com o veneno total de *B. atrox*, *B. pictus*, *B. hyoprurus*, *B. bilineatus*, *B. neuwedii*, *B. alternatus*, *Crotalus d. terrificus*, *C. d. collilineatus*, *Lachesis muta* e *Micrurus tschudi* (MARTINEZ CADILLO et al., 1991).

A atividade hemolítica aqui verificada, provavelmente seja devida à ação catalítica das PLA₂s, com formação de lisofosfolipídios, que atuam como tensoativos sobre a membrana plasmática, aumentando sua permeabilidade, e subseqüentemente, o acesso aos fosfolipídios da bicamada. O mecanismo de ação proposto se fundamenta em trabalhos anteriores de Vital Brazil (1982) com venenos ofídicos.

Corroborando este mecanismo, nem o veneno total e nem a fração fosfolipásica foram capazes de induzir hemólise direta sobre hemácias lavadas (resultado não apresentado), fato este observado também por Lôbo de Araújo (1994).

O tratamento, tanto do veneno total como da PLA₂ isolada com brometo de *p*-bromofenacil aboliu completamente a hemólise, indicando mais uma vez ser a fração fosfolipásica a responsável pela atividade hemolítica. Além disso, este resultado mostra também que essa atividade é dependente da atividade catalítica. O mesmo foi observado com a isoforma LM-PLA₂-II da PLA₂ do veneno de *Lachesis muta* (FULY et al., 2002).

Em 2003, Arruda, trabalhando com o veneno total de *B. lanceolatus* também o submeteu ao tratamento com brometo de *p*-bromofenacil e verificou redução em torno de 28% na migração de neutrófilos, o que vem mostrar que, além do seu papel na atividade hemolítica, essa fração, provavelmente, também tenha participação na resposta inflamatória.

É interessante notar ainda que, essa fração também exibe atividade anticoagulante, a exemplo do que ocorre em venenos de outras serpentes, como de *B. jararacussu*, *B. pirajai*, *L. muta* (LÔBO de ARAÚJO, 2001, SOARES, et al., 2001, FULY, et al., 2002, KETELHUT, et al., 2003), mostrando a semelhança na seqüência de aminoácidos dessas fosfolipases.

Quando a atividade hemolítica indireta *in vitro* foi analisada utilizando diferentes espécies animais, foi observado uma variação no potencial hemolítico. Tal fato pode ser explicado pela variação na constituição da membrana plasmática nas hemácias das espécies estudadas (VARANDA & GIANNINI, 1994, ROSENBERG, 1979, 1986, 1997).

Na tentativa de verificar a influência da temperatura sobre a atividade hemolítica, foi constatado que essa atividade é completamente extinta a partir de 50°C. Em outras ocasiões, a influência da temperatura também foi significativa sobre demais atividades biológicas do veneno de *B. lanceolatus*, como na indução de edema em pata de ratos, migração de leucócito na cavidade peritoneal de camundongos, e na atividade hemorrágica (FARIA, et al., 2001, ARRUDA, et al., 2003, STROKA, et al., 2005).

Como nos demais venenos botrópicos, é provável que a atividade hemolítica indireta *in vitro* neste veneno não tenha grande importância no envenenamento ofídico (FRANÇA & MALAQUE, 2003). No entanto, apesar da provável irrelevância, é válido

ressaltar que é possível ser a atividade hemolítica passível de neutralização, já que a fração fosfolipásica, responsável por essa atividade, apresenta caráter imunogênico, constatado nos ensaios imunoquímicos.

Acredita-se que estes resultados, além de mostrarem mais uma atividade biológica do veneno de *B. lanceolatus*, poderão auxiliar na identificação de novos sítios-alvo, facilitando o entendimento dos mecanismos de toxicidade das PLA₂s, e do papel enzimático destas moléculas. Tal identificação também poderá ser útil no desenvolvimento de novos agentes farmacológicos, que afetem funções biologicamente específicas (LAMBEAU et al., 1997; KINI, 1997a,b, ROSENBERG, 1997; FLETCHER & ROSENBERG, 1997).

6- CONCLUSÃO

- 6.1. A atividade hemolítica indireta *in vitro*, induzida pelo veneno de *B. lanceolatus* se manifesta com uma diferença de potencial entre hemácias de espécies animais diferentes, provavelmente devido à variação na estrutura e composição da membrana dessas hemácias.
- 6.2. A atividade hemolítica indireta *in vitro* do veneno de *B. lanceolatus* é proporcional à concentração de veneno utilizada, até atingir um platô de atividade (com aproximadamente 95% de hemólise), após o qual, essa relação de proporcionalidade deixa de existir.
- 6.3. A atividade hemolítica indireta *in vitro* do veneno de *B. lanceolatus* é inibida por fator físico (temperatura) e químico (brometo de p-bromofencil).
- 6.4. A atividade hemolítica indireta *in vitro* do veneno de *B. lanceolatus* se dá por conta da fração fosfolipásica, e é provável que essa atividade seja inibida pelo anti-veneno dessa serpente, já que nos ensaios imunoquímicos a fração fosfolipásica apresentou caráter imunogênico.

7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABE, T.; ALEMA, S.; MILEDI, R. Isolation and characterization of presynaptically acting neurotoxins from the venom of *Bungarus* snakes. **Eur J Biochem**, 80: 1–12, 1977.

ARRUDA, V. A.; de QUEIROZ GUIMARAES, A.; HYSLOP, S.; FERREIRA de ARAÚJO, P. M.; BON, C.; LÔBO de ARAÚJO, A. *Bothrops lanceolatus* (Fer de Lance) venom stimulates leukocyte migration into the peritoneal cavity of mice. **Toxicon**, 41: 99-107, 2003.

BARRAVIERA, B.; PEREIRA, P. C. M. Acidentes por Serpentes do Gênero *Bothrops*. In: BARRAVIERA B. **Venenos animais – Uma Visão Integrada**. Rio de Janeiro: EPUC (Editora de Publicações Científicas Ltda), 1994. p. 261-80.

BJARNASON, J. B.; FOX, J. W. Hemorrhagic toxins from snake venoms. **J Toxic-Toxin Rev**, 7: 121–209, 1988-89.

BLACK, A. R.; DONEGAN, C. M.; DENNY, B. J.; DOLLY, J. O. Solubilization and physical characterization of acceptors for dendrotoxin and beta-bungarotoxin from synaptic membranes of rat brain. **Biochemistry**, 27: 6814–20, 1988.

BON, C. Multicomponent neurotoxic phospholipases A₂. In: KINI, R. M. **Venom Phospholipase A₂ Enzymes: Structure, Function and Mechanism**. England: .Ed. Wiley, Chichester, 1997 p. 269–85.

BRASIL. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde: Vigilância epidemiológica de doenças e Agravos específicos. In: **Acidentes por animais peçonhentos**. 2002. Disponível em <http://www.funasa.gov.br/pub/GVE/GVE0501A.htm>. Acesso em: 11 jun.2002.

CAMPBELL, J. A.; LAMAR, W. W. Lanceheads, Genus *Bothrops* Wagler. **The Venomous Reptiles of Latin America**. Ithaca: Ed. Comstock Publishing Associates, 1989. p. 180–226.

DANSE, J. M.; GASPARINI, S.; MÉNEZ, A. Molecular biology of snake venom phospholipase A₂. In: KINI, R. M., **Venom Phospholipase A₂ Enzymes: Structure, Function and Mechanism**. England: Ed. Wiley, Chichester, 1997. p. 29–71.

de FARIA, L.; ANTUNES, E.; BON, C.; LÔBO de ARAÚJO, A. Pharmacological characterization of the rat paw edema induced by *Bothrops lanceolatus* (Fer de Lance) venom. **Toxicon**, 39: 825-30, 2001.

- EVANS, H. J.; KINI, R. M. Anticoagulant effects of phospholipases. In: KINI, R. M. **Venom Phospholipase A₂ Enzymes: Structure, Function and Mechanism**. England: Ed. Wiley, Chichester, 1997. p. 353–68.
- FAURE, G.; BON, C. Several isoforms of crotoxin are present in individual venoms from the South American rattlesnake *Crotalus durissus terrificus*. **Toxicon**, 25: 229-34, 1987.
- FLETCHER, J. E.; ROSENBERG, P. The cellular effects and mechanisms of action presynaptically acting phospholipase A₂ enzymes. In: KINI, R. M. **Venom Phospholipase A₂ Enzymes: Structure, Function and Mechanism**. England: Ed. Wiley, Chichester, 1997. p. 413–54.
- FLETCHER, J. E.; SELISTRE de ARAÚJO; H. S.; OWNBY, C.L. Molecular Events in the myotoxic action of phospholipases. In: KINI, R. M. **Venom Phospholipase A₂ Enzymes: Structure, Function and Mechanism**. England: Ed. Wiley, Chichester, 1997. p. 455–97.
- FRANÇA, F. O. S.; MÁLAQUE, C. M. S. Acidente Botrópico. In: CARDOSO, J. L. C.; FRANÇA, F. O. S.; WEN, F. H.; MÁLAQUE, C. M. S.; HADDAD JUNIOR, V. **Animais Peçonhentos no Brasil: Biologia, Clínica e Terapêutica dos Acidentes**. São Paulo: Sarvier, 2003. p. 72–86.
- FRANCO, F. L. Origem e Diversidade das Serpentes. In: CARDOSO, J. L. C.; FRANÇA, F. O. S.; WEN, F. H.; MÁLAQUE, C. M. S.; HADDAD JUNIOR, V. **Animais Peçonhentos no Brasil: Biologia, Clínica e Terapêutica dos Acidentes**. São Paulo: Sarvier, 2003. p. 13–32.
- FREDERICO, E. Y. O Inferno são os Outros: Animais Peçonhentos no Brasil Colonial. In: CARDOSO, J. L. C.; FRANÇA, F. O. S.; WEN, F. H.; MÁLAQUE, C. M. S.; HADDAD JUNIOR, V. **Animais Peçonhentos no Brasil: Biologia, Clínica e Terapêutica dos Acidentes**. São Paulo: Sarvier, 2003. p. 450-55.
- FULY, A. L.; de MIRANDA, A. L.; ZINGALI, R. B.; GUIMARÃES, J. A.; Purification and characterization of a phospholipase A₂ isoenzyme isolated from *Lachesis muta* snake venom. **Biochem Pharmacol**, 63: 1589–97, 2002.
- GRABAR, P.; BURTIN, P. Immuno-electrophoretic analysis. Amsterdam, London, New York: Elsevier Publishing Company, 1964.

GOWDA, T. V., Interaction of snake venom phospholipase A₂ with plant isolates. In: KINI, R. M., (Ed.), **Venom phospholipase A₂ enzymes**: structure, function and mechanism. Wiley, Chichester, England, 1997. p. 205-21.

GUBENSEK, F.; KRIZAJ, I.; PUNGERCAR, J. Monomeric Phospholipase A₂ Neurotoxins. In: KINI, R. M. **Venom Phospholipase A₂ Enzymes**: Structure, Function and Mechanism. England: Ed. Wiley, Chichester, 1997. p. 245–68.

GUIMARÃES, A. Q.; CRUZ-HÖFLING, M. A.; FERREIRA de ARAÚJO, P. M.; BON, C.; LÔBO de ARAÚJO; A. Pharmacological and histopathological characterization of *Bothrops lanceolatus* (Fer de lance) venom-induced edema. **Inflamm Res**, 53: 284-291, 2004.

GUTIÉRREZ, J.M.; OWNBY, C. L.; ODELL, G. V. Isolation of a myotoxin from *Bothrops asper* venom: partial characterization and action on skeletal muscle **Toxicon**, 22: 115-28, 1984.

JORGE, M. T.; RIBEIRO, L. A. Acidentes Causados por Animais Peçonhentos In: NETO, V. Q.; OLIVEIRA BOLDY, J. L. **Doenças Transmissíveis**. São Paulo: Sarvier, 1991. p. 133–37.

KAMIGUTI, A. S.; SLUPSKY J. R.; ZUZEL, M.; HAY, C. R. Properties of fibrinogen cleaved by Jararhagin, a metalloproteinase from the venom of *Bothrops jararaca*. **Thromb Haemost**, 72: 244–49, 1994.

KASTURI, S.; GOWDA, T. V. Purification and characterization of a major phospholipase A₂ from Russell's viper (*Vipera russelli*) venom. **Toxicon**, 27: 229 – 237, 1989.

KELLY, R. B.; VON WEDEL, R. J.; STRONG, P. N. Phospholipase-dependent and phospholipase-independent inhibition of transmitter release by beta-bungarotoxin. **Adv Cytopharmacol**, 3: 77–85, 1979.

KERNS, R. T.; KINI, R. M.; STEFANSSON, S.; EVANS, H. J. Targeting of venom phospholipases: the strongly anticoagulant phospholipase A(2) from *Naja nigricollis* venom binds to coagulation factor Xa to inhibit the prothrombinase complex. **Arch Biochem Biophys**, 369: 107–13, 1999.

- KETELHUT, D. F.; de MELLO, M. H.; VERONESE, E. L. G.; ESMERALDINO, L. E.; MURAKAMI, M. T.; ARNI, R. K. et al. Isolation, characterization and biological activity of acidic phospholipase A₂ isoforms from *Bothrops jararacussu* snake venom. **Biochimie**, 85: 983–91, 2003.
- KINI, R. M.; EVANS, H. J.; Correlation between the enzymatic activity, anticoagulant and antiplatelet effects of phospholipase A₂ isoenzymes from *Naja nigricollis* venom. **Thromb Haemost**, 60: 170–73, 1988.
- KINI, R. M.; EVANS, H. J. A Model to explain the pharmacological effects of snake venom phospholipase A₂. **Toxicon**, 27: 613–35, 1989.
- KINI, R. M.; EVANS, H. J. The role of enzymatic activity in inhibition of the extrinsic tenase complex by phospholipase A₂ isoenzymes from *Naja nigricollis* venom. **Toxicon**, 33: 1585–90, 1995.
- KINI, R. M. Phospholipase A₂ - A Complex multifunctional protein puzzle. In: KINI, R. M. **Venom Phospholipase A₂ Enzymes: Structure, Function and Mechanism**. England: Ed. Wiley, Chichester, 1997a. p. 1–28.
- KINI, R. M. **Venom Phospholipase A₂ Enzymes: Structure, Function and Mechanism**. England: Ed. Wiley, Chichester, 1997b. p. 1–511.
- KINI, R. M. Excitement ahead: structure, function and mechanism of snake venom phospholipase A₂ enzymes. **Toxicon**, 42: 827–40, 2003.
- KRIZAJ, I.; DOLLY, J. O.; GUBENSEK, F. Identification of the neuronal acceptor in bovine cortex for ammodytoxin C, a presynaptically neurotoxic phospholipase A₂. **Biochemistry**, 33: 13938–45, 1994.
- KRIZAJ, I.; ROWAN, E. G.; GUBENSEK, F. Ammodytoxin A acceptor in bovine brain synaptic membranes. **Toxicon**, 33: 437–49, 1995.
- KRIZAJ, I.; FAURE, G.; GUBENSEK, F., BON, C. Neurotoxic phospholipases A₂ ammoditoxin and crotoxin bind to distinct high-affinity protein acceptors in *Torpedo marmorata* electric organ. **Biochemistry**, 36: 2779–87, 1997.

KRIZAJ, I; GUBENSEK, F. Neuronal receptors for phospholipases A₂ and beta-neurotoxicity. **Biochimie**, 82: 807–14, 2000.

LAMBEAU, G.; BARHANIN, J.; SCHWEITZ, H.; QAR, J.; LAZDUNSKI, M. Identification and properties of very high affinity brain membrane-binding sites for a neurotoxic phospholipase from the taipan venom. **J Biol Chem**, 264: 11503–10, 1989.

LAMBEAU, G.; SCHMID-ALLIANA, A.; LAZDUNSKI, M.; BARHANIN, J. Identification and purification of a very high affinity binding protein for toxic phospholipase A₂ in skeletal muscle. **J Biol Chem**, 265: 9526–32, 1990.

LÔBO de ARAÚJO, A. **Isolamento e caracterização da fosfolipase presente no veneno de *Bothrops lanceolatus***. Campinas, 1990. (Tese - Doutorado – Universidade Estadual de Campinas).

LÔBO de ARAÚJO, A.; DONATO, J. L.; BON, C. Purification from *Bothrops lanceolatus* (Fer de Lance) venom of a fibrino(geno)lytic enzyme with esterolytic activity. **Toxicon**, 36: 745–58, 1998.

LÔBO de ARAÚJO, A.; DONATO, J. L.; LEITE, G. B.; PRADO-FRANCESCHI, J.; FONTANA, M. D.; BON, C. et al. Neuromuscular action of *Bothrops lanceolatus* (Fer de Lance) venom and a caseinolytic fraction. **Toxicon**: 40: 1283-89, 2002.

LÔBO de ARAÚJO, A.; DONATO, J. L.; MORENO, R. A.; PRADO-FRANCESCHI, J. Estudo comparativo das atividades: fosfolipásica, coagulante, proteolítica, TAME-esterásica e hemorrágica em venenos botrópicos. Departamento de Farmacologia FCM / UNICAMP, Campinas, São Paulo, 4º Reunião anual da Federação das Sociedades de Biologia Experimental, Caxambu, 1989.

LÔBO de ARAÚJO, A.; KAMIGUTI, A.; BON, C. Coagulant and anticoagulant activities of *Bothrops lanceolatus* (Fer de lance) venom. **Toxicon**, 39: 371–75, 2001.

LÔBO de ARAÚJO, A.; RADVANYI, F.; BON, C. Purification of acidic phospholipase A₂ from *Bothrops lanceolatus* (Fer de Lance) venom: molecular and enzymatic properties. **Toxicon**: 32: 1069-81, 1994.

LÔBO de ARAÚJO A.; SOUZA A. O., CRUZ-HÖFLING M. A.; FLORES, C. A.; BON, C. *Bothrops lanceolatus* (Fer de lance) venom induces edema formation and increases vascular permeability in the mouse hind paw. **Toxicon**, 38: 209–21, 2000.

MARTINEZ CADILLO, E.; BONILLA FERREYRA, C.; ZVEALETA, A. Hemolytic activity of venom from snake of the genera *Bothrops*, *Lachesis*, *Crotalus*, and *Micrurus* (serpentes: Viperidae and Elapidae). **Rev Biol Trop**, 39: 311–14, 1991.

MAYES, P. A. Metabolismo de Acilgliceróis e Esfingolípídeos. In: MURRAY, R. K.; GRANNER, D. K.; MAYES, P. A.; RODWELL, V. W. **Harper: Bioquímica**. São Paulo: Ed. Atheneu, 2002. p. 259–67.

Mode of action of phospholipase A1, A2, C en D, components of snake, Copyright ITM. Disponível em: www.itg.be/.../imagehtml/ppages/CD_1063_010c.htm

MOUNIER, C. M.; HACKENG, T. M.; SCHAEFFER, F.; FAURE, G.; BON, C.; GRIFFIN, J. H. Inhibition of prothrombinase by human secretory phospholipase A₂ involves binding to factor Xa. **J Biol Chem**, 273: 23764–72, 1998.

MOUNIER, C. M.; LUCHETTA, P.; LECUT, C.; KODURI, R. S.; FAURE, G.; LAMBEAU, G. et al. Basic residues of human group IIA phospholipase A₂ are important for binding to factor Xa and prothrombinase inhibition comparison with other mammalian secreted phospholipases A₂. **Eur J Biochem**, 267: 4960–69, 2000.

NISHIDA, S.; TERASHIMA, M.; TAMIYA, N. Amino acid sequences of phospholipases A₂ from the venom of an Australian elapid snake (king brown snake, *Pseudechis australis*). **Toxicon**, 23: 87-104, 1985.

OTHMAN, I. B.; SPOKES, J. W.; DOLLY, J. O. Preparation of neurotoxic 3H-beta-bungarotoxin: demonstration of saturable binding to brain synapses and its inhibition by Toxin I. **Eur J Biochem**, 128: 267–76, 1982.

OUCHTERLONY, O. Immunodifusion and Imunoelectrophoresis. In: WIER, B. M. **Handbook of experimental Immunology**. Oxford: Ed. Blasckwell Scientific Publications, 1967. p. 665–705.

REHM, H.; BETZ, H. Binding of beta-bungarotoxin to synaptic membrane fractions of chick brain. **J Biol Chem**, 257:10015–22, 1982.

- REHM, H.; BETZ, H. Solubilization and characterization of the beta-bungarotoxin-binding protein of chick brain membranes. **J Biol Chem**, 259: 6865–69, 1984.
- RIBEIRAL, L. L. A.; FONTANA, M. D.; LÔBO de ARAÚJO, A. **Ação do veneno de *Bothrops lanceolatus* (Fer de Lance) na junção neuromuscular e no músculo esquelético de camundongo**. Campinas, 2004. (Dissertação – Mestrado – Universidade Estadual de Campinas).
- ROSENBERG, P. Pharmacology of phospholipase A₂ from snake venoms. In: LEE, C. Y. **Snake Venoms: Handbook for experimental pharmacology**. Berlin: Ed. Springer, 1979. p. 403–47. v. 53
- ROSENBERG, P. The Relationship Between Enzymatic Activity and Pharmacological Properties of Phospholipases In: HARRIS, J. B. **Natural Toxins**. Oxford: Ed. Oxford University Press, 1986. p.129–74.
- ROSENBERG, P. Phospholipases In: SHIER, W.T.; MEBS, D. **Handbook of Toxicology**. New York: Ed. Marcel Dekker, 1990. p. 67-277.
- ROSENBERG, P.. Pitfalls to avoid in the study of correlations between enzymatic activity and pharmacological properties of phospholipase A₂ enzymes. In: KINI, R. M. **Venom Phospholipase A₂ Enzymes: Structure, Function and Mechanism**. England: Ed. Wiley, Chichester, 1997. p. 155–83.
- ROSENFELD, G. Symptomatology, pathology and treatment of snake bites in South American. In: BUCHERL, W.; BUCKLEY, E. E. **Venomous animals and their venoms**. New York: Academic Press, 1971. p. 345–62.
- SANT'ANA, C. M.; DONATO, J. L.; HYSLOP, S.; LILLA, S.; BON, C.; LÔBO de ARAÚJO, A. Plamin-like activity and partial amino acid sequence of a fibrinogenolytic enzyme from *Bothrops lanceolatus* (Fer-de-lance) venom. **Toxicon** (submitted).
- SCOTT, D. L.; Phospholipase A₂: Structure and Catalytic Properties. In: KINI, R. M. **Venom Phospholipase A₂ Enzymes: Structure, Function and Mechanism**. England: Wiley, Chichester, 1997. p. 97–128.
- SHARMA, R. P.; TAYLOR, M. J. Animal Toxins. In: HALEY, T. J.; BERNOLT, W. O. **Handbook of Toxicology**. Washington: Ed. Harder & Row Pubkishers, 1987. p. 439–67.

- SOARES, A. M.; ANDRILAO-ESCARSO, S. H.; BORTOLETO, R. K.; RODRIGUES-SIMIONI, L.; ARNI, R. K.; WARD, R. J. et al. Dissociation of enzymatic and pharmacological properties of piratoxins-I and -III, two myotoxic phospholipases A₂ from *Bothrops pirajai* snake venom. **Arch Biochem Biophys**, 387: 188-96, 2001.
- STEFANSSON, S.; KINI, R. M.; EVANS, H. J. The inhibition of clotting complexes of the extrinsic coagulation cascade by the phospholipase A₂ isoenzymes from *Naja nigricollis* venom. **Trombos Res** 55: 481-91, 1989.
- STEFANSSON, S.; KINI, R. M.; EVANS, H. J. The basic phospholipase A₂ from *Naja nigricollis* venom inhibits the prothrombinase complex by a novel nonenzymatic mechanism. **Biochemistry**, 29: 7742-46, 1990.
- STROKA, A.; DONATO, J. L.; BON, C.; HYSLOP, S.; LÔBO de ARAÚJO, A. Purification and characterization of a hemorrhagic metalloproteinase from *Bothrops lanceolatus* (Fer de Lance) snake venom. **Toxicon**: 45: 411-20, 2005.
- STRONG, P. N.; GOERKE, J.; OBERG, S. G.; KELLY, R. B. beta-bungarotoxin, a pre-synaptic toxin with enzymatic activity. **Proc Natl Acad Sci USA**, 73: 178-82, 1976.
- TAN, P. T. J.; KHAN, A. M.; BRUSIC, V. Bioinformatics for venom and toxin sciences. **Brief Bioinform**, 4: 53-62, 2003.
- THOMAS, L.; TYBURN, B.; PECOUT, F.; KETTERLE, J.; RIEUX, D.; SMADJA, D.; GARNIER, D.; PLUMELLE, Y. Prevention of thromboses in human patients with *Bothrops lanceolatus* envenoming in Martinique: failure of anticoagulants and efficacy of a monospecific antivenom. **Am J Trop Med Hyg**, 52: 419-26, 1995.
- THOMAS, L.; TYBURN B.; KETTERLE, J.; BIAO, T.; MEHDAOUI, H.; MORAVIE, V.; ROUVEL, C.; PLUMELLE, Y.; BUCHER, B.; CANONNE, D.; MARIENELLY, C. A.; LANG, J. Prognostic significance of clinical grading of patients envenomed by *Bothrops lanceolatus* in Martinique. **Trans R Soc Med Hyg**, 92: 542-45, 1998.
- TZENG, M. C.; HSEU, M. J.; YANG, J. H.; GUILLORY, R. J. Specific binding of three neurotoxins with phospholipase A₂ activity to synaptosomal membrane preparations from the guinea pig brain. **J Protein Chem**, 5: 221-28, 1986.

- VALENTIN, E.; LAMBEAU, G. What can venom phospholipase A₂ tell us about the functional diversity of mammalian secreted phospholipases A₂? **Biochimie**, 82: 815–31, 2000.
- VARANDA E. A.; GIANNINI M. J. S. M. Bioquímica de venenos de serpentes. In: BARRAVIERA, B. **Venenos Animais: uma visão integrada**. Rio de Janeiro: EPUC, 1994. p. 205-23.
- VERHEIJ, H. M.; SLOTBOOM, A. J.; de HAAS, G. H. Structure and function of phospholipase A₂. **Rev Physiol Biochem Pharmacol**, 91: 91–203, 1981.
- VERHEIJ, H. M.; VOLWERK, J. J.; JANSEN, E. H.; PUYK, W. C.; DIJKSTRA, B. W.; DRENTH, J. et al. Correlation of enzymatic activity and anticoagulant properties of phospholipase A₂. **Eur J Biochem** 112: 2532, 1980.
- VISHWANATH, B. S.; KINI, R. M.; GOWDA, T. V. Purification of an edema inducing phospholipase A₂ from *Vipera russelli* venom and its interaction with an alkaloid, aristalochic acid. **Toxicon**, 23: 617, 1985.
- VITAL BRAZIL O. Peçonhas. In: **Farmacodinâmica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1982. p. 1044–72.
- ZHAO, L.; PAL, S. K.; XIA, T.; ZEMAIL, A. H.; Dynamics of ordered water in interfacial enzyme recognition: bovine pancreatic phospholipase A₂. **Angew Chem Int. Ed Engl**, 43: 60-3, 2004.
- WÜSTER, W.; GOLAY, P.; WARRELL, D. A. Synopsis of recent developments in venomous snake systematic. **Toxicon**, 35: 319–40, 1997.
- YANG, C. C.; KING, K. Chemical modification of the histidine residue in phospholipase A₂ from the venom of *Naja nigricollis*. **Biochim Biophys Acta**, 614: 373–88, 1980.