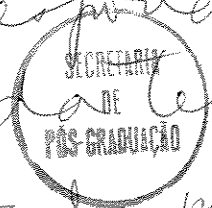


ALBETIZA LÔBO DE ARAÚJO

Este exemplar corresponde  
à redação final da tese  
defendida e aprovada pela  
comissão julgadora



**"ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DA FOSFOLIPASE PRESENTE  
NO VENENO DE BOTHRUPS LANCEOLATUS"**

26/6/90

80/9100905

TESE APRESENTADA AO INSTITUTO DE  
BIOLOGIA DA UNIVERSIDADE ESTA  
DUAL DE CAMPINAS - UNICAMP, COMO  
UM DOS REQUISITOS PARA OBTENÇÃO  
DO GRAU DE DOUTOR EM CIÊNCIAS.

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA E IMUNOLOGIA

CAMPINAS - SP - 1990

Pesq. cat  
neg.

Impi.

ALBETIZA LÔBO DE ARAÚJO → n. t. aut.

*... enzimas / ativos //*  
"ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DA FOSFOLIPASE PRESENTE  
NO VENENO DE BOTHROPS LANCEOLATUS"

Orientadora: PROFA. DRA. JÚLIA PRADO FRANCESCHI - UNICAMP

Co-orientador: DR. FRANÇOIS RADVANYI - Universidade de Paris

n. t. aut.

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA E IMUNOLOGIA

CAMPINAS - SP - 1990

Dedico este trabalho:

À Cecília Maria,  
Lia e  
Leandro,  
por fazerem tudo valer a pena.

Ao Paulo, presente em todos os momentos.

Aos meus dezessete irmãos, amigos de sempre.

À Antonio Pereira Lôbo, por ter conduzido seus filhos às  
atividades intelectuais.

À Cecília Soares Lôbo, por ter me ensinado que a vida é  
algo mais que os nossos olhos vêem, minha saudade, escrita  
através deste poema de Cecília Meireles.

### INFÂNCIA

*Levaram as grades da varanda  
Por onde a casa se avistava  
As grades de prata*

*Levaram as sombras dos limoeiros  
Por onde rodavam arcos de música  
E formigas ruivas*

*Levaram a casa de telhado verde,  
Com suas grutas de conchas  
E vidraças de flores foscas*

*Levaram a dama e seu velho piano  
Que tocava, tocava, tocava a pálida sonata*

*Levaram as pálpebras dos antigos sonhos  
Deixaram somente a memória  
E as lágrimas de agora*

## AGRADECIMENTOS

À Profa.Dra.JÚLIA PRADO FRANCESCHI, pelas sugestões de inestimável valor, pela orientação e amizade nesses anos de convivência.

Ao Dr.BORIS VARGAFTIG, chefe da unidade de venenos do Instituto Pasteur de Paris pela maneira cordial e oportuna de de conviver num ambiente de excelentes condições de trabalho.

Ao Dr.GUY MARLAS com quem iniciei meu estágio no Instituto Pasteur.

Ao Dr. CASSIAN BON que me acolheu em seu laboratório dando-me possibilidade de desfrutar do espírito de colaboração e companheirismo de sua equipe, BERNARD SALIOU, FRANÇOIS RADVANYI, GRAZYNA FAURE, MARIE-ANNE NAHORI e VALÉRIE CHOUMET.

Ao Dr.FRANÇOIS RADVANYI pela orientação sensata e objetiva no isolamento de fosfolipases.

Ao Dr.OSWALDO VITAL BRAZIL minha admiração pelo entusiasmo com que se dedica as pesquisas de venenos ofídicos.

À Dra.AURA SHISUKO KAMIGUTI pela cordialidade com que trabalhamos nos experimentos de coagulação.

Ao Dr.PAULO MARIA FERREIRA DE ARAÚJO pela orientação indispensável no domínio da Imunoquímica.

Ao curso de Pós-Graduação em Imunologia pela contribuição à minha formação científica.

Aos Professores: Dra. FAJGA MANDELBAUM (Serviço de Bioquímica. Instituto Butantan, São Paulo); Dr. HUMBERTO DE ARAÚJO RANGEL (Departamento de Microbiologia e Imunologia - I.B. - UNICAMP); Dr. JOSÉ ROBERTO GIGLIO (Departamento de Bioquímica - F.M. de Ribeirão Preto); Dra. JÚLIA KEIKO SAKURADA (Departamento de Microbiologia e Imunologia - I.B. - UNICAMP); Dra. LÉA RODRIGUES SIMIONI (Departamento de Farmacologia - FCM-UNICAMP); Dra. MARIA INÊS HOMSI BRANDEBURGO (Departamento de Geociências - IBILCE - São José do Rio Preto), pelas críticas e valiosas sugestões ao presente trabalho, formuladas por ocasião de sua análise prévia.

Aos colegas do Departamento de Farmacologia pela colaboração nos encargos didáticos possibilitando-me maior dedicação a este trabalho.

A JOSÉ LUIZ DONATO por compartilhar na padronização e realização de algumas técnicas Bioquímicas e EDSON ANTUNES nos testes de toxicidade e de agregação plaquetária.

A DORIVAL VITÓRIO DA CUNHA JUNIOR pelo auxílio prestado nas técnicas de Imunoquímica e a GILDO BERNARDO LEITE nas de junção neuromuscular.

A VILMA PROIDE pela atenção e auxílio prestado na execução do trabalho gráfico, a ANTONIO VILSON DOS SANTOS e a ERASMO GOMES CARRASCO pelo trabalho de datilografia.

A Sra. ANNA GAGLIARDI pela colaboração na revisão bibliográfica.

CNPq, Foundation pour la Recherche Medicale e FAP pelo apoio financeiro.

E todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

# I N D I C E

f1s.

I	- INTRODUÇÃO.....	01
	1.1. Venenos de serpentes peçonhentas.....	02
	1.2. Toxinas pré-sinápticas com atividade fosfolipásica $A_2$ .....	09
	1.3. Generalidades sobre fosfolipase $A_2$ .....	15
	1.4. Substrato e atividade enzimática.....	20
II	- OBJETIVOS.....	24
III	- MATERIAIS E MÉTODOS.....	26
	3.1. Isolamento e purificação da fosfolipase do veneno de <i>B. lanceolatus</i> .....	27
	3.1.1. Cromatografia de exclusão.....	27
	3.1.2. Cromatografia de troca iônica.....	28
	3.1.3. Cromatografia de troca iônica por FPLC em coluna de mono Q.....	29
	3.2. Atividade fosfolipásica.....	30
	3.2.1. Efeito do P-bromofenacil brometo sobre a atividade fosfolipásica.....	31
	3.3. Eletroforese em gel de poliacrilamida.....	32
	3.3.1. Isoeletrofocalização em gel de poliacri lamida.....	33
	3.4. Testes imunoquímicos de imunodifusão e imunoeletroforese.....	34
	3.5. Análise de aminoácidos.....	35
	3.6. Determinação quantitativa de proteínas.....	36
	3.7. Atividade proteolítica e tãme esterásica.....	36
	3.8. Atividades Biológicas.....	38
	3.8.1. Toxicidade.....	38
	3.8.2. Atividade hemorrágica.....	38
	3.8.3. Atividade hemolítica.....	39
	3.8.4. Atividade agregante.....	40

	3.9. Estudo da atividade coagulante.....	41
	3.9.1. A atividade fibrinogenolítica.....	42
	3.9.2. A atividade fibrinolítica.....	42
	3.9.3. Ação anticoagulante sobre plasma.....	43
	3.10. Preparação muscular biventer cervicis de pintainho.....	43
<b>IV</b>	<b>- RESULTADOS.....</b>	<b>45</b>
	4.1. Atividade fosfolipásica.....	46
	4.1.1. Atividade progressiva da atividade fos folipásica do veneno de <i>B. lanceolatus</i> .....	49
	4.2. Isolamento da fosfolipase - Fracionamento do veneno de <i>B. lanceolatus</i> em Sephadex G.50.....	51
	4.2.1. Cromatografia de fração F.3 em coluna de CM-celulose.....	53
	4.3. Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS no veneno total e das frações tratadas com mercaptoetanol.....	43
	4.4. Análise imunoquímica.....	57
	4.5. Isoeletrofocalização em gel de poliacrimilamida....	61
	4.6. Atividade específica da fosfolipase isolada do veneno de <i>B. lanceolatus</i> em diferentes etapas da purificação.....	63
	4.7. Cromatografia de troca iônica em coluna de mono Q por FPLC.....	64
	4.8. Determinação da composição de aminoácidos.....	70
	4.9. Ensaio enzimáticos e biológicos.....	71
<b>V</b>	<b>- DISCUSSÃO.....</b>	<b>79</b>
<b>VI</b>	<b>- RESUMO E CONCLUSÕES.....</b>	<b>90</b>
<b>VII</b>	<b>- SUMMARY.....</b>	<b>93</b>
<b>VIII</b>	<b>- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>96</b>

## I - INTRODUÇÃO



## 1.1. VENENOS DE SERPENTES PEÇONHENTAS

O temor pelas serpentes sempre constituiu um sentimento misterioso e incontrolável no homem numa atitude que originou numerosas lendas e crenças religiosas das antigas civilizações. Somente no fim do século XVII, Francesco Redi demonstrou a toxicidade do líquido que corria do aparelho venenoso de uma víbora.

As serpentes são animais predadores que utilizam seu aparelho venenoso para capturar, matar as presas e delas se nutrirem. O aparelho venenífero é constituído pelas glândulas ou células secretoras e todo um aparato necessário para inocular a peçonha ou veneno na presa escolhida. Entre as muitas espécies de serpentes, várias espécies e subespécies são consideradas venenosas, tendo sido agrupadas em cinco famílias: Colubridae, Elapidae, Hydrophidae, Viperidae e Crotalidae (TU, 1977). No Colubridae somente alguns gêneros são venenosos, nas outras quatro famílias todos os gêneros o são.

Os progressos das ciências no século XIX, em particular os da Química Orgânica e da Fisiopatologia, permitiram demonstrar não só a natureza heterogênea dos venenos de serpentes de composição predominantemente proteica (BIEBER, 1979), como também grande parte de seus efeitos biológicos. Aproximadamente 90% dos seus constituintes são proteínas responsáveis pela sua complexidade e propriedades biológicas, e o restante formado por compostos de baixo peso molecular tais como peptídeos, nucleosídeos e diversos íons. O conjunto das descobertas sobre fatores hemorrágicos, coagulantes, anticoagulantes, proteolíticos, liberadores de substâncias farmacologicamente ativas e as amplas revisões anteriores levaram HARRIS (1984) a agrupar os venenos de serpentes em quatro classes:

1) Neurotoxinas pós-sinápticas, que se ligam aos receptores da membrana pós-sináptica, causando um bloqueio neuroefetor;

2) Toxinas cardiotoxicas, que interferem com a integridade funcional de membranas biológicas;

3) Neurotoxinas pré-sinápticas que inibem a liberação de acetilcolina dos terminais nervosos motores;

4) Miotoxinas que danificam as fibras musculares.

Os venenos de serpentes não são somente complexos na sua composição química, mas também na sua diversidade de ações. Nenhum outro produto natural apresenta uma mistura tão efetiva de diferentes fatores, exercendo simultaneamente efeitos tóxicos sobre os sistemas sanguíneo, respiratório, cardiovascular e/ou 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 compreendermos a extrema complexidade dos venenos é importante extrairmos deles os diversos constituintes e examinarmos suas propriedades individuais. Nas últimas décadas, o desenvolvimento de novos métodos e técnicas bioquímicas para o isolamento e purificação dos componentes dos venenos e o conseqüente uso de proteínas puras e bem caracterizadas nos estudos farmacológicos e fisiopatológicos, têm levado a resultados mais conclusivos, e a um melhor entendimento dos seus efeitos, seu mecanismo de ação a nível molecular, permitindo seu uso como valiosos instrumentos de pesquisa. Não é raro se encontrar nestas investigações, que uma mesma toxina pode se apresentar sob várias formas, diferindo apenas em alguns aminoácidos, como é o caso, por exemplo, da crotoxina do veneno de cascavél que exhibe dez diferentes formas no veneno de uma mesma serpente, (FAURE e BON, 1987), ou que certos componentes presentes no veneno de uma dada espécie, poderão estar ausentes naquele de uma espécie vizinha. Podemos mesmo observar variações dentro de uma espécie, dadas em função da idade, das condições de vida, (IWANAGA e SUZUKI, 1979) e principalmente de subespécies e da

distribuição geográfica destas. Ademais, tem-se em relevância que fatores isolados de venenos revelaram-se extremamente úteis em diferentes domínios biológicos. Por exemplo, o ativador do fator X da coagulação sanguínea isolado do veneno da vípera de Russel *Vipera russelli*, permite dosar o fator X plasmático humano, (BACHMAN e col., 1959; DENSON, 1961; AURELL e col., 1977). A síntese de medicamentos anti-hipertensivos se beneficiou com a descoberta no veneno de *Bothrops jararaca* de um inibidor da enzima que não só potencializa a ação da bradicinina como converte a angiotensina I em angiotensina II, (FERREIRA, S.H., 1965; BAKHLE, 1968; ONDETTI e col., 1971). A L-aminoácido oxidase encontrada em todos os venenos de serpentes (IWANAGA e SUZUKI, 1979), é utilizada para a preparação de ácidos  $\alpha$  - cetônicos (MEISTER, 1956).

Dentre outros avanços da pesquisa científica, as  $\alpha$  -neurotoxinas purificadas a partir do veneno de serpentes da família Elapidae permitiram a identificação, isolamento e estudo do receptor nicotínico da acetilcolina (CHANGEUX, 1981). Devido ao conhecimento da estabilidade e abundância de certos componentes proteicos dos venenos de serpentes, estes são também utilizados pelos fisicoquímicos como proteínas modelo para a ressonância magnética nuclear, (ARSENIEV e col., 1982) e o estudo do arranjo da estrutura espacial das proteínas (HOLLECKER e CREIGHTON, 1983). As cardiotoxinas (SARKAR, 1947) menos tóxicas do que as neurotoxinas (CHANG e LEE, 1963) são abundantes nos venenos

das *Naja* e gêneros afins, sendo responsáveis por efeitos farmacológicos nas membranas de certas células notadamente cardíacas e musculares. Enfim, outros componentes do veneno ativam constituintes que agem na hemostasia (SEEGERS e OUYANG, 1979) afetando as funções plaquetárias, o sistema fibrinolítico, o mecanismo da coagulação, aumentando a permeabilidade vascular com formação de edema e diminuição da pressão arterial (HOFFMAN e BON, 1987).

Dentre as serpentes venenosas existentes no Brasil, destaca-se o gênero *Bothrops* como responsável por cerca de 90% do total de acidentes ofídicos ocorridos no país (ROSENFELD, 1971). Os venenos destas serpentes se caracterizam por:

- Induzir estado de choque, causa mais frequente de morte;
- Exercer intensa atividade proteolítica (VITAL BRAZIL e RANGEL PESTANA, 1909c; HOUSSAY e NEGRETE, 1918; MEBS, 1970);
- Coagular o plasma sanguíneo (VITAL BRAZIL e VELLARD, 1928; ROSENFELD e col., 1959; KLOBUSITZKY, 1961);
- Liberar substâncias farmacologicamente ativas tais como histamina e bradicinina (ROTHSCHILD e ROTHSCHILD, 1979);
- Produzir hemorragias (VITAL BRAZIL, 1901; TAKAHASHI e OHSAKA, 1970; BJARNASON e TU, 1978; FABIANO e TU, 1981);
- Causar pronunciado efeito local com hemorragia e necrose tissular ocasionando seqüelas com perda de tecido

que pode levar a necessidade de amputação da extremidade afetada (VITAL BRAZIL, 1911; JIMENEZ-PORRAS, 1973).

O veneno de *B. lanceolatus* (Fer de lance) ser pente que ocorre na Martinica e que tivemos a oportunidade de estudar, independente de sua distribuição geográfica - distinta, apresenta a maioria destas características. Ao estudá-las, focalizamos nosso interesse na atividade fosfolipásica, esforçando-nos por obtê-la como um componente homogêneo o qual, graças a sua atividade antigênica, nos possibilitou ainda sua caracterização imunológica.

O estudo da composição antigênica dos venenos ofídicos, em particular do gênero *Bothrops* até então pouco explorado, levou SCHENBERG (1958, 1961 e 1963) a utilizar a técnica de Ouchterlony nos venenos de *B. jararaca* e *B. neuwiedii* e verificar a existência de grande número de componentes antigênicos nesses venenos como também diferenças imunológicas entre seis sub-espécies no veneno de *B. neuwiedii*. Outros autores lançando mão da mesma técnica utilizando venenos de vários gêneros, inclusive botrópicos, concluíram que é possível estudar a composição antigênica dos venenos ofídicos (GRASSET e col., 1956 a e b), determinar a existência de identidades antigênicas - entre venenos de serpentes do mesmo gênero (SCAVINI FERRARESI, 1962) e até mesmo em gêneros bastante distantes (BOQUET e col., 1969). A presença de antígenos similares em venenos de serpentes foi demonstrada inicialmente com anti-soros comerciais (BOQUET, 1979; MINTON, 1979; TU e col., 1980).

Boquet  
1979  
Minton  
1979  
TU e col.  
1980

A análise eletroforética do veneno de *B. jararaca* mostrou a presença de 15 frações (SILLES VILLAROEEL, 1972 ; SILLES VILLAROEEL e col., 1973) e a imunoeletroforética caracterizou a natureza antigênica de duas enzimas isoladas através de processos químicos, em que uma delas era bastante heterogênea e que a outra representava apenas uma única fração (URIEL e col., 1968). Todos esses autores acreditam que a imunquímica também poderá fornecer subsídios a serem utilizados em outros campos como da filogenia e da sistemática das serpentes botrópicas.

Fatores hemorrágicos isolados de *B. newwiedi* ( $NHF_a$  e  $NHF_b$ ) e de *B. jararaca* ( $HF_1$ ,  $HF_2$  e  $HF_3$ ) foram objeto de estudo comparativo com anti-soro monovalente preparado em cavalo (MANDELBAUM e col., 1976). Apesar da inexistência de identidade imunológica, fato confirmado com anti-soro específico preparado em coelhos contra tais fatores, o anti-soro específico não somente neutralizou a atividade hemorrágica de proteínas homólogas, como também das heterólogas (MANDELBAUM e col., 1988).

O fato de GUTIERREZ e col., (1981), LOMONTE , (1985), LOMONTE e col., (1987), terem demonstrado a incapacidade de antivenenos em neutralizarem o rápido desenvolvimento do edema, e da mionecrose, fala a favor de que a lesão causada pelos venenos botrópicos se deva a uma somatória de efeitos isolados de diferentes componentes com distintas ações biológicas ou que atuem sinergicamente. Somente após

o seu isolamento poder-se-á estudar as diferentes combinações e sinergismos possíveis.

## 1.2. TOXINAS PRÉ-SINÁPTICAS COM ATIVIDADE FOSFOLIPÁSICA $A_2$

Dentre as toxinas que apresentam neurotoxicidade pré-sinápticas, as mais estudadas são as  $\beta$  - neurotoxinas. As  $\beta$  - neurotoxinas como a crotoxina, são fosfolipasas  $A_2$  tóxicas purificadas de venenos de serpentes, encontradas nas famílias Elapidae, Crotalidae e Viperidae. Quando injetados por via periférica, causam a morte por parada respiratória bloqueando a liberação do neuromediador para a junção neuromuscular, (HOWARD e GUNDERSEN, 1980 ; FRAENKEL CONRAT, 1982-83; LEE e HO, 1982; HARRIS, 1984 ; CHANG, 1985; STRONG, 1987). O fato de que certas fosfolipasas  $A_2$  tóxicas através de modificações químicas podem se transformar em fosfolipasas enzimaticamente ativas, mas não tóxicas (HOWARD e TRUOG, 1977; HENDON e TU, 1979) sugere que podemos definir um sítio tóxico para as  $\beta$  - neurotoxinas diferentes do sítio catalítico. O sítio tóxico seria responsável pela ligação nas terminações nervosas. Como não está completamente esclarecido que o sítio tóxico é o mesmo para todas as  $\beta$  - neurotoxinas podemos em relação à estrutura e atividade, dividi-las em três grupos: as compostas de uma única cadeia polipeptídica (monocatenárias), as



compostas de duas sub-unidades ligadas covalentemente ( $\beta$  - bungarotoxinas) e as compostas de várias sub-unidades não ligadas covalentemente. (QUADRO I).

## Q U A D R O I

### AS PRINCIPAIS $\beta$ - NEUROTOXINAS


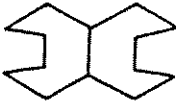
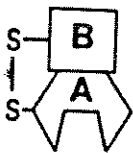
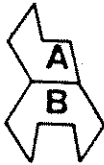
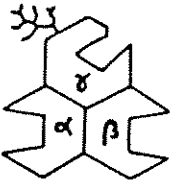
1. Uma cadeia polipeptídica	
NOTEXINA (s)	KARLSSON e col., 1972; HALPERT e EAKER, 1975.
NOTECHIS II-5 (s)	HALPERT e EAKER, 1976; MAGAZANIK e SLAVNOVA, 1978.
CERULEOTOXINA	BON e CHANGEUX, 1977; BON e SALIOU, 1983; HO e LEE, 1983.
CAUDOXINA (s)	VILJOEN e col., 1982; LEE e col., 1982.
AMMODYTOXINA A (s)	THOUIN e col., 1982; RITONJA e GUBENSEK, 1985.
2. Duas sub-unidades ligadas covalentemente	
$\beta$ -BUNGAROTOXINA (s)	CHANG e LEE, 1963; ABE e col., 1977a; KONDO e col., 1978; 1982a; 1982b.
3. Várias sub-unidades não ligadas covalentemente	
CROTOXINA (s)	SLOTTA e FRAENKEL-CONRAT, 1938; VITAL BRAZIL e EXCELL, 1970; CHANG e LEE, 1977; HAWGOOD e SMITH, 1977; AIRD e col., 1985; AIRD e col., 1986.
TAIPOXINA (s)	KAMENSKAYA e THESLEFF, 1974; FOHLMAN e col., 1977; LIND e EAKER, 1982; LIND, 1982.
TOXINA MOJAVE (s)	CATE e BIEBER, 1978; GOPALAKRISHNAKONE e col., 1980; HO e LEE, 1981.
PARADOXINA	FOHLMAN, 1977.
TEXTILOTOXINA	SU e col., 1983.
TOXINA DE P.FIELDI	BATZRI-IZRAELI e BDOLAH, 1982; TSAI e col., 1983.

(s) indica que a seqüência é conhecida

As diferentes toxinas foram classificadas em relação à ordem cronológica de sua descoberta seguida de uma ou mais referências concernentes a sua purificação, seu efeito pré-sináptico e sua seqüência de aminoácidos.

Em todos os casos, ao menos uma das sub-unidades é uma fosfolipase  $A_2$  com seqüência de aminoácidos conhecida, muito parecida com a da fosfolipase  $A_2$  de pâncreas, ou da fosfolipase  $A_2$  não tóxica isolada dos venenos de serpentes. (FIGURA 1).

FIGURA 1

NOME	SUB-UNIDADE	SEQUÊNCIA	
NOTEXINA		- PLA	
CERULEOTOXINA		- PLA	
$\beta$ -BUNGAROTOXINA		B A	INIB. TRIP PLA PLA
CROTOXINA		A B	PARTE DE PLA PLA
TAIPOXINA		$\alpha$ $\beta$ $\delta$	PLA PLA PRÓ - PLA

Representação esquemática de algumas  $\beta$ -neurotoxinas. As sub-unidades de fosfolípases (PLA) são representadas sob a forma de um hexágono.

Do ponto de vista de toxicidade e de ligação, os três grupos de toxinas podem ser assim caracterizados:

$\beta$ -neurotoxinas monocatenárias: Comparando as sequências de diferentes fosfolipases  $A_2$  monocatenárias tóxicas e não tóxicas, DUFTON e HIDER, (1983) definiram um "sítio tóxico" composto de quinze resíduos, distinto do sítio catalítico, mas o estudo das seqüências posteriores anulou estas conclusões, (NISHIDA e col., 1985. Por outro lado, GUBENSEK e col., (1986) definiram na seqüência da ammoditoxina A três resíduos próximos do C-terminal que poderiam fazer parte de seu sítio tóxico, sendo estes os únicos resíduos diferentes entre esta toxina e a ammoditoxina B, trinta vezes menos tóxica.

A  $\beta$ -bungarotoxina, primeira neurotoxina isolada do veneno de *Bungarus multicinctus* (CHANG e LEE, 1963), é um complexo covalente de duas sub-unidades diferentes (cadeias A e B) unidas por pontes dissulfeto (KONDO e col., 1978; 1982a; 1982b). A cadeia A apresenta homologia com as fosfolipases  $A_2$  ( $PLA_2$ s), enquanto a cadeia B é homóloga aos inibidores de tripsina de pâncreas e a dendrotoxina que é uma neurotoxina pré-sináptica isolada do veneno de *Dendroaspis angusticeps*, (HARVEY e col., 1984a; 1984b). Foi proposto que a cadeia de B da  $\beta$ -bungarotoxina poderia ser responsável pela ligação desta toxina sobre a membrana pré-sináptica (HARVEY e KARLSSON, 1982). De fato, a cadeia B tem uma seqüência parecida com a dendrotoxina e da toxina I,

duas proteínas de venenos de serpentes capazes de inibirem o efeito farmacológico resultante da ligação da  $\beta$ -bungarotoxina sobre as terminações nervosas (KONDO e col., 1982a; HARVEY e KARLSSON, 1982; OTHMAN e col., 1982). O fato da alquilação da cadeia A da  $\beta$ -bungarotoxina pelo brometo de p-bromofenacila reduzir a afinidade da  $\beta$ -bungarotoxina pela membrana pré-sináptica sugere igualmente uma participação da cadeia A (REHM e BETZ, 1982; OTHMAN e col., 1982; REHM, 1984).

Entre as  $\beta$ -neurotoxinas compostas de várias sub-unidades não ligadas covalentemente, o grupo da crotoxina e da taipoxina é o mais bem estudado. A taipoxina formada por três sub-unidades diferentes,  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ , unidas por ligações não covalentes (FOHLMAN e col., 1976) é a mais potente destas, tendo sido isolada do veneno de *Oxyranus scutellatus scutellatus*.

As sub-unidades  $\alpha$  e  $\beta$  são homólogas às  $PLA_2$ s, enquanto a sub-unidade  $\gamma$  é homóloga à pró- $PLA_2$  de porco, com um octa peptídeo N-terminal extra (KARLSSON, 1979).

A crotoxina isolada do veneno de cascavel sul americana *Crotalus durissus terrificus*, por SLOTTA e FRAENKEL-CONRAT em 1938, é formada por duas sub-unidades diferentes, unidas não covalentemente: um componente básico (crotoxina B) com atividade  $PLA_2$ , baixa toxicidade (BREITHAUPT e col., 1975) várias isoformas (FAURE e BON, 1987), e um componente ácido (crotapotina) que não tem

atividade tóxica nem enzimática (HENDON e FRAENKEL-CONRAT, 1971). A crotoxina difere da taipoxina e  $\beta$ -bungarotoxina porque também interfere no sítio pós-sináptico da neurotransmissão (VITAL BRAZIL, 1966; BON, 1982). Das sub-unidades isoladas a partir das duas toxinas somente uma entre elas (a sub-unidade B da crotoxina e a cadeia  $\alpha$  da taipoxina) possui sempre toxicidade muito menor do que aquela da toxina nativa ou reconstituída. Foi proposto que a sub-unidade fracamente tóxica possuiria o sítio tóxico e poderia ligar-se de maneira não específica sobre várias membranas. O papel das outras sub-unidades seria de impedir esta ligação não específica. Diferentes estudos de ligação da crotoxina e suas sub-unidades sobre membranas de glóbulos vermelhos (JENG e col., 1978), do órgão elétrico do peixe torpilar rico em receptores de acetilcolina (BON e col., 1979) e de diafragma de camundongos (CHANG e SU, 1981), permitiram propor um modelo para explicar este sinergismo. A sub-unidade CB se liga de maneira não específica sobre as membranas, o que impede sua ação sobre as terminações nervosas; na presença da sub-unidade CA esta ligação não específica é suprimida o que permite à associação CA-CB alcançar seu local de ação, onde o complexo CA-CB se dissocia, a sub-unidade CB se liga à membrana e a sub-unidade CA permanece em solução. Este modelo é chamado de "chaperon" (FOHLMAN e col., 1976; JENG e col., 1978). Portanto, a sub-unidade CA potencializa o efeito da sub-unidade CB não em direção ao seu local de ação mas impedindo sua ligação sobre sítios não específicos. Isto é diferente do caso das toxinas como a ricina, a colérica ou a diftérica, compostas igualmente -

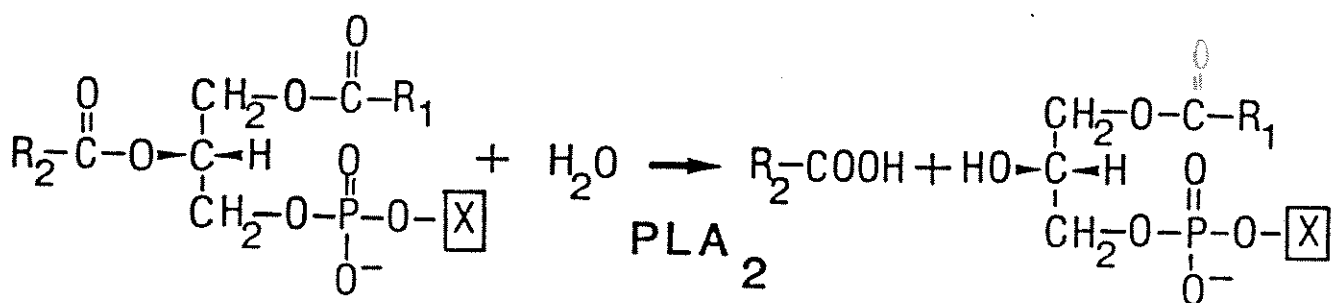
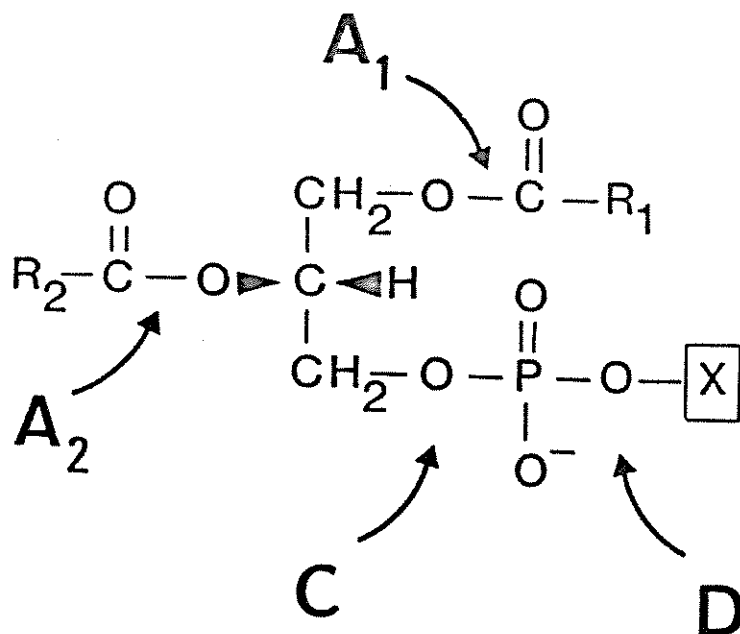
de uma sub-unidade enzimática e uma não catalítica. Em relação a essas toxinas a sub-unidade não enzimática reconhece um receptor específico presente sobre certas membranas, sendo ela que conduz a sub-unidade catalítica até as células alvos (NEVILLE e HUDSON, 1986). Os efeitos das  $\beta$ -neurotoxinas sugerem que a atividade fosfolipásica seja essencial para a sua atividade biológica e que elas atuem alterando o transporte de íons através das membranas.

### 1.3. GENERALIDADES SOBRE FOSFOLIPASES $A_2$

As fosfolipases  $A_2$  catalizam a hidrólise da ligação éster na posição 2 dos fosfolipídeos (FIGURA 2), sendo esta atividade cálcio dependente. Encontram-se em grande quantidade em determinadas glândulas como o pâncreas, nos venenos de serpentes, (VERHEIJ e col., 1981a; SLOTBOOM e col., 1982; DENNIS, 1983) e em menor quantidade dentro de todo o organismo, (VAN DEM BOSCH, 1982; WAITE, 1985). Desempenham importante papel na manutenção da arquitetura das membranas, (GAN ELEPANO e MEAD, 1978; YAWO e KUNO, 1983) participam da liberação do ácido araquidônico precursor das prostaglandinas e dos leucotrienos (FLOWER e BLACKWELL, 1976; LOEB e GROSS, 1986) estando ainda envolvidas na liberação de neuromediadores e hormônios (MOSKOWITZ e col., 1982; YAMAMOTO e col., 1982; WADA e col., 1983;

## FIGURA 2

SÍTIOS DE AÇÃO DAS DIFERENTES FOSFOLIPASES E REAÇÃO CATALIZADA PELA FOSFOLIPASE A<sub>2</sub>.



R<sub>1</sub> e R<sub>2</sub> representam as cadeias alifáticas dos ácidos graxos. X é o grupo polar que em geral é uma colina, uma etanolina, uma serina, um glicerol ou um inositol.

CAMORATTO e GRANDISON 1985). As fosfolipases, em particular as fosfolipases  $A_2$  têm sido bastante utilizadas como instrumento de investigação. Por exemplo, ANDERSON e ADA, (1960), mostraram através de uma fosfolipase de *Pseudechis porphyriacus* que o vírus da encefalite possui um componente fosfolipídico; além disso por meio de diferentes fosfolipases e de uma esfingomielinase ZWAAL e col., (1975) determinaram composições em fosfolipídeos e em esfingomielina das duas camadas da membrana de hemácias; do mesmo modo DEMEL e col., (1975) avaliaram a pressão lateral da camada externa. HEINRIKSON e col., (1977) dividiram as fosfolipases  $A_2$  de venenos de serpentes e de pâncreas em dois grupos; as fosfolipases  $A_2$  do primeiro grupo possuem resíduos de cisteína nas posições 11 e 77 e correspondem às fosfolipases de pâncreas e dos venenos das famílias Elapidae e Hydrophidae. As fosfolipases do segundo grupo apresentam as seguintes diferenças: não possuem vários aminoácidos em torno da posição 60 e apresentam resíduos de cisteína nas posições 50 e C-terminal correspondendo àquelas fosfolipases dos venenos das famílias Viperidae e Crotalidae (FIGURA 3).

As estruturas tridimensionais de três fosfolipases  $A_2$  de pâncreas de boi (DIJKSTRA e col., 1978; 1981 a e b); de porco (DIJKSTRA e col., 1983) e a isolada do veneno de *Crotalus atrox*, (KEITH e col., 1981; BRUNIE e col., 1985) foram determinadas por difração dos raios X e apresentam semelhanças (RENETSEDER e col., 1985). Alguns elementos característicos, tais como, três  $\alpha$ -hélices uma



## FIGURA 3

SEQÜÊNCIA DAS DUAS SUB-UNIDADES DA CROTOXINA CB E CA (AIRD e COL., 1985; 1986) E DE DUAS FOSFOLIPASES NÃO TÓXICAS: DE PÂNCREAS DE BOI E DE VENENO DE *Crotalus atrox* (FLEER e COL., 1978; KEITH e COL., 1981). O ALINHAMENTO DAS SEQÜÊNCIAS FOI FEITO CONFORME RENETSEDER e COL., (1985).

```

1   5   10  15  20  25  30  35  40  45  50  55  60
ALWQFN*NGMIKCKIPSSGPLLDFN***NYGCY**CGLGGSGTPVDDLDRCCQFHDN*CYKQAKKLD**SCKVL
SLVQFETLIMKIAG-RSGLLWYSAYGCYCGWGGHGLPQDATDRCCFVH**DCCY*GKAT--D-C---
HLLQFNKMIKFETR-KNAIPFYAFYGCYCGWGG+GRP+DATDRCCFVH**DCCY*GKLA--K-C---
                                SYG*CYCGAGGQGW**PQDASDRCCFFH**DCCY*AKLT--G-C---

65  70  75  80  85  90  95  100 105 110 115 120 125 130
V   V   V   V   V   V   V   V   V   V   V   V   V   V
V*DN*PYTN*NY*SYSCSNNEIT*CSS*ENNA*CEAFICN**CDR*NAAIC*FSKV-P-YNKEHKNL*DK-KNC
--NPKTVSYTYSEENGEIICGG--DDPCGTQICECDKAAAICFRDNIPSYDNKYWLFPP-KDCREEPEPC
--NTKWDIYRYSL+SGYITCGK-GTWCEEQICECDRVAECLRRSLSTYKYGYMFYPD-SRCRGPSETC
--NPT          xxxxxxxxx-xDPCGTQICGCDKAAAICFRNSMDT          pQFSP-ENCQGESQPC

```

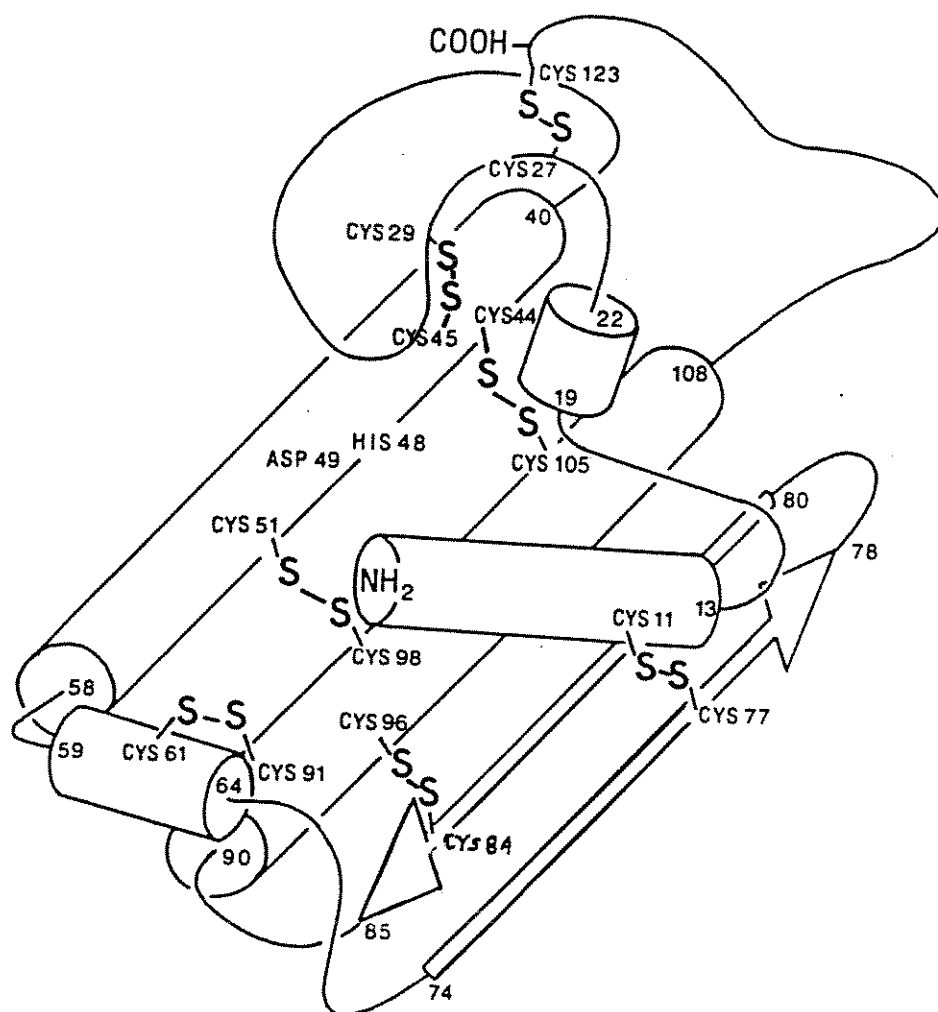
Q ou R; + K ou R; x resíduo não sequenciado; - branco inserido para alinhar as seqüências.

As estrelas (\*) indicam os resíduos que são conservados em todas as fosfolipases A<sub>2</sub> seqüenciadas de pâncreas e de venenos de serpentes.

cadeia  $\beta$  e uma alça, (resíduos 25 a 42), chamada alça de ligação do íon cálcio, conservada em todas as fosfolipases  $A_2$  já seqüenciadas. O cálcio é indispensável para a atividade enzimática das fosfolipases  $A_2$  de venenos e de pâncreas. A  $\alpha$  hélice N-terminal tem importante papel na atividade enzimática medida com lipídeos organizados, (VERHEIJ e col., 1981b; RANDOLPH e HEINRIKSON, 1982) enquanto que as outras duas  $\alpha$ -hélices contêm os resíduos do sítio ativo (FIGURA 4).

### FIGURA 4

ESTRUTURA TRIDIMENSIONAL DA FOSFOLIPASE  $A_2$  DE PÂNCREAS DE BOI  
DIJKSTRA e col., 1978.



As neurotoxinas pré-sinápticas isoladas de venenos de serpentes em geral apresentam atividade  $PLA_2$  intrínseca. Consideráveis evidências sugerem que a neurotoxicidade destas enzimas depende da atividade fosfolipásica (STRONG e col., 1976; HALPERT e col., 1976; HOWARD e TRUOG, 1977). O íon  $Ca^{2+}$  participa da atividade catalítica e favorece a interação da fosfolipase com o substrato (DONNE-OP DEN KELDER e col., 1981; DE BOSE e ROBERTS, 1983). Outros íons divalentes são as vezes igualmente capazes de favorecer esta interação mas não ativam a enzima ou o fazem levemente.

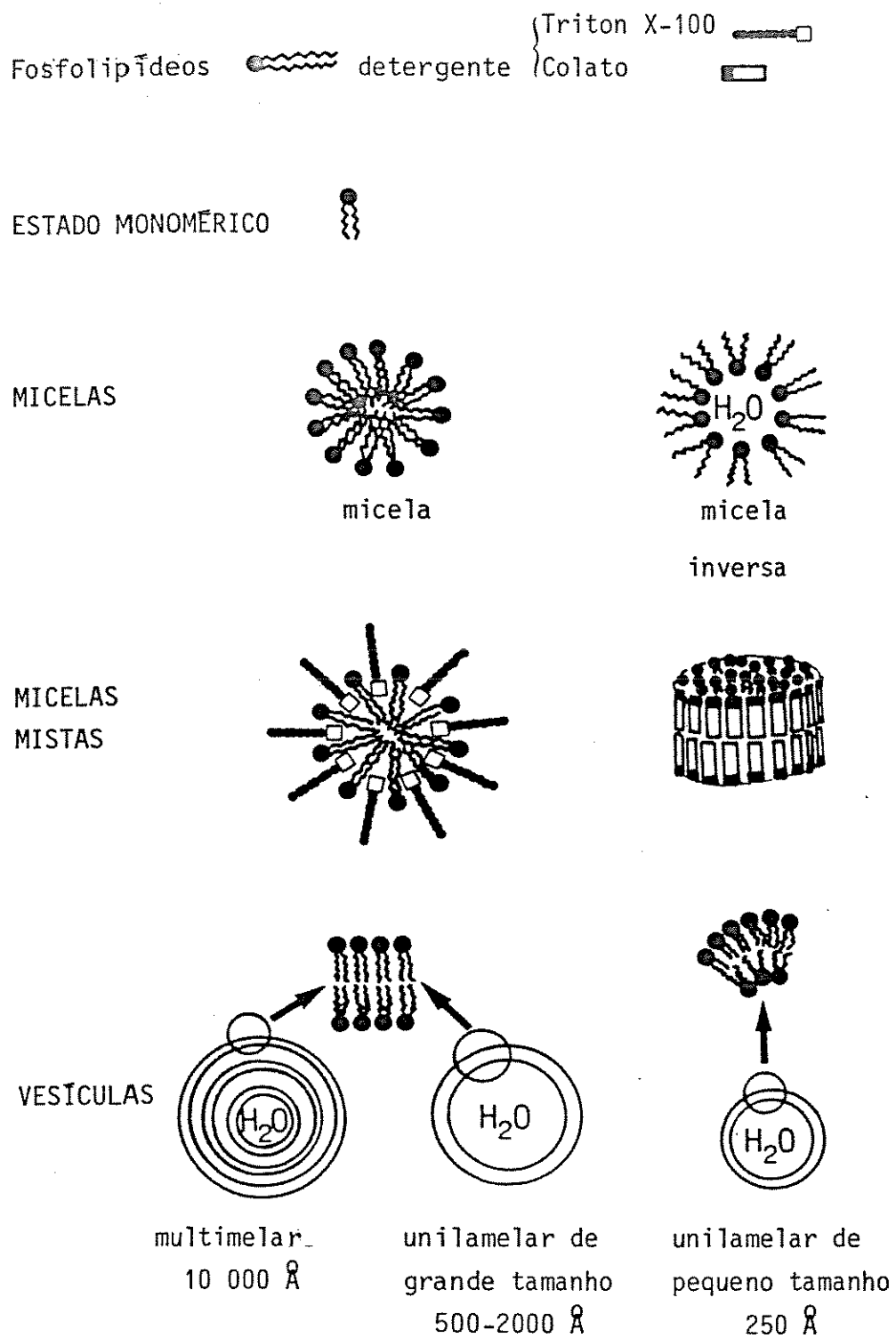
#### 1.4. SUBSTRATO E ATIVIDADE ENZIMÁTICA

O substrato das fosfolipases, os fosfolipídeos podem se apresentar sob dois estados: monomérico ou organizado. A atividade enzimática das fosfolipases é mais elevada quando é medida com um substrato organizado. O estado monomérico é o único encontrado quando a concentração de fosfolipídeos está abaixo da concentração micelar crítica. A utilização do substrato monomérico permite apenas estudar o sítio catalítico da enzima sem interferir na etapa de penetração da fase lipídica; nesse caso, a cinética clássica de MICHAELIS-MENTEN é aplicada a menos que a fosfolipase seja muito hidrofóbica e se forme uma micela em torno dela (VAN EIJK e col., 1983). Os fosfolipídeos, segundo

sua cabeça polar e cadeias hidrofóbicas, podem se organizar sob várias formas sendo as mais frequentes as micelares e as de duas camadas (FIGURA 5). As micelares são em geral representadas pelos fosfolipídeos de cadeias de ácidos graxos bastante curtas (inferiores a dez carbonos), entretanto, podemos obter micelas com cadeias mais longas desde que se utilizam detergentes (micelas mistas). As fosfolipases  $A_2$  são mais ativas sobre um substrato organizado, mas neste caso não seguem mais a cinética clássica de MICHAELIS - MENTEN (VERGER e col., 1973; TINKER e WEI, 1979; JAIN e col., 1986) e os resíduos suplementares, diferentes dos resíduos do sítio catalítico (PIETERSON e col., 1974) são envolvidos na atividade enzimática. Tanto a etapa de penetração na fase lipídica como a não absorção da enzima desempenham importantes papéis. Novos parâmetros são levados em conta, em particular a temperatura de transição dos fosfolipídeos, sua pressão lateral como também a densidade de carga da superfície lipídica, (OP DEN KAMP e col., 1974; DEMEL e col., 1975; HENDRICKSON e col., 1981). Para cada fosfolipídeo e para cada fosfolipase acima da pressão lateral podemos determinar pela técnica de monomembranas (VERGER e DE HAAS, 1976; PATTUS e col., 1979) o momento em que a enzima não pode mais penetrar nos fosfolipídeos.

## FIGURA 5.

DIFERENTES ESTRUTURAS ADOTADAS PELOS FOSFOLIPÍDEOS DISSOLVIDOS  
EM ÁGUA, SOZINHOS E EM PRESENÇA DE DETERGENTES



Ao lado da carga e da pressão lateral que podem influenciar a atividade enzimática das fosfolipases, DENNIS e col., (1981) mostraram que a fosfatidilcolina, a esfingomiéline e outras moléculas anfipáticas com a cabeça polar de colina funcionavam como ativadores. Esses compostos aumentaram de 5 a 20 vezes a atividade enzimática da fosfolipase sem aumentar a afinidade da enzima pela fase lipídica (ROBERTS e col., 1979; ADAMICH e col., 1979). Esses autores propuseram que a fosfolipase de *Naja naja* era ativa sob a forma dimérica e não sob a forma monomérica (ROBERTS e col., 1977) e que os ativadores eram capazes de induzir a dimerização (PLUCKTHUM e DENNIS, 1985).

Componentes proteicos presentes nos venenos ofídicos têm sido isolados através da gel filtração e cromatografia de troca iônica o que vem permitindo maiores esclarecimentos de suas atividades biológicas.

## II - OBJETIVOS

Nossos objetivos ao empreender o estudo sistemático da peçonha de *Bothrops lenceolatus* foram isolar a fosfolipase presente neste veneno, purificá-la e caracterizá-la química, biológica e imunoquimicamente.



### III - MATERIAIS E MÉTODOS

### 3.1. ISOLAMENTO E PURIFICAÇÃO DA FOSFOLIPASE DO VENENO DE *B. lanceolatus*

#### 3.1.1. CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO

O veneno liofilizado (2g) de *Bothrops lanceolatus* cedido pela "UNITÉ DE VENINS" do Instituto Pasteur (Paris-França) foi dissolvido durante uma hora sob agitação a 4°C em 65 ml de ácido acético 5% pH 2.3. Após a eliminação do precipitado por centrifugação a 3020 x g, durante 30 minutos a 4°C em uma centrífuga Sorvall GSA, o sobrenadante foi aplicado a coluna (5 x 120 cm) de Sephadex G-50 previamente equilibrada a 4°C com a mesma solução. O material foi eluído a uma velocidade de 50 ml/hora, coletando-se amostras de 15 ml/tubo. A absorbância das amostras foi medida a 280 nm em espectrofotômetro Uvikon 810 Kontron, (Zurich Switzerland), utilizando-se cubetas de quartzo de 1 cm de caminho ótico. 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  $-20^{\circ}\text{C}$  em frascos hermeticamente fechados.

### 3.1.2. CROMATOGRAFIA DE TROCA IÔNICA

A fração 3 ( $F_3$ ) (500 mg) obtida da cromatografia em Sephadex G-50 da primeira etapa do fracionamento foi solubilizada em 140 ml de tampão formato de amônio 50 mM pH 4.0 e centrifugada a  $3020 \times g$ , durante 30 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ . O sobrenadante foi aplicado a coluna (4 x 15 cm) de CM-celulose (CM 52) Whatman equilibrada a  $4^{\circ}\text{C}$ . A eluição do material foi iniciada com o tampão formato de amônio 50 mM pH 4.0 em volume duas vezes superior ao da coluna seguida de um gradiente linear de NaCl de 0 a 0.5 M dissolvido no mesmo tampão. As amostras de 20 ml/tubo foram coletadas numa velocidade de 90 ml/hora e as absorvâncias determinadas a 280 nm. A concentração de NaCl foi medida por condutimetria e as atividades enzimáticas como na cromatografia de exclusão. A fração que apresentou atividade fosfolipásica foi liofilizada e conservada a  $-20^{\circ}\text{C}$ . A fração  $F_3$  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 F<sub>3</sub><sup>2</sup> contendo a fosfolipase foi agrupada e liofilizada.

### 3.1.3. CROMATOGRAFIA DE TROCA IÔNICA POR FPLC EM COLUNA DE MONO-Q

A fração F<sub>3</sub><sup>2</sup> contendo aproximadamente 5 mg foi dissolvida em 3.5 ml de tampão Tris-HCl 20 mM pH 6.75, aplicada a coluna de Mono-Q (HR 5/5) trocadora de ânion previamente equilibrada com o mesmo tampão e analisada por cromatografia líquida (FPLC). O material foi eluído à temperatura ambiente numa velocidade de 1 ml/por minuto com o mesmo tampão de equilíbrio contendo LiCl em várias concentrações formando um gradiente linear descontínuo de 0 a 1M. As frações obtidas foram dessalificadas por gel filtração em coluna (1.5 x 5 cm) de Sephadex G.25 equilibrada com 1% de ácido acético, liofilizadas e armazenadas à -20°C.

### 3.2. ATIVIDADE FOSFOLIPÁSICA

A atividade fosfolipásica foi analisada de acordo com DESNUELLE e col., (1955) e NIEUWENHUIZEN e col., (1974), com algumas modificações propostas por RADVANYI e col., (1987). Como substrato foi utilizado a lecitina de ovo na concentração final de 75 mM solubilizada em colato de sódio ou Triton X-100 na presença de NaCl (100 mM) e  $\text{CaCl}_2$  (10 mM) após várias horas de agitação na temperatura ambiente. Alíquotas de 1.5 ml desta solução foram introduzidas na cubeta de um pH stat Radiometer RTS 822, (Radiometer, Copenhagen, Denmark) a 30°C sob um fluxo de nitrogênio, mantendo-se automaticamente o pH em 7.5 com NaOH (10 mM) como titulador. Iniciamos a reação adicionando a enzima em volumes menores do que 50  $\mu\text{l}$ . A atividade fosfolipásica foi determinada pela inclinação da reta e expressa em micromoles de NaOH por minuto requerido para neutralizar o ácido graxo liberado. A atividade específica era determinada dividindo-se este valor pela quantidade (em mg) de fosfolipase adicionada. Quando utilizamos a gema de ovo como substrato, dissolvemos cada gema em salina fisiológica completando o volume para 100 ml mantendo o pH 6.5 na cubeta de experimentação. Durante a purificação da fosfolipase  $A_2$  a atividade enzimática foi primeiro ensaiada em todas as frações utilizando-se o ensaio colorimétrico - baseado na mudança de pH devido à liberação de ácidos graxos (LÔBO DE ARAÚJO e RADVANYI, 1987) em microplaca MR 700

(Dynatech Chantilly, USA). As frações com atividade fosfolipásica foram analisadas no pH stat utilizando a lecitina solubilizada pelo colato de sódio.

### 3.2.1. EFEITO DO P-BROMOFENACIL BROMETO SOBRE A ATIVIDADE FOSFOLIPÁSICA

A inativação da fosfolipase foi processada como previamente descrito por RADVANYI e col., (1982).

A fração F<sub>32</sub> isolada do veneno total de *Bothrops lanceolatus* com atividade fosfolipásica foi incubada à temperatura de 30°C em 0,5 ml de tampão Tris HCl 50 mM pH 7.4 contendo 100 mM de NaCl e 1mM de EDTA por 15 minutos. Em seguida a reação foi desencadeada adicionando-se 5 µl de p-bromofenacil brometo 10 mM e/ou 5 µl de acetona. Aliquotas da mistura foram testadas em diferentes intervalos de tempo, medindo-se a atividade fosfolipásica no pH stat utilizando-se a lecitina de ovo solubilizada por colato de sódio como substrato.

### 3.3. ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA

A eletroforese em gel de poliacrilamida foi realizada na presença de SDS em placa de 1 a 1.5 mm de espessura segundo o método de LAEMMLI, (1970). As amostras foram dissolvidas em tampão Tris-HCl 150 mM pH 8; sacarose 15%; SDS 4% contendo 2% de mercaptoetanol e aquecidas em banho de água fervente por 10 minutos. Aliquotas de 30  $\mu$ l contendo 50  $\mu$ g de proteínas foram aplicadas em cada poço de gel polimerizado com o auxílio de uma seringa capilar. A eletroforese foi processada em temperatura ambiente com uma corrente constante de 35 mA. O tempo de eletroforese foi determinado pela migração do Azul de Bromofenol utilizado como indicador. Após a migração o gel foi fixado e corado durante uma hora à temperatura ambiente em solução contendo metanol 46%, ácido acético 8%, Coomassie Brilliant Blue G-250 0.25% e água 46%. O excesso do corante foi eliminado sob agitação constante em uma mistura de metanol 25%, ácido acético 10% e água 65%. Para determinar o peso molecular, proteínas padrões foram utilizadas: Aprotinin (6.500),  $\alpha$  - Bungarotoxin (8.000), Carbonic Anhydrase (30.000), Cytocrome C (13.000), Chymotrypsinogen A (25.000), Glucagon (3.500), Phospholipase A<sub>2</sub> from porcine pancreas (14.000), Soybean Trypsin Inhibitor (21.500).

### 3.3.1. ISOELETROFOCALIZAÇÃO EM GEL DE POLIACRILAMIDA

A isoeletrofocalização em gel de poliacrilamida foi processada em presença de ampholine utilizando-se placas de vidro (10 x 24 cm) de 1 a 3 mm de espessura separadas por uma borracha de 2 mm, presas com pinças metálicas de modo a formar entre elas um espaço retangular que foi preenchido com 60 ml de gel para polimerização. Duas horas após, foram retiradas as pinças, a borracha e com o auxílio de uma espátula uma das placas foi elevada. A placa de 1mm contendo o gel polimerizado foi colocada numa cuba refrigerada do aparelho LKB Multiphor 2117. Tiras de papel (electrode paper strips) previamente mergulhadas em solução 1M de  $H_3PO_4$  ou NaOH foram colocadas na superfície do gel utilizadas respectivamente como o ânodo e o cátodo para estabelecer o contacto gel electrodo. A isoeletrofocalização foi desenvolvida a  $10^{\circ}C$ , mantendo-se a voltagem de 1.000 V, corrente de 25 mA. Passados os 30 minutos de pré-isoeletrofocalização, amostras de 10 a 20  $\mu$ l contendo aproximadamente 2 mg/ml de proteínas foram aplicadas em pequenos poços de um material plástico colocado paralelamente aos eletrodos na superfície do gel. O tempo de isoeletrofocalização foi determinado pela velocidade de migração do citocromo C. A seguir o gel foi seccionado em pedaços de 0,5 cm, transferidos para tubos de ensaio contendo 1 ml de  $H_2O$  destilada, permanecendo a  $4^{\circ}C$  durante a noite.



Paralelamente, as medidas de pH e a atividade fosfolipásica foram determinadas. O restante do gel foi fixado por 45 minutos, lavado 3 vezes em 15 minutos e corado durante toda a noite numa solução contendo 0.12% de Coomassie Brilliant Blue R 250 como descrito em LKB application Note 250 (December, 1977). Proteínas com pontos isoelétricos conhecidas foram submetidas às mesmas condições: Glucose Oxidase (pH 4.15), Soybean Trypsin Inhibitor (pH 4.55),  $\beta$ -lactoglobulin A (pH 5.20), Bovine Carbonic Anhydrase (pH 5.85).

#### 3.4. TESTES IMUNOQUÍMICOS DE IMUNODIFUSÃO E IMUNOELEKTROFORESE

Nas técnicas de imunodifusão as amostras foram analisadas em gel de agarose a 1% em meio salino segundo OUCHTERLONY, (1967). As imunoeletroforeses foram realizadas conforme as indicações de GRABAR e BURTIN, (1964) empregando-se placas de vidro (12 x 9 cm) contendo uma camada de 1,5 mm de agarose a 1% em tampão veronal 50 mM pH 8.4 e um gradiente de potencial de 6 volts/cm durante 1 hora. As imunoeletroforeses cruzadas foram processadas em placas (12x 9 x 0.15cm) de gel de agarose a 1% em tampão veronal 50 mM pH 8.6 contendo as amostras para análise e submetidas à diferença de potencial de 6 volts/cm durante 1 hora na primeira dimensão,

e 2 volts/cm durante 18 horas na segunda dimensão, a temperatura de 40°C. Antes da eletroforese na segunda dimensão, uma faixa central da placa de gel foi retirada, e este espaço preenchido com a mistura de agarose e o imunesoro na proporção de 10%. Passado esse tempo as placas foram lavadas com solução de NaCl 150 mM, colocadas para secar a 37°C e coradas com solução de azul de coomassie.

### 3.5. ANÁLISE DE AMINOÁCIDOS

Para análise da composição em aminoácidos, amostras contendo 30 e 50 µg de proteínas foram hidrolisadas a vácuo em 100 µl de HCl 6N por 15, 48 e 72 horas a 110°C (SPACKMANN e col., 1958). O material hidrolisado foi analisado em analisador de aminoácidos Biotronik LC 5001 de acordo com HUMMEL, (1959) em uma única coluna. A determinação de tirosina foi feita após 15 horas de hidrólise com 0.2% de fenol. A de metionina como metionina sulfona e os resíduos de meia cisteína estimados como ácido cisteico. Ambos foram oxidados com ácido performico como descrito por HIRS, (1967). A proporção de tirosina para triptofano foi calculada pelo método de BEAVEN e HOLLIDAY, (1952) registrando-se a absorção da proteína em espectrofotômetro com NaOH 100 mM.

### 3.6. DETERMINAÇÃO QUANTITATIVA DE PROTEÍNAS

A concentração proteica das diferentes preparações foi determinada pelo reativo do biureto segundo WEICHSELBAUM, (1946) e pelo reagente de Folin-Ciocalteu, segundo o método de LOWRY e col., (1951) modificado por HARTREE, (1972) utilizando-se como padrão a proteína BSA. O coeficiente de extinção molar das proteínas foi determinado a 280 nm em espectrofotômetro Zeiss PMQ-II, utilizando-se cubetas de quartzo com 1 cm de caminho ótico como definido por LAMBERT e BEER.

### 3.7. ATIVIDADE PROTEOLÍTICA E TAME-ESTERÁSICA

A atividade proteolítica foi determinada utilizando-se a caseína como substrato, segundo método de KUNITZ, (1946) modificado por MANDELBAUM e col., (1982). A solução de caseína foi preparada no momento do uso, dissolvendo-se 1 g de caseína em 50 ml de tampão Tris - HCl 0,2 M pH 8.8. Após 20 minutos de aquecimento a solução foi filtrada e o volume completado para 50 ml com água destilada, resultando numa solução de caseína a 2%. A solução

de ensaio continha 1,0 ml de caseína 2%, 0,1 ml de  $\text{CaCl}_2$  80 mM e 0,9 ml de NaCl 150 mM e/ou da enzima (veneno total). Passados 30 minutos incubados a 37°C a reação foi interrompida com 3,0 ml de ácido tricloroacético a 5% (TCA). Os tubos eram deixados 60 minutos em banho de gelo. Em seguida cada amostra foi filtrada e 1,0 ml de cada filtrado foi submetido a dosagem proteica seguindo o método de HARTREE, (1972).

Por definição, uma unidade de atividade proteolítica corresponde a uma quantidade de enzima que produz um acréscimo na absorvância de 1,0 ~~mm~~ por minuto de digestão da caseína. A atividade específica foi expressa em unidades de atividade por miligrama de proteína.

O teste de atividade TAME esterásica foi realizado de acordo com HUMMEL, (1959) em pH 8.1 com tampão Tris HCl 50 mM contendo 10 mM de  $\text{CaCl}_2$  e o substrato p-toluenosulfonil-L-arginina metil ester (TAME), na concentração final de 1 mM. Aliquotas de 2  $\mu\text{l}$  de cada tubo das cromatografias de exclusão e/ou troca iônica eram adicionadas a 1 ml do tampão com o substrato cada 30 segundos e lidas a 247 nm em espectrofotômetro Uvikon 810 (Kontron, Zurich Switzerland).

### 3.8. ATIVIDADES BIOLÓGICAS

#### 3.8.1. TOXICIDADE

O poder letal do veneno total ou da fração F<sub>3</sub>2 com atividade fosfolipásica isolada do veneno de *Bothrops lanceolatus* foi estudado por inoculação i.v., e i.p., em camundongos da raça Swiss (18 a 22 g) e i.v. em pintainhos (50 a 60 g) empregando-se doses seriadas com razão de 1.5. Cada animal foi injetado com 0,5 ml, utilizando-se seis animais por dose. Os resultados foram registrados depois de 24 horas e estimados de acordo com o método de WEIL, (1952).

As DL<sub>50</sub> e seus intervalos de confiança a 95% foram expressas em mg/kg tanto para camundongos como para pintainhos.

#### 3.8.2. ATIVIDADE HEMORRÁGICA

A atividade hemorrágica foi determinada baseada no método de KONDO col., (1960) com algumas modificações. Camundongos Swiss brancos de 20 g aproximadamente foram injetados com 0,1 ml de diferentes concentrações do veneno

total e da fração F<sub>3</sub>2 com atividade fosfolipásica por via intradérmica no dorso. Após seis horas os animais foram sacrificados, as peles removidas e observada a presença de área hemorrágica. Os animais controles foram injetados com igual volume de salina. A dose mínima hemorrágica (DMH) corresponde a menor quantidade de veneno capaz de causar área hemorrágica com 5.0 mm de diâmetro foi assim determinada.

### 3.8.3. ATIVIDADE HEMOLÍTICA

O ensaio hemolítico do veneno total de *B. lanceolatus* e da fração F<sub>3</sub>2 foi estimado utilizando - se somente eritrócitos lavados ou suplementados com gema de ovo conforme descrito por GUTIERREZ e col., (1984). A susensão de eritrócitos foi obtida de sangue humano por punção venosa com citrato de sódio como anticoagulante. O plasma foi separado por centrifugação e as hemácias lavadas três vezes com soro fisiológico tamponado com fosfato de sódio 0,01 M pH 7.2 (PBS). A suspensão de eritrócitos foi preparada ã 2.5% no mesmo tampão. Para o mesmo ensaio, 10  $\mu$ l da amostra (veneno total ou fração F<sub>3</sub>2 foram adicionadas a 600  $\mu$ l da suspensão de eritrócitos contendo ou não 50  $\mu$ l de uma suspensão de gema de ovo, (1 gema em 100 ml

de salina), 50  $\mu$ l de  $\text{CaCl}_2$  10 mM, completando-se o volume para 3 ml com tampão PBS. Após 30 minutos de incubação a 37°C, os tubos foram centrifugados por 5 minutos, os sobrenadantes lidos a 540 nm, sendo o resultado comparado com os tubos controles que foram incubados sem as amostras analisadas e um hemolisado, colocando-se  $\text{H}_2\text{O}$  destilada em lugar de tampão. Uma unidade de atividade hemolítica corresponde a um aumento de 0.001 de absorvância em 540 nm por minuto de reação. A atividade hemolítica foi expressa em unidade por  $\mu$ g. (U/ $\mu$ g).

#### 3.8.4. ATIVIDADE AGREGANTE

A atividade agregante do veneno de *B. lanceolatus* ou da fração  $F_32$  com atividade fosfolipásica foi estudada em plasma rico em plaquetas (PRP).

O plasma rico em plaquetas foi preparado de sangue humano normal coletado por punção venosa com citrato de sódio a 3.8%. As plaquetas foram contadas e o número ajustado para  $400 \times 10^3/\mu\text{l}$  com um plasma pobre em plaquetas obtido por centrifugação (10 minutos a 4000 rpm) do sangue que restou para obtenção do PRP.

A agregação foi determinada fotometricamente como descrito no método de BORN e CROSS, (1963), 400  $\mu$ l de PRP foram adicionados a cubetas do agregometro (Chrono-log) agitados em 1000 rpm a 37°C. Em seguida amostras do veneno ou da fração  $F_{32}$  com atividade fosfolipásica foram adiciona - das ao PRP 2 minutos antes do agente agregante testado (ADP 10  $\mu$ M) sendo a agregação monitorada durante 5 minutos.

### 3.9. ESTUDO DA ATIVIDADE COAGULANTE

A ação coagulante do veneno de *Bothrops lanceolatus* ou da fração  $F_{32}$  com atividade fosfo lipásica foi avaliada sobre plasma e fibrinogênio medindo - se o tempo de coagulação a 37°C ao primeiro sinal de forma ção de rede de fibrina.

Amostras de 50  $\mu$ l do veneno total e da fração  $F_{32}$  em diferentes concentrações foram adicionadas a 200  $\mu$ l de plasma humano normal citratado sendo cronometrado o tempo de coagulação. Nas mesmas condições determinamos o tempo de coagulação adicionando 50  $\mu$ l de  $CaCl_2$  25 mM.

A atividade tipo trombina foi determinada medindo-se a coagulação em uma solução 2 mg/ml de fibrinogênio



humano (KABI SUÉCIA). Amostras de 50  $\mu$ l do veneno total em diferentes concentrações e da fração F<sub>3</sub><sup>2</sup> foram adicionadas a 200  $\mu$ l da solução de fibrinogênio humano a 37°C.

O tempo de formação do coágulo foi determinado inclinando-se o tubo a intervalos regulares de tempo.

### 3.9.1. A ATIVIDADE FIBRINOGENOLÍTICA

Foi determinada incubando-se a 37°C, 200  $\mu$ l de fibrinogênio com 50  $\mu$ l da solução de veneno 125  $\mu$ g/ml durante um e dois minutos. Passado o tempo adicionamos 50  $\mu$ l de Trombina Bovina 100 U/ml (HOFMANN-LA ROCHE-SUIÇA) registrando-se o tempo de coagulação.

### 3.9.2. A ATIVIDADE FIBRINOLÍTICA

Foi medida a 37°C incubando-se 200  $\mu$ l de fibrinogênio, 50  $\mu$ l de diferentes concentrações de veneno e 50  $\mu$ l de trombina. Após formação de coágulo observamos a

lise deste, no intervalo de uma a vinte e quatro horas.

### 3.9.3. AÇÃO ANTICOAGULANTE SOBRE PLASMA

A ação anticoagulante do veneno de *B. lanceolatus* ou da fração F<sub>3</sub>2 com atividade fosfolipásica foi determinada a 37°C em duas etapas. Inicialmente foram adicionadas a 100 µl de plasma humano normal citratado, 50 µl do veneno ou de fração com atividade fosfolipásica na concentração de 50 µg mais 100 µl do reagente Roche de TTPA (Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada). Após 3 minutos de incubação, adicionamos 100 µl de CaCl<sub>2</sub> 25 mM e cronometramos o tempo de coagulação.

### 3.10. PREPARAÇÃO MUSCULAR BIVENTER CERVIVIS DE PINTAINHO

Foi utilizada a preparação músculo biventer cervicis de pintainho, de acordo com a técnica descrita por GINSBORG e WARRIER, (1960).

Pintainhos de quatro a oito dias foram sacrificados e o músculo biventer cervicis foi isolado em solução de Krebs (mmol/l 0.54, NaCl 118,0; KCl 4,7; CaCl<sub>2</sub> 2,5 ; MgCl<sub>2</sub> 6 H<sub>2</sub>O 0,54; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> H<sub>2</sub>O 1,01 ; Glicose 11,1; NaHCO<sub>3</sub> 25,0; oxigenada pelo borbulhamento de carbogênio 95% de O<sub>2</sub> e 5% de CO<sub>2</sub>).

A preparação foi transferida para uma cuba com capacidade de 5 ml mantida a 37°C sob tensão constante de 1g, estimulada por eletrodos bipolares e ligada a um transdutor miográfico isotônico MK II para registro das contrações musculares em fisiógrafo Narco.

Após 30 minutos de espera (registro controle), diferentes concentrações do veneno total ou da fração F<sub>32</sub> com atividade fosfolipásica, foram adicionadas à cuba sendo mantido o registro das contrações por mais de 120 minutos. A preparação foi submetida à estimulação elétrica de campo com estímulos máximos de 0.2 mseg de duração e 0.1 HZ de frequência por um estimulador Grass modelo S<sub>4</sub>.

#### IV - RESULTADOS

#### 4.1. ATIVIDADE FOSFOLIPÁSICA

A tabela I mostra a atividade fosfolipásica de diferentes venenos ofídicos usando-se como substrato gema de ovo em salina ou lecitina de ovo solubilizada em colato de sódio ou Triton X-100 utilizando o pH stat para os ensaíos.

A fosfolipase isolada de pâncreas de porco foi utilizada como controle.

## TABELA I

COMPARAÇÃO DA ATIVIDADE FOSFOLIPÁSICA DE VÁRIOS VENENOS OFÍDICOS

VENENOS OFÍDICOS	ATIVIDADE ENZIMÁTICA (umoles/min/mg)		
	Gema de ovo	lecitina/ Triton	lecitina/ Colato
<i>B. atrox</i>	17	52	33
<i>B. jararacussu</i>	12	42	42
<i>B. lanceolatus</i>	2.7	28	19
<i>B. newiiedi</i>	14	39	63
<i>Naja naja</i>	80	58	9.5
<i>Ophiophagus hannah</i>	16	32	9.5

10 mg de cada veneno foram dissolvidos em 1 ml de água destilada a 40°C imediatamente antes de ser testada a atividade enzimática.

Embora todos os venenos tenham atividade fosfolipásica similar quando esta foi determinada em presença de detergente, colato de sódio ou Triton X-100, pode-se observar que comparada aos outros venenos, a atividade fosfolipásica do veneno de *B. lanceolatus* é baixa quando determinada em gema de ovo na ausência de detergente. Mais ainda, o estudo cinético desta atividade mostrou-se tempo dependente (tabela II e figura 6).

## TABELA II

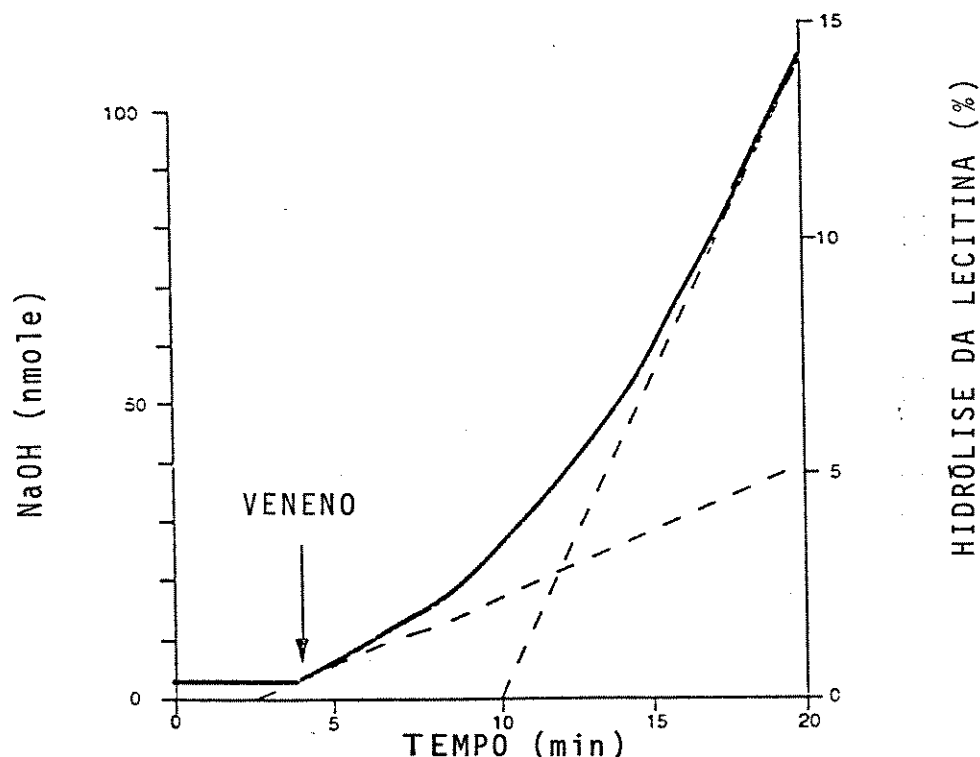
ATIVIDADE FOSFOLIPÁSICA DE 30  $\mu$ g DE VENENO DE  
*B. lanceolatus* EM FUNÇÃO DO TEMPO

TEMPO (MIN)	HIDRÓLISE (%)	ATIVIDADE PLA <sub>2</sub> (umoles/min)
0	0	0.06
2	0.8	0.07
6	2.4	0.07
12	6.4	0.09
18	10.4	0.10

A percentagem de hidrólise no tempo (t) foi calculada dividindo-se os moles de fosfolipídeo hidrolisado no tempo (T) pela quantidade total de fosfolipídeo. Este último valor foi medido pela técnica de pH stat hidrolizando-se completamente o substrato em pH 8.0 com 10  $\mu$ g de fosfolipase A<sub>2</sub> de veneno de abelha que nos deu o valor de 17,5 umoles de fosfolipídeos totais.

## FIGURA 6

CINÉTICA DA HIDRÓLISE DE LECITINA DE OVO POR VENENO DE *B. lanceolatus*



A cinética de hidrólise foi determinada pela atividade fosfolipásica de 30  $\mu\text{g}$  de veneno de *B. lanceolatus* utilizando-se a gema de ovo como substrato.

### 4.1.1. ATIVAÇÃO PROGRESSIVA DA ATIVIDADE FOSFOLIPÁSICA DO VENENO DE *B. lanceolatus*

Com o propósito de investigar a causa do aumento progressivo na velocidade da hidrólise (figura 6 e tabela II) examinamos o comportamento de ácidos graxos lisoderivados obtidos pela hidrólise prévia de lecitina por 0,1  $\mu\text{g}$  de fosfolipase de veneno de abelha antes das 30  $\mu\text{g}$  habituais do veneno de *B. lanceolatus*.



## TABELA III

ATIVIDADE FOSFOLIPÁSICA DE 30  $\mu\text{g}$  DE VENENO DE  
*B. lanceolatus* EM FUNÇÃO DA PRÉ HIDRÓLISE COM  
 0,1  $\mu\text{g}$  DE  $\text{PLA}_2$  DE VENENO DE ABELHA

TEMPO DE PRÉ - HIDRÓLISE (MIN)	HIDRÓLISE (%)	ATIVIDADE $\text{PLA}_2^*$ DE <u>B. lanceolatus</u>
1.5	0.35	0.064
3.5	0.8	0.07
26	5.5	0.10
45	10	0.12

\* Esta atividade foi obtida subtraindo-se a atividade antes da adição do veneno (que corresponde à atividade da  $\text{PLA}_2$  do veneno de abelha) da atividade obtida depois da adição do veneno.

A tabela III mostra que a velocidade de hidrólise aumenta com a percentagem de pré-hidrólise alcançando um valor máximo em torno de 5% de fosfolípídeo hidrolisado. Interessante é observar que a mesma percentagem de hidrólise foi necessária para a obtenção da atividade máxima do veneno quer na presença (tabela III) ou ausência da fosfolipase do veneno de abelha (figura 6 e tabela I).

As características da atividade fosfolipásica do veneno de *B. lanceolatus* e a possibilidade de que seu comportamento enzimático estivesse associado à presença de um inibidor responsável pelo platonamento observado após alguns minutos de reação levou-nos a fracionar o veneno total com o objetivo de isolar as frações envolvidas com a atividade fosfolipásica e analisar suas propriedades em maiores detalhes.

#### 4.2. ISOLAMENTO DA FOSFOLIPASE

##### FRACIONAMENTO DO VENENO DE *B. lanceolatus* EM SEPHADEX G-50

A primeira etapa do fracionamento compreendeu a filtração do veneno total de *B. lanceolatus* em gel de Sephadex G-50 em coluna equilibrada com solução de ácido acético 5%.

O perfil cromatográfico mostra a existência de quatro frações detectadas pela absorvância em 280 nm que foram designadas por  $F_1$  a  $F_4$  como mostra a figura 7. As atividades esterásica e fosfolipásica foram detectadas nas frações  $F_2$  e  $F_3$  respectivamente. Estas frações foram agrupadas, como indicado na figura e liofilizada.

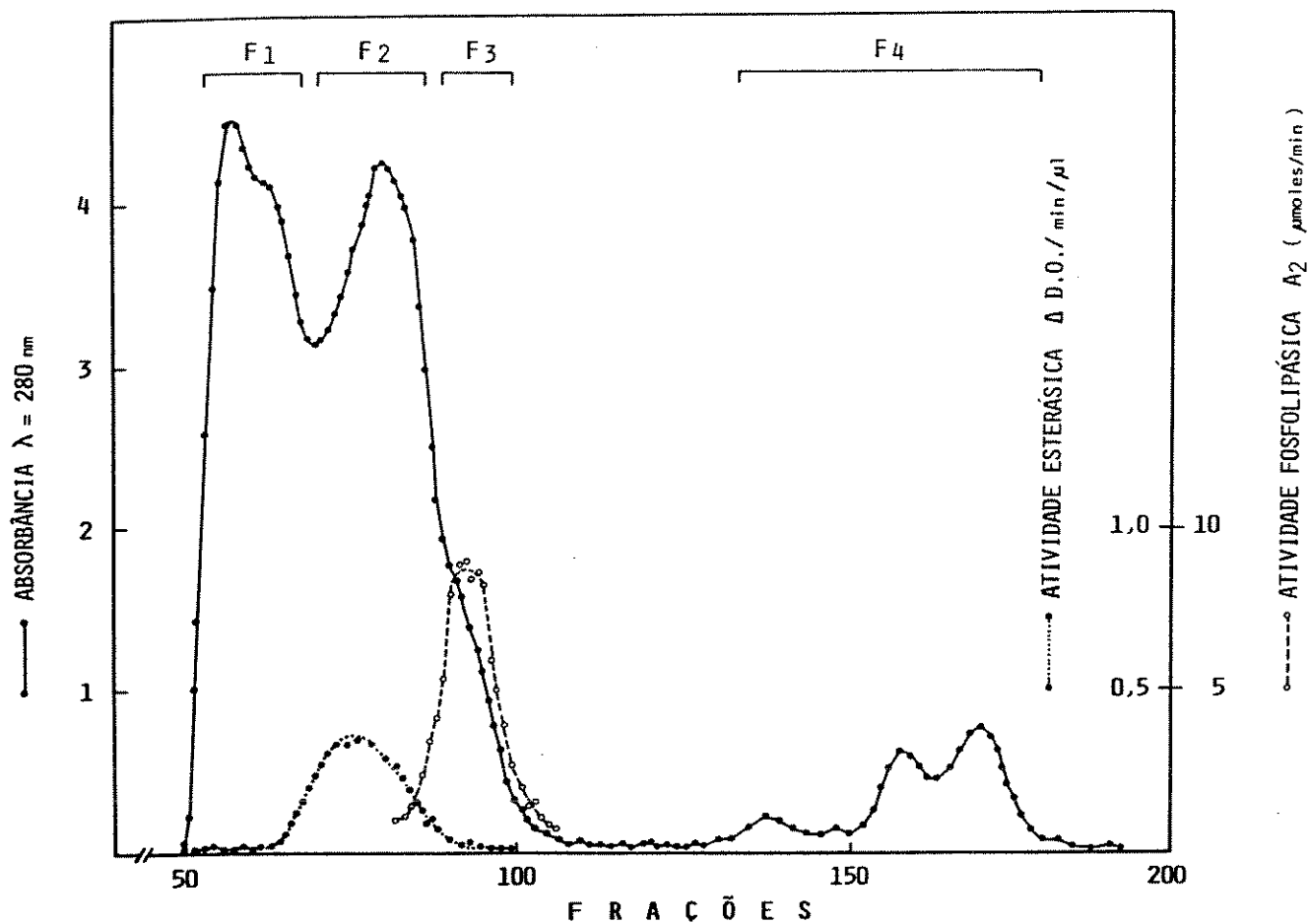


FIGURA 7. Cromatografia de Exclusão em Sephadex G-50 de 2 g de veneno de *B. lanceolatus* em ácido acético 5% pH 2.3 a 40°C; coluna 120x5,0 cm; fluxo 50 ml/h e coletados 15 ml/tubo.

#### 4.2.1. CROMATOGRAFIA DA FRAÇÃO $F_3$ EM COLUNA DE CM-CELULOSE

A atividade fosfolipásica do veneno foi eluída como um pico simples ( $F_3$ ) contaminado pela atividade TAME esterásica oriunda da  $F_2$ . A  $F_3$  foi então concentrada por liofilização e submetida a cromatografia de troca iônica em uma coluna de CM-celulose (figura 8). Entre as frações resultantes uma foi proeminente formando um largo pico. Nesta fração que denominamos  $F_{31}$ , predominava a atividade fosfolipásica. Esta fração foi imediatamente liofilizada e submetida a gel filtração nas mesmas condições da primeira etapa do fracionamento. Obtivemos nesta etapa um pico estreito onde se concentrava a atividade fosfolipásica o qual denominamos  $F_{32}$ . A fase ascendente deste pico encontra-se ainda contaminada com a atividade TAME esterásica que caracteriza o pico menor que antecede (figura 9).

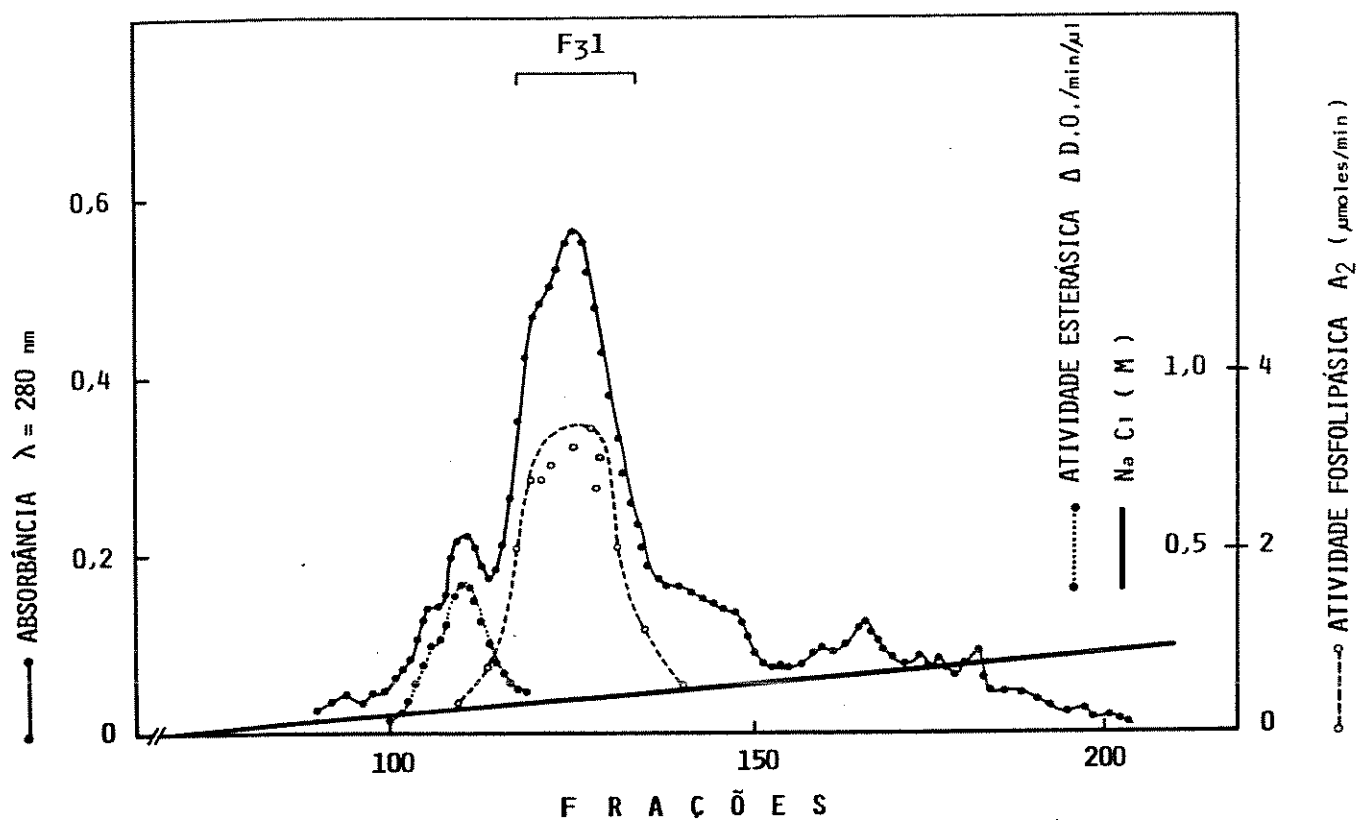


FIGURA 8. Cromatografia de troca iônica em CM-celulose de 500 mg da fração F<sub>3</sub> (Fig. 6) em formato de amônio 50 mM pH 4.0 a 49°C; coluna 15x4 cm; fluxo 90 ml/h e coletados 20/ml tubo. A eluição foi realizada com um sistema tampão em gradiente linear de NaCl como descrito em materiais e métodos.

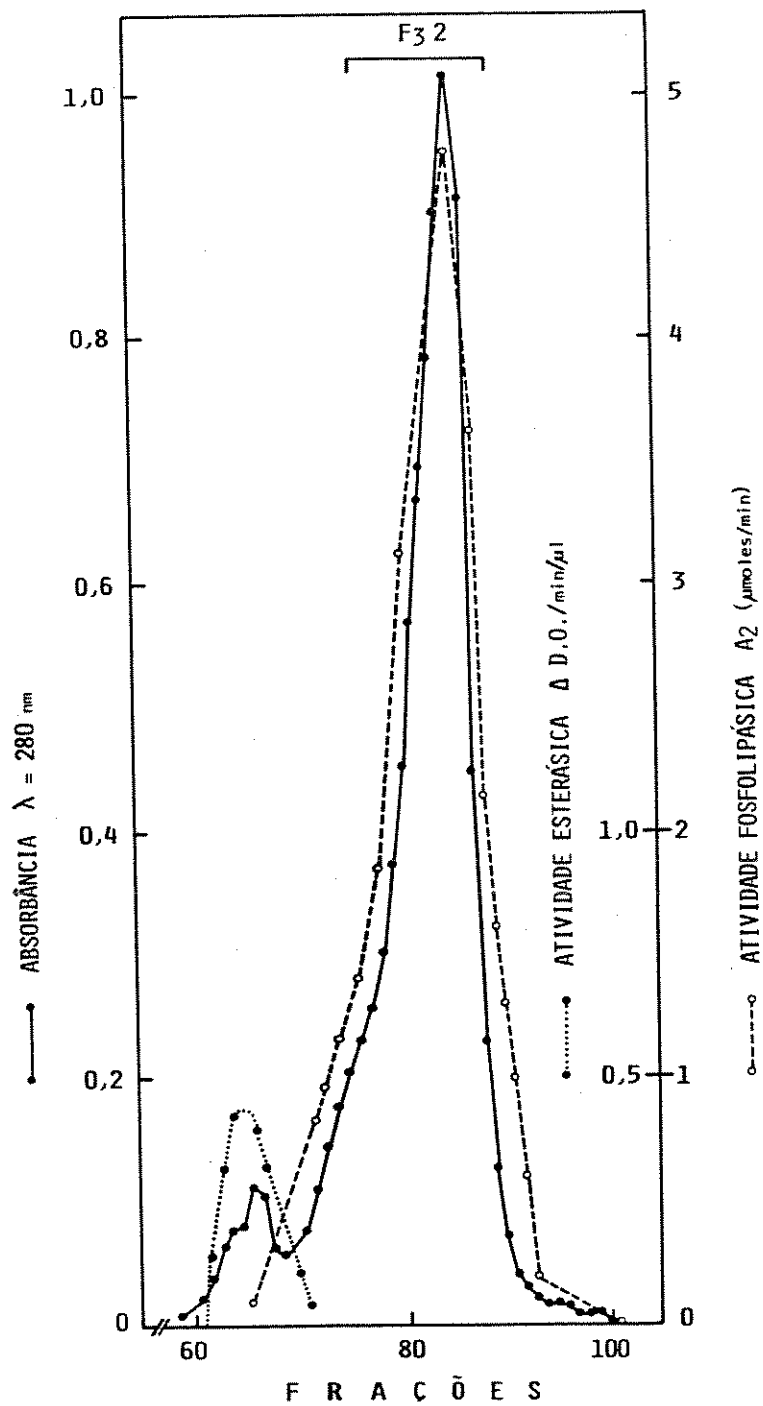


FIGURA 9. Refiltração em Sephadex G-50 da fração  $F_3 1$  (Fig. 7). Condições idênticas às da figura 6.

#### 4.3. ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRIMILAMIDA COM SDS DO VENENO TOTAL E DAS FRAÇÕES TRATADAS COM MERCAPTOETANOL

A figura 10 mostra a análise eletroforética em gel de poliacrílamida (20%) na presença de SDS (4%) do veneno total de *B. lanceolatus* e das frações obtidas durante as etapas já descritas.

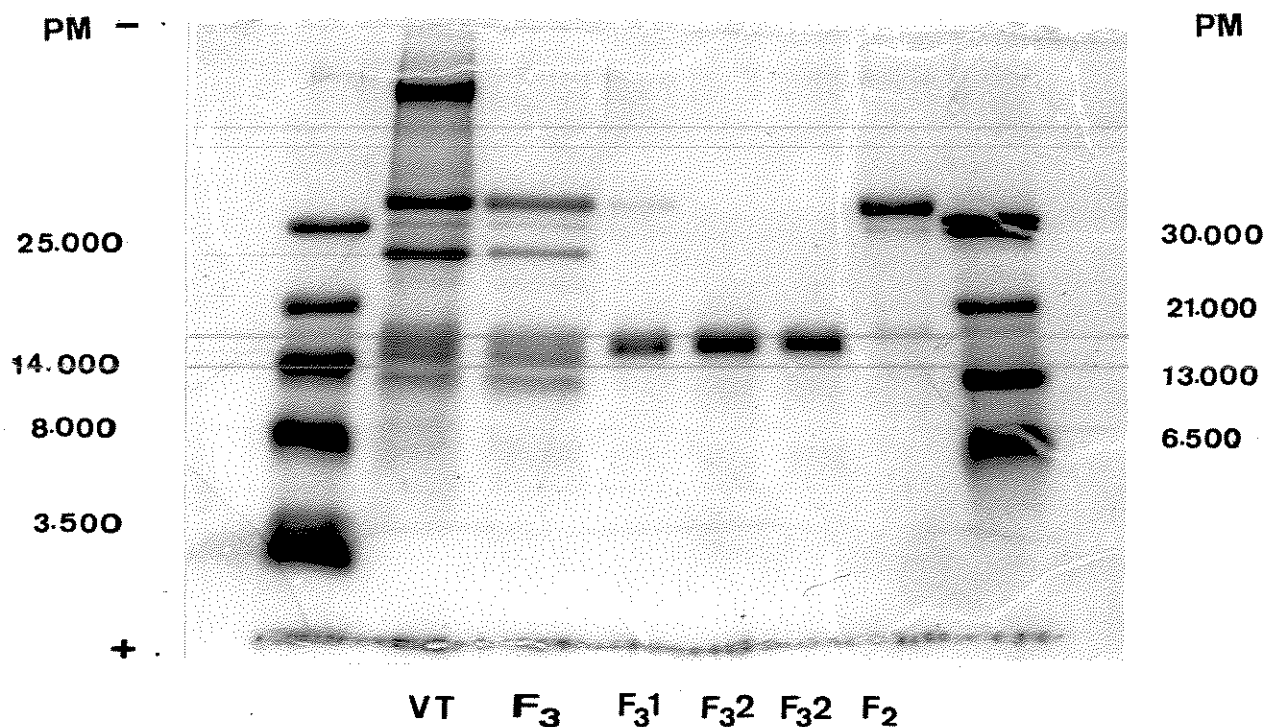


FIGURA 10. Eletroforese em gel de poliacrílamida com SDS do veneno total (VT) de *B. lanceolatus* e suas frações tratados com mercaptoetanol (2%). F<sub>2</sub> e F<sub>3</sub> obtidas na cromatografia em Sephadex G-50 (figura 7). F<sub>31</sub> obtida na cromatografia de troca iônica em CM-celulose (figura 8). F<sub>32</sub> obtida na cromatografia em Sephadex G-50 (figura 9). Nos primeiros poços à direita e à esquerda marcadores de peso molecular conhecido.

PAGE A/SDS?  
propriedades demonstrar  
f de conchas

Este perfil eletroforético mostrou que as proteínas presentes no veneno total são de PM superior a ~~12~~ kDa. <sup>12.000</sup>

Na fração F<sub>3</sub> encontram-se os componentes presentes no veneno total exceto uma proteína de alto peso molecular. A fração F<sub>3</sub>1 apresenta um componente de peso molecular de ~~15~~ kDa <sup>15000</sup> e um contaminante de PM de ~~37~~ kDa <sup>37000</sup> aproximadamente. Tudo indica que este componente representa a banda de maior concentração mostrada na fração F<sub>2</sub>. A fração F<sub>3</sub>2 corresponde a uma banda espessa de 15 kDa.

#### 4.4. ANÁLISE IMUNOQUÍMICA

A análise imunoquímica foi efetuada utilizando-se métodos de imunodifusão e imunoeletroforese, para demonstrar a antigenicidade do veneno total e da fração F<sub>3</sub>2 bem como o nível de pureza desta fração que encerra a atividade fosfolipásica frente ao anti-soro pluriespecífico cedido pela unidade de venenos do Instituto Pasteur de Paris.



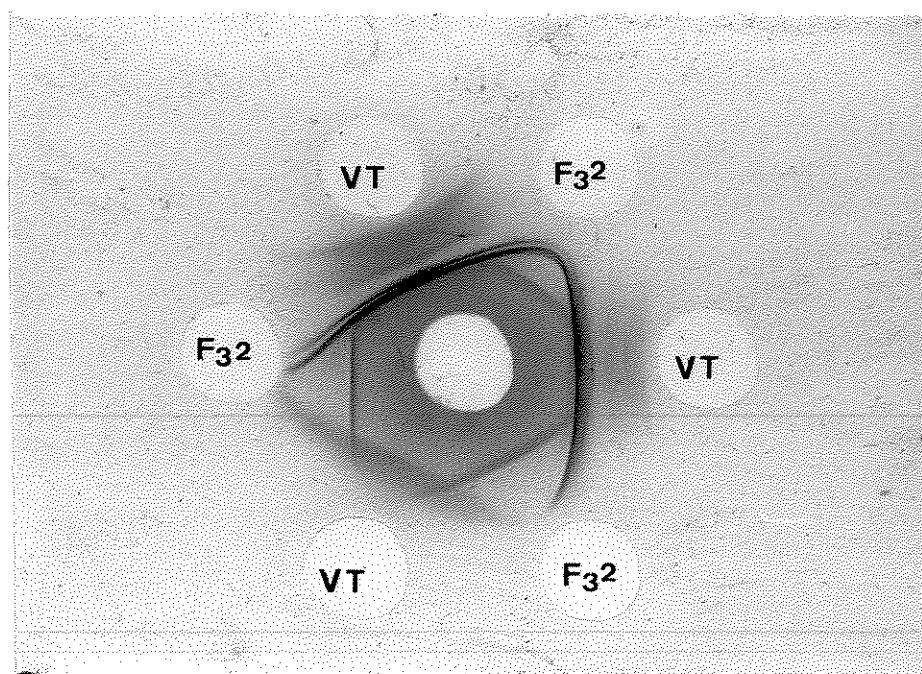


FIGURA 11. Análise comparativa por imunodifusão entre veneno total (VT) e a fração  $F_{32}$  frente ao anti-soro total de *B. lanceolatus* utilizando-se diferentes concentrações do antígeno em gel de ágar.

Concentração dos antígenos: 1000, 500 e 100  $\mu\text{g/ml}$ .

Os resultados obtidos com o veneno de *B. lanceolatus* e a fração  $F_{32}$  em imunodifusão (figura 11) mostram que o anti-soro identifica diferentes componentes no veneno total e aparentemente apenas um componente na fração que contém a fosfolipase.

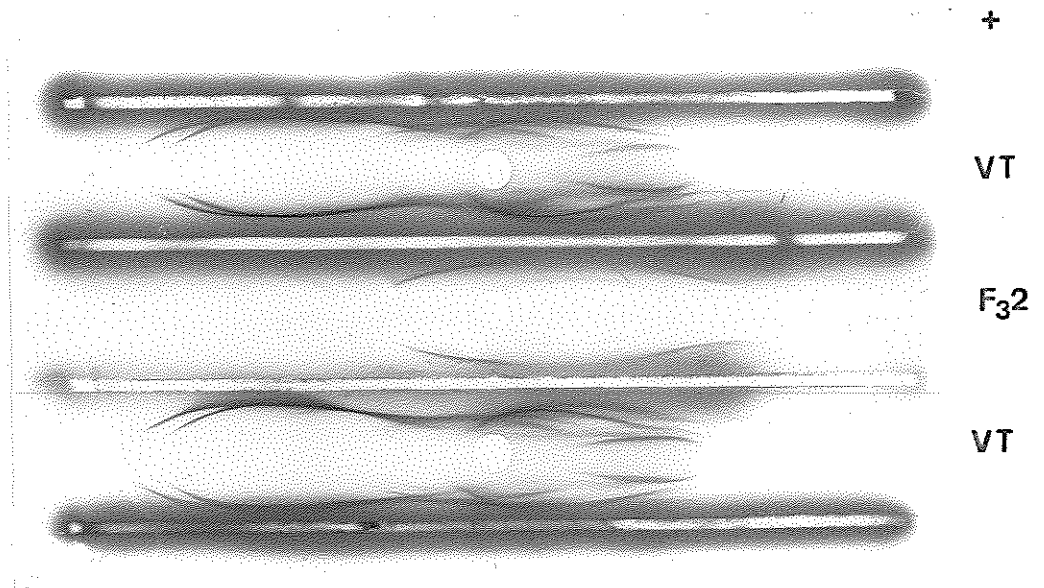


FIGURA 12. Análise imunoeletroforética comparativa entre o veneno total (VT) e a fração F<sub>32</sub> frente ao anti-soro total de *B. lanceolatus*. Concentração dos antígenos 2 mg/ml.

O mesmo sistema agora analisado por imunoeletroforese mostra que apesar da complexidade de linhas precipitantes entre o veneno total e o anti-soro, a fração contendo a fosfolipase apresenta um sistema precipitante principal heterogêneo e um segundo componente interno em baixa concentração (figura 12).

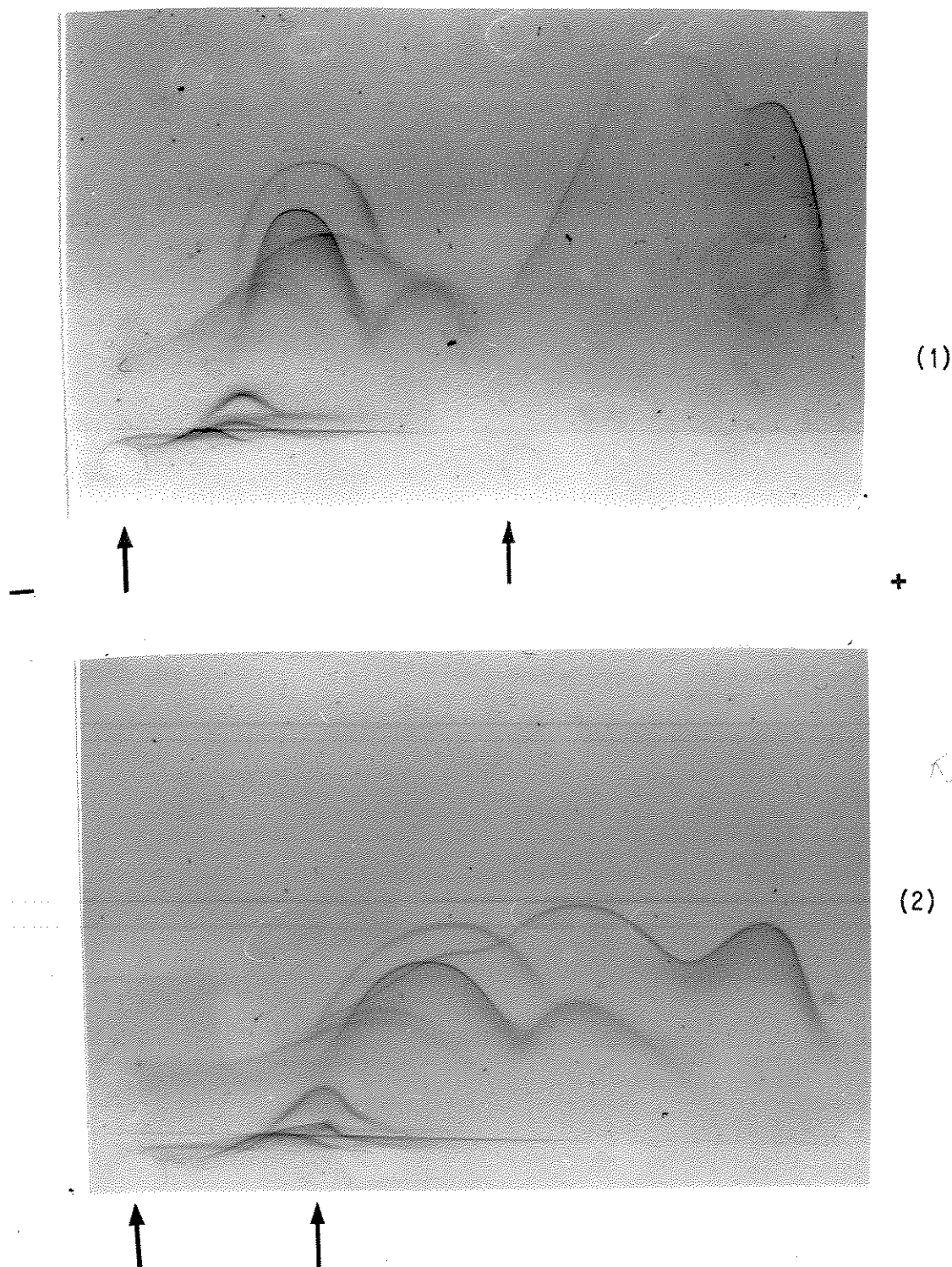


FIGURA 13. Análise imunoeletroforética bidimensional (cruzada) comparativa entre o veneno total e a fração F32 frente ao anti-soro total de *B. lanceolatus* diluído 1:10 em gel de Agarose.  
 (1) Separação independente veneno total e fração F32 1mg/ml.  
 (2) Técnica de "Tandem-Cross" veneno total e fração F32 1 mg/ml.

A figura 13 (1) mostra que enquanto o veneno a apresenta vários componentes, a  $F_3^2$  é constituída por um único componente heterogêneo. Ainda o mesmo sistema analisado pela técnica de Tandem-Cross (Figura 13 (2)) mostra uma identidade entre a fração contendo a fosfolipase e um dos constituintes do veneno total e resalta o estágio de purificação da fosfolipase pois provavelmente o segundo componente que foi detectado na imunoeletroforese simples apresenta a mesma composição antigênica porque migra aqui como componente único.

#### 4.5. ISOELETROFOCALIZAÇÃO EM GEL DE POLIACRILAMIDA

A banda espessa obtida com a fração  $F_3^2$  através de eletroforese em gel de poliacrilamida apresentou extensa linha de precipitação nas análises imunoeletroforéticas o que nos levou a prosseguir sua análise por eletrofocalização.

Na figura 14 apresentamos a análise da fração -  $F_3^2$  por isoeletrofocalização em gel de poliacrilamida em presença de ampholine pH 4-6, na qual se demonstrou a presença de dois componentes com pontos isoeletrícos 5.1 e 5.6.

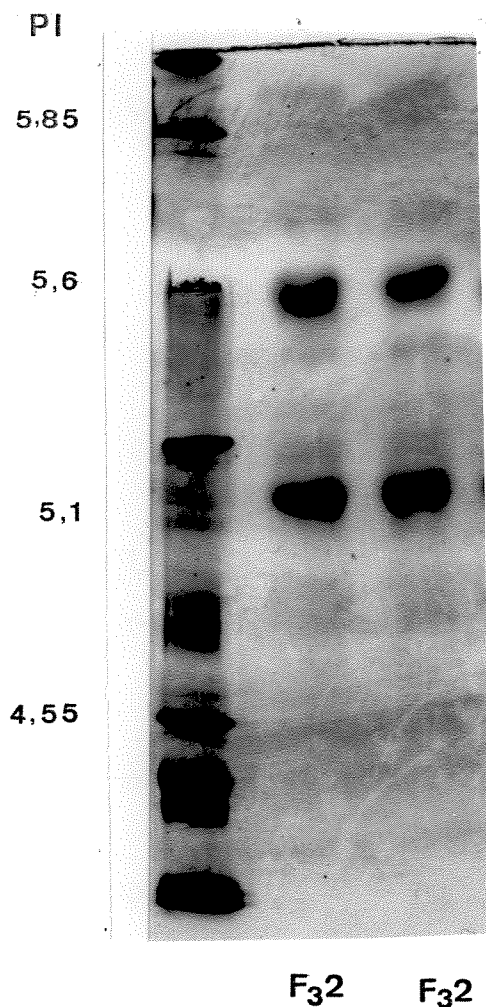


FIGURA 14. Isoeletrofocalização da fração  $F_32$  em gel de poliacrilamida com ampholine pH entre 4-6. A esquerda proteínas padrões de pontos isoelétricos conhecidos.

Na figura 15 observamos o registro da atividade fosfolipásica desta fração e do veneno total medidas por espectrofluorometria utilizando-se fosfolipídeos negativos ou Zwitterionicos que sugerem a presença de componentes com com posição antigênica igual e uma heterogeneidade de carga.

Note-se que as duas posições ativas encontram-se nos pHs 5.1 e 5.6, posições essas correspondentes aos componentes da fração  $F_32$  detectados pela isoeletrofocalização.

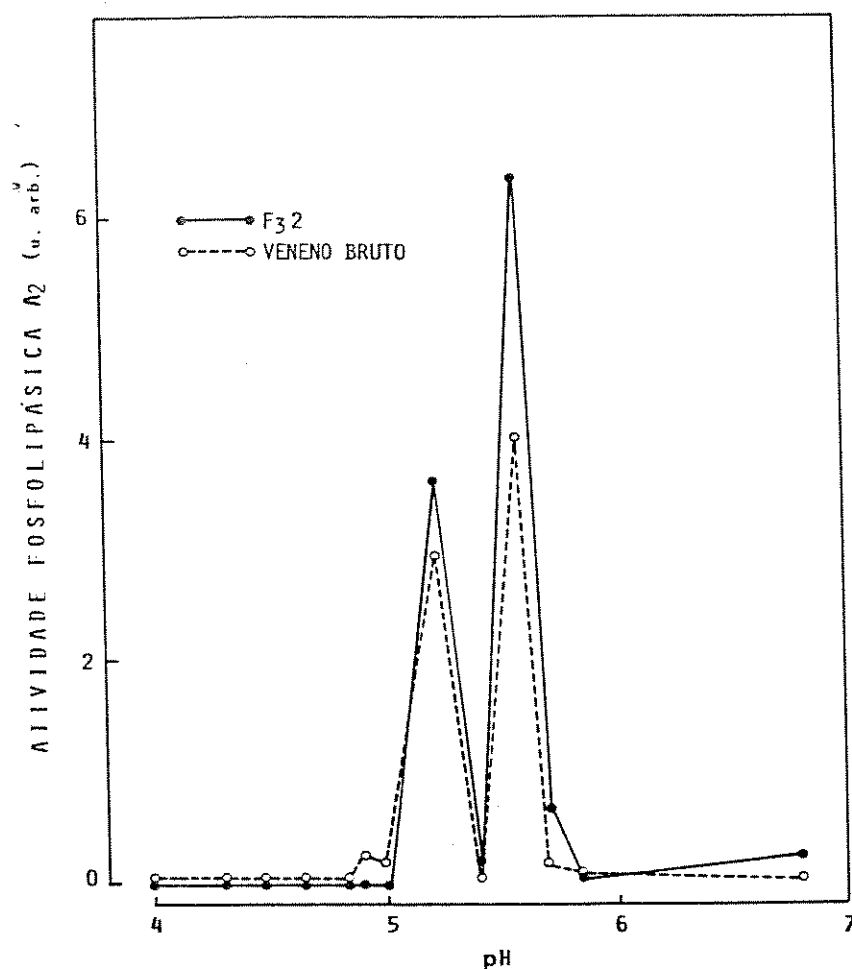


FIGURA 15. Análise do gel seccionado após a isoeletrofocalização em relação ao pH e atividade fosfolipásica.

#### 4.6. ATIVIDADE ESPECÍFICA DA FOSFOLIPASE ISOLADA DO VENENO DE *B. lanceolatus* EM DIFERENTES ETAPAS DA PURIFICAÇÃO

O rendimento das três primeiras etapas da purificação está presente na tabela IV, onde se encontra ainda a atividade fosfolipásica em cada etapa de purificação.

## TABELA IV

ATIVIDADE ESPECÍFICA EM DIFERENTES ETAPAS DA PURIFICAÇÃO DA FOSFOLIPASE ISOLADA DO VENENO DE *B. lanceolatus*

FRAÇÕES	PROTEÍNA		ATIVIDADE PLA <sub>2</sub>		ATIVIDADE ESPECÍFICA	FATOR DE PURIFICAÇÃO
	mg	%	TOTAL	%		
Veneno total	4.780	100	86	100	18,1	1
F <sub>3</sub>	510	11	79	92	155	8,6
F <sub>3</sub> <sup>1</sup>	130	2,7	33	38	250	13,8
F <sub>3</sub> <sup>2</sup>	95	2,0	27	32	285	15,7

A atividade fosfolipásica foi medida no pH stat utilizando-se como substrato a lecitina solubilizada pelo colato de sódio estando expressa em umoles min/mg. A concentração proteica foi estimada através do coeficiente de extinção a 280 nm das várias amostras. A atividade total está expressa em mmoles de ácido graxo liberado por minuto.

*Melhor atividade  
em 15 minutos  
9g de  
aproximadamente  
em 15 minutos*

#### 4.7. CROMATOGRAFIA DE TROCA IÔNICA EM COLUNA DE MONO Q POR FPLC

Como demonstrado anteriormente, a fração F<sub>3</sub><sup>2</sup> é uma mistura de pelo menos dois componentes principais. Para

separá-los, esta fração ( $F_32$ ) foi submetida à cromatografia líquida de resolução rápida (FPLC) em coluna de mono Q (HR 5/5) o que resultou no desdobramento de tres picos maiores **c**, **d** e **e** e dois menores **a** e **b** (figura 16). Todos os cinco picos apresentaram atividade fosfolipásica.

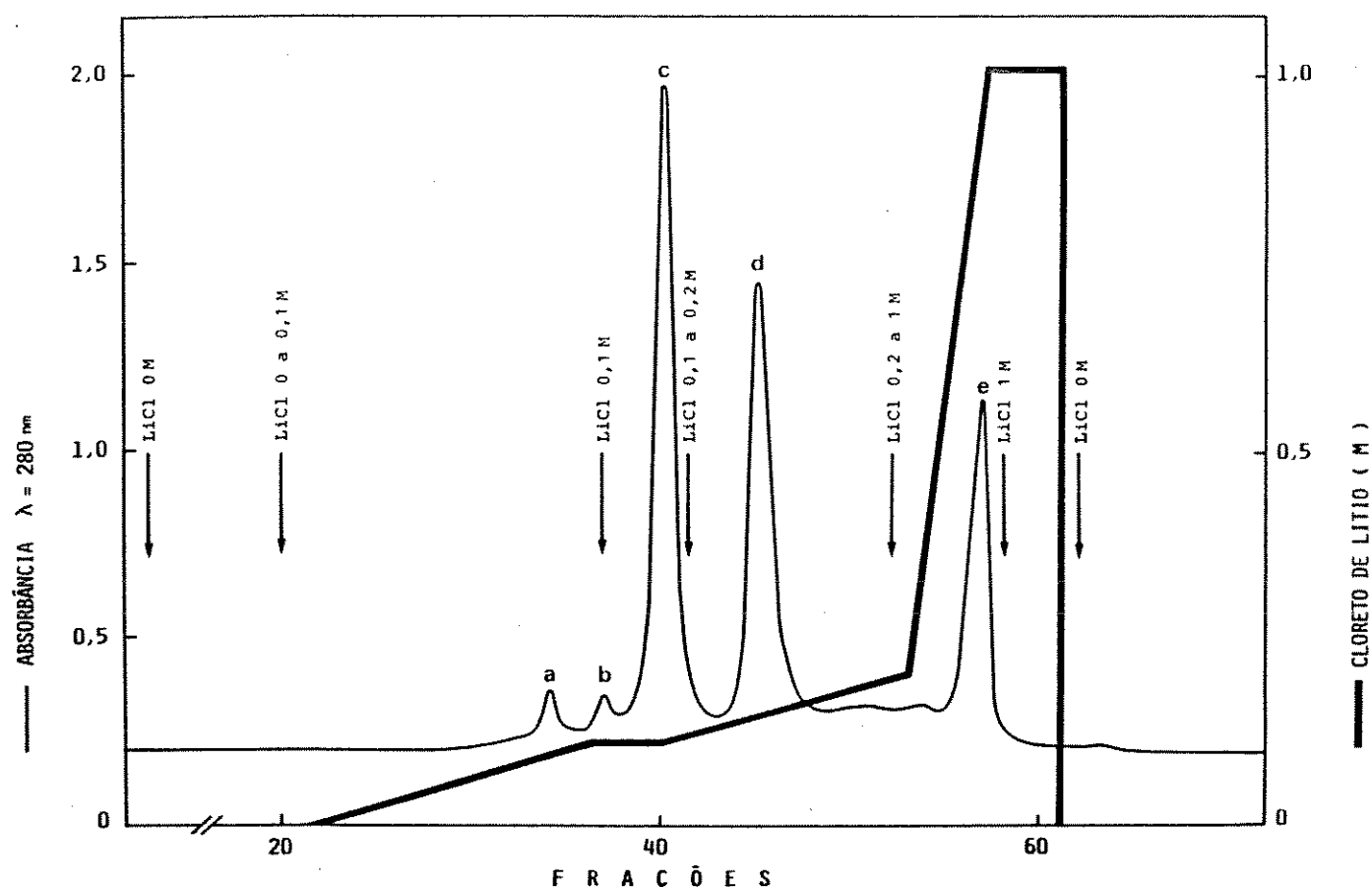


FIGURA 16. Cromatografia de troca iônica em coluna de Mono-Q por FPLC da fração  $F_32$  em Tris-HCl 20 mM pH 6.75. A eluição foi realizada num fluxo de 1ml/min. com um gradiente linear des<sub>contínuo</sub> de concentração de cloreto de Lítio.



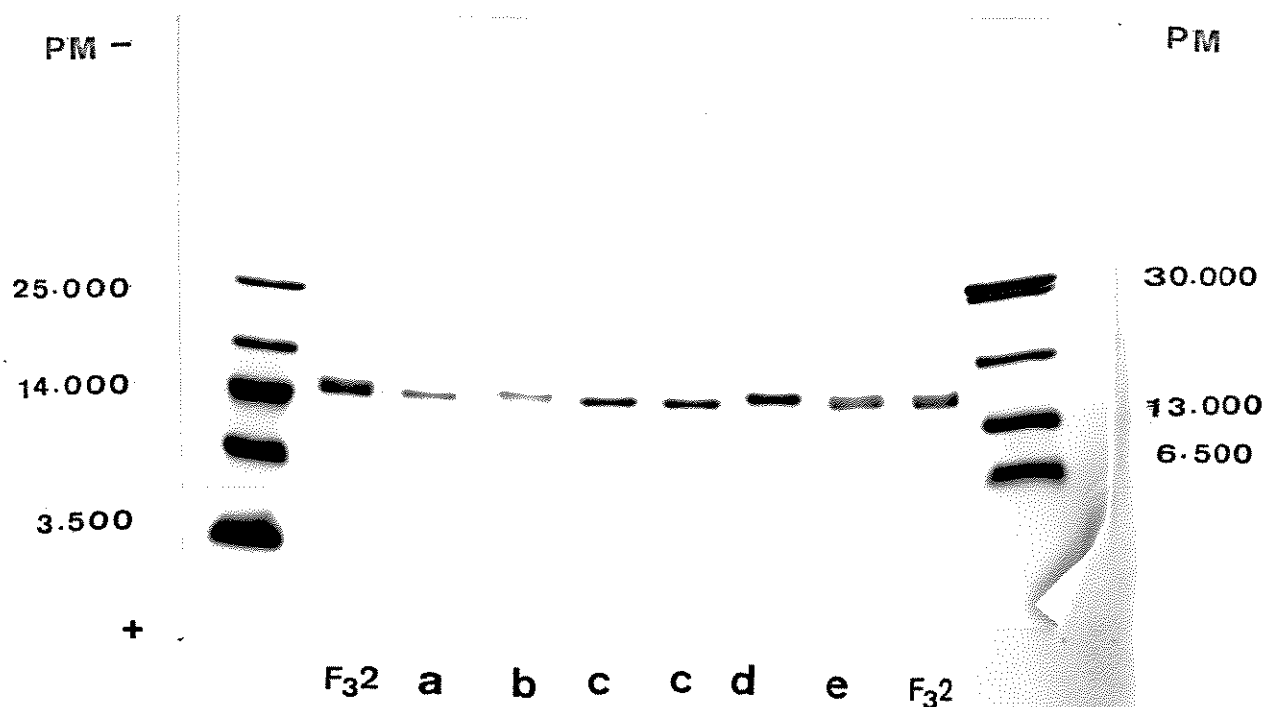


FIGURA 17. Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS da fração F<sub>3</sub>2 e das frações eluídas na coluna de mono Q, por FPLC, tratadas como  $\beta$ -mercaptoetanol.

A eletroforese em gel de poliacrilamida (figura 17) em presença de SDS mostrou para as frações F<sub>3</sub>2 e e a banda espessa característica na região de 15 kDa. As frações a e c mostram o mesmo PM em torno de 14,5 kDa, enquanto b e d exibem PM próximo a 15 kDa.

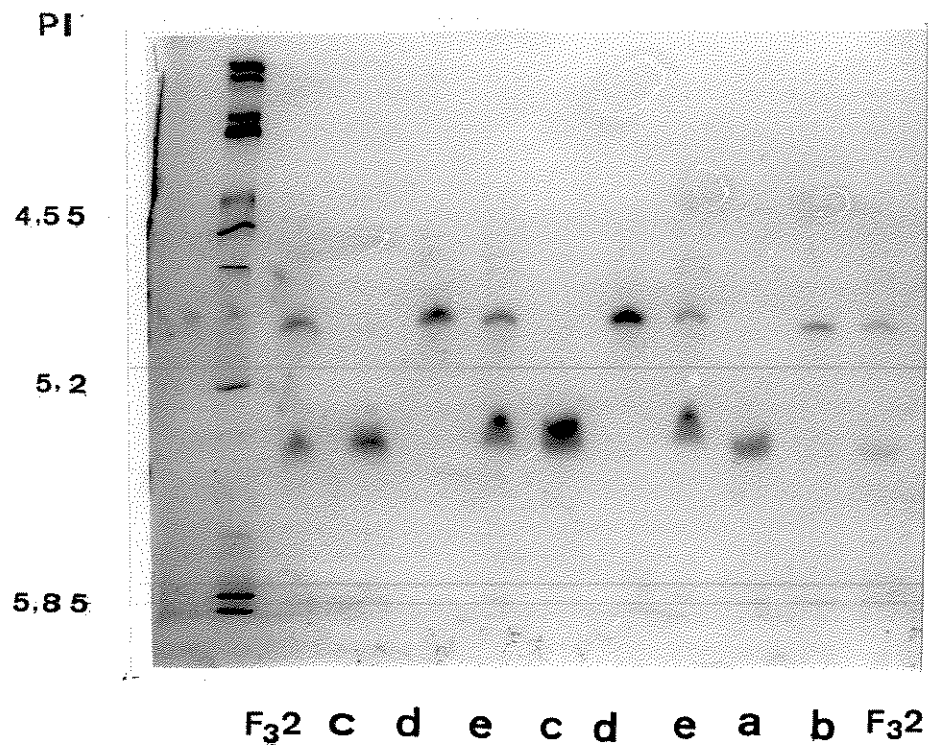


FIGURA 18. Isoeletrofocalização em gel de poliacrilamida com ampoli ne pH entre 4-6 da fração F<sub>3</sub>2 e das frações eluídas na coluna de Mono-Q por FPLC, a; b; c; d e e.

Os resultados obtidos através da técnica de iso eletrofocalização mostram de forma ainda mais evidente a semelhança entre os componentes a e c, ambos com pon tos isoelétricos de 5,6 enquanto b e d apresentaram pon to isoelétrico de 5,1. A fração e comporta-se também aqui como F<sub>3</sub>2, ou seja, uma mistura de dois componentes.

Nova avaliação imunológica foi realizada através de uma imunoeletroforese entre o veneno total, a fração  $F_32$  obtida do terceiro estágio de purificação e as principais frações obtidas após fracionamento por FPLC em coluna de Mono-Q. As frações **a** e **b** que se mostraram semelhantes a **c** e **d** não foram aqui ensaiadas devido à exigüidade da massa.

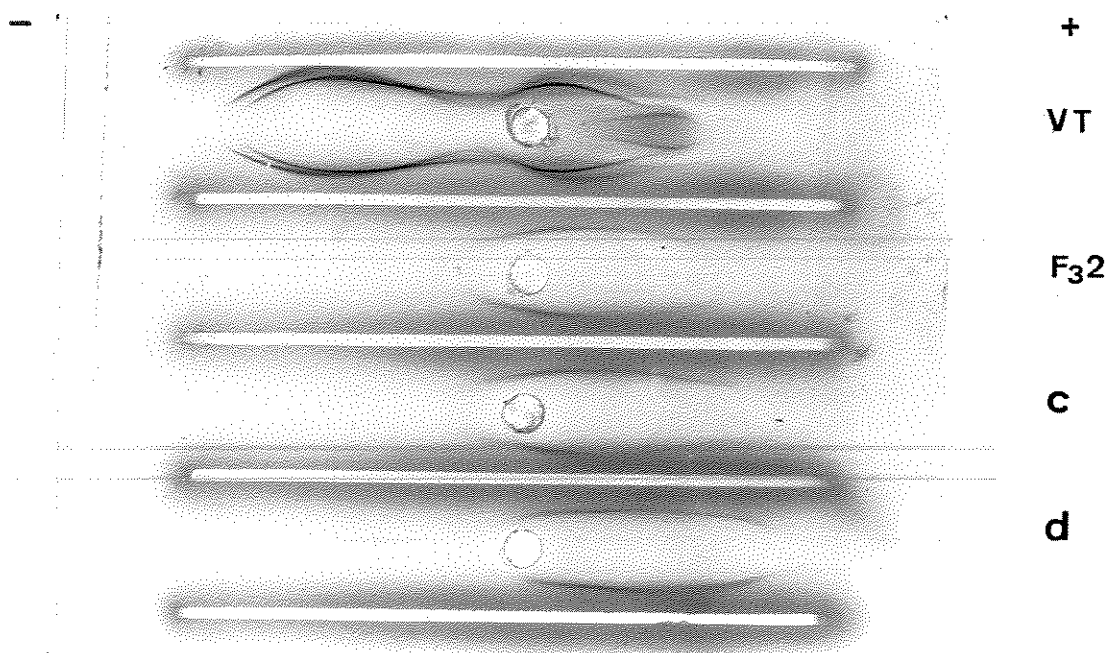


FIGURA 19. Análise imunoeletroforética do veneno total de *B. lanceolatus* (2mg/ml) da fração  $F_32$  (1.25mg/ml) e das frações **c** e **d** (0.5mg/ml).

Como demonstrado na figura 19 a comparação entre a fração  $F_32$  e as frações resultantes da cromatografia por FPLC (quarta etapa da purificação) apresenta uma diferença na mobilidade eletroforética, concordante com os dados da

isoletrofocalização que identificam dois pontos isoeletrícos distintos para **c** e **d**.

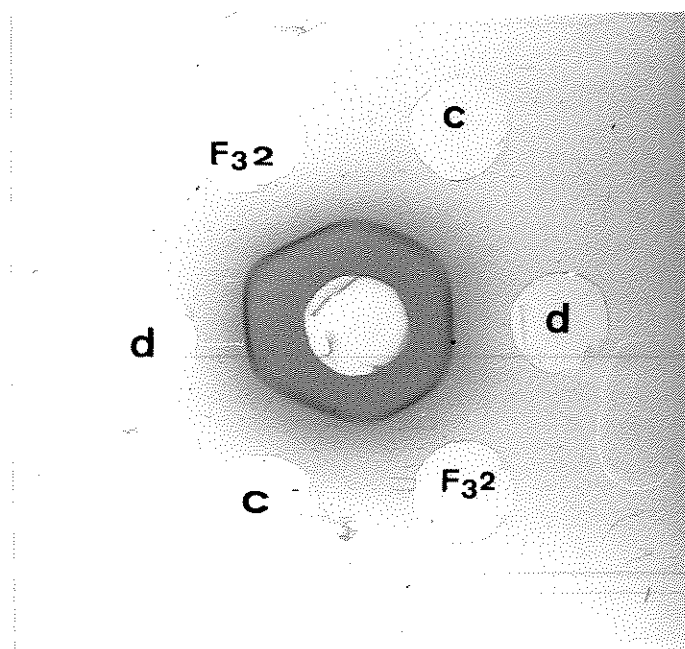


FIGURA 20. Análise comparativa por imunodifusão entre a fração  $F_{32}$  e as frações **c** e **d**. Concentração de antígenos  $500\mu\text{g/ml}$ .

A imunodifusão comparativa entre a fração  $F_{32}$  e as frações obtidas por FPLC, mostra que há uma identidade total entre as diferentes frações, quando analisadas por esta técnica.

*Falko Page*

## 4.8. DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO DE AMINOÁCIDOS

Tendo sido verificado que as frações **c** e **d** apresentavam pesos moleculares, pontos isoelétricos e comportamento imunológico diferentes, procurou-se determinar sua composição em aminoácidos.

**TABELA V**  
DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO DE AMINOÁCIDOS

AMINOÁCIDOS	C	D
Cys	11.6 (12)	12.1 (12)
Asx	19.3 (19)	19.9 (20)
Met	2.0 (2)	2.6 (3)
Thr	5.0 (5)	5.5 (5)
Ser	5.2 (5)	5.8 (6)
Glx	11.2 (11)	11.1 (11)
Pro	3.9 (4)	3.6 (4)
Gly	12.6 (13)	12.7 (13)
Ala	4.7 (5)	4.8 (5)
Val	9.8 (10)	9.6 (10)
Ile	4.4 (4)	4.3 (4)
Leu	3.3 (3)	3.2 (3)
Tyr	7.4 (7)	7.3 (7)
Phe	6.8 (7)	6.6 (7)
His	2.5 (2)	2.7 (3)
Lys	13.3 (13)	11.9 (12)
Arg	5.3 (5)	5.5 (5)
Trp	2.5 (2)	2.4 (2)
<b>TOTAL</b>	<b>129</b>	<b>132</b>

*Tabela  
fundamental*

Na tabela V está expressa a composição em aminoácidos dos dois componentes com atividade fosfolipásica isolados do veneno de *B. lanceolatus*. A composição está expressa como moles de resíduo de aminoácidos por mol de fosfolipase para a qual se assumiu o peso molecular de 15 kDa. Como se pode ver a composição é bastante semelhante entre si, havendo apenas, pequenas diferenças no teor de certos aminoácidos.

#### 4.9. ENSAIOS ENZIMÁTICOS E BIOLÓGICOS

O isolamento e purificação da F<sub>32</sub>, fração fosfolipásica do veneno de *B. lanceolatus* foram acompanhados ainda de ensaios biológicos e enzimáticos que visaram a determinação dos efeitos presentes no veneno total que poderiam ser atribuídos a essa fração.

## TABELA VI

TOXICIDADE E ATIVIDADES HEMOLÍTICA, HEMORRÁGICA, PROTEOLÍTICA, COAGULANTE, ANTI-COAGULANTE E AGREGANTE DE *B. lanceolatus*

ATIVIDADE	VENENO TOTAL
A. Atividade biológica	
1. Toxicidade <sup>toxicidade</sup> -----	9,6 (8,1 a 11,4) mg/kg-camundongo
	6,2 (5,4 a 7,2) mg/kg-pintainho
2. Hemolítica	2,0 U/μg
3. Hemorrágica	1,6 μg
4. Coagulante -----	ausente com plasma
	presente com fibrinogênio
5. Anti-coagulante	prolongamento do TTPA
6. Agregante	ausente com plasma
B. Atividade enzimática	
1. Caseinolítica	2,7 U/μg
2. TAME-esterásica	1,5 U/mg

**TOXICIDADE** - Como se pode ver na tabela VI, o veneno apresentou toxicidade discreta, sendo menos potente do que os venenos botrópicos brasileiros. A fração  $F_3^2$  que encerra a atividade fosfolipásica, foi menos tóxica ainda. De fato, quando inoculada em camundongos e em pintainhos em doses de 0,5 mg/kg e 5 mg/kg respectivamente

não foi capaz de levar os animais à morte. Os pintainhos espécie mais sensível ao veneno, quando inoculados com a fração, apresentaram sinais de intoxicação dos quais se recuperaram depois de uma hora. Os sinais mais evidentes, foram: início de curarização aos 10 minutos (head-drop) seguidos de tremores e movimentos convulsivos que atingiram o seu máximo aos 30 minutos. O fechamento dos orbiculares, a queda do corpo com incapacidade de manutenção da postura, e a depressão respiratória foram observados em todos os animais inoculados com a maior dose. Em camundongos, nas doses utilizadas, não se observaram sinais de intoxicação.

**ATIVIDADE HEMOLÍTICA** - O veneno total de *B. lanceolatus* e a fração F<sub>32</sub> apresentaram atividade hemolítica indireta de 2,0 U/ $\mu$ g para o veneno (tabela VI) e 3,3 U/ $\mu$ g para a fração, estando esta atividade diretamente relacionada a atividade fosfolipásica que serviu de parâmetro para a purificação.

A atividade hemolítica direta, sem adição de uma fonte de fosfolípídeo foi ausente em todas as amostras analisadas.

**ATIVIDADE HEMORRÁGICA** - Apenas os animais que receberam o veneno total apresentaram halos hemorrágicos que levaram a determinação de uma dose mínima hemorrágica de 1.6  $\mu$ g (Tabela VI). Os animais tratados com a fração



comportaram-se como os animais controle.

**ATIVIDADE PROTEOLÍTICA** - As determinações sobre caseína e TAME mostraram que o veneno de *B. lanceolatus* é dos mais potentes quando comparado aos venenos das *Bothrops* brasileiras. Estas atividades jamais foram detectadas nos picos com atividade fosfolipásica mesmo nas fases precoces do fracionamento, estando portanto ausente na fração purificada.

**ATIVIDADE COAGULANTE** - Como se vê na tabela VI esta atividade do veneno total encontra-se presente apenas sobre o fibrinogênio. Na figura 21 podemos observar que a mesma é dose-dependente. Por outro lado encontra-se ausente quando ensaiada sobre plasma mesmo em presença de  $Ca^{2+}$ .

Qual a razão?  
↓  
menor especificidade ao plasma  
também é

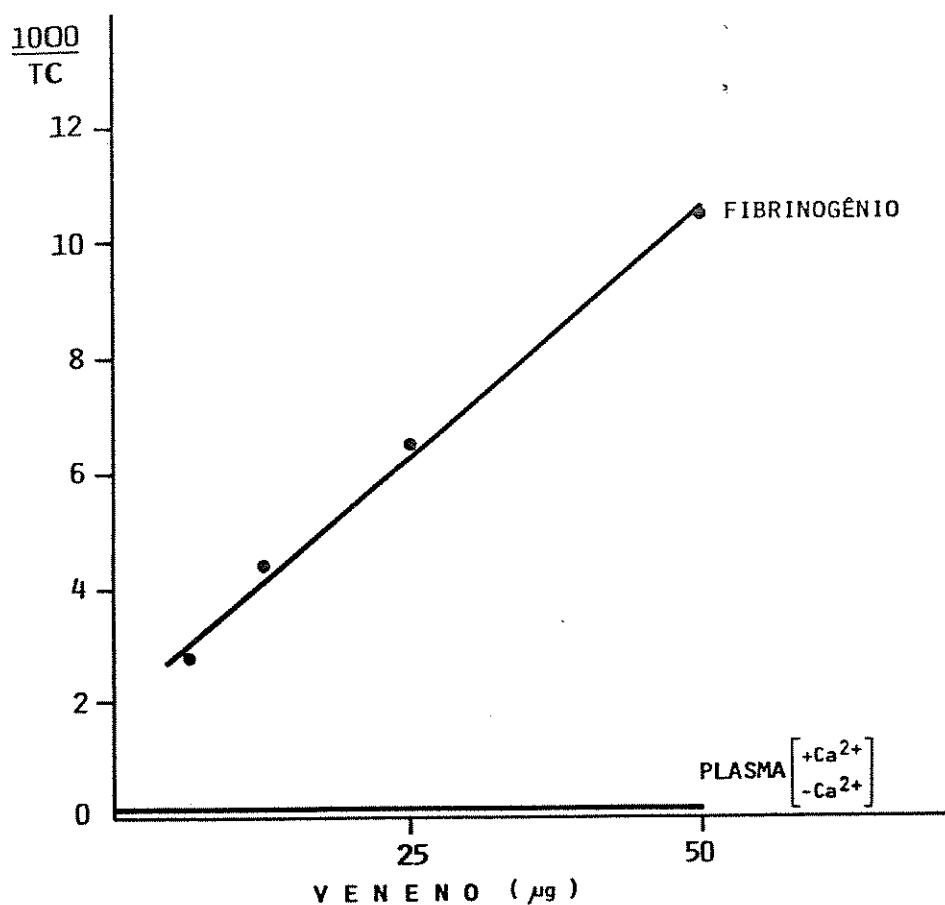


FIGURA 21. Tempo de coagulação do veneno de *B. lanceolatus* sobre o Fibrinogênio e plasma normal humano medido na ausência e presença de  $\text{CaCl}_2$ .

**ATIVIDADE ANTI-COAGULANTE** - O veneno de *B. lanceolatus* prolonga o tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPA) do plasma humano dando como resultado precipitação sem formação de coágulo aos 55 segundos (Tabela VII) enquanto a fração, na mesma concentração (50 µg) prolonga o TTPA de 39,7 segundos para 60,2 (Tabela VII).

## TABELA VII

EFEITO DO VENENO DE *B. lanceolatus* E DA FRAÇÃO F<sub>3</sub>2  
SOBRE O TTPA DE PLASMA HUMANO

	TC - (segundos)
plasma	38.0
plasma + salina	39,7 ± 0,5
plasma + veneno	NC*
plasma + F <sub>3</sub> 2	60.2 ± 0,9

n= 4

\* precipitação aos 55 segundos

**ATIVIDADE AGREGANTE** - O veneno de *B. lanceolatus* não apresentou atividade agregante quando ensaiado em plasma, (Tabela VI) encontrando-se o mesmo resultado para a fração.

**OUTRAS ATIVIDADES** - O coeficiente de extinção determinado para o veneno total foi de 1.7 e para a fração F<sub>32</sub> foi de 2.2.

A tentativa de inativação da atividade fosfolipásica para a fração F<sub>32</sub> pelo brometo de p-bromofenacila - resultou negativa.

### 3.10. CONTRATURA E BLOQUEIO DA TRANSMISSÃO NEUROMUSCULAR

O veneno de *B. lanceolatus* quando adicionado à preparação musculo biventer cervicis de pintainho evocou contratura de ascensão rápida com início em torno de dez minutos e relaxamento tardio (após 90 minutos). Verificou-se ainda um bloqueio de 90% ao fim de 120 minutos (figura 22). Quanto à fração, embora analisada na mesma dose, mostrou um bloqueio discreto da ordem de 50% somente ao fim de 120 minutos. Também a contratura foi discreta e tardia ocorrendo somente após 120 minutos, não tendo sido observado o relaxamento da preparação (figura 23).

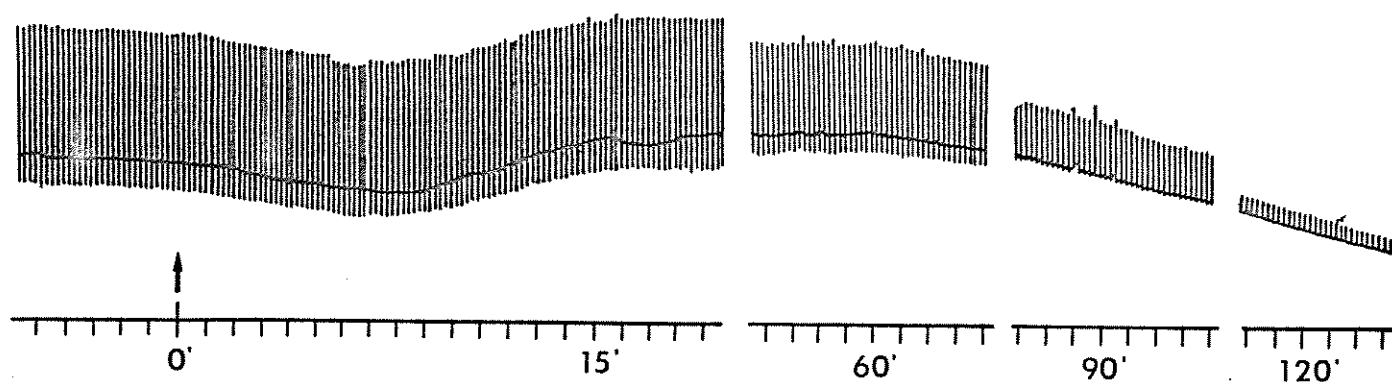


FIGURA 22. Registro da contração isotônica produzida por estímulo elétrico de campo da preparação músculo biventer cervicis de pintainho, antes e após a adição do veneno. No tempo indicado pela seta, o veneno total foi adicionado numa concentração final de  $50 \mu\text{g/ml}$ .

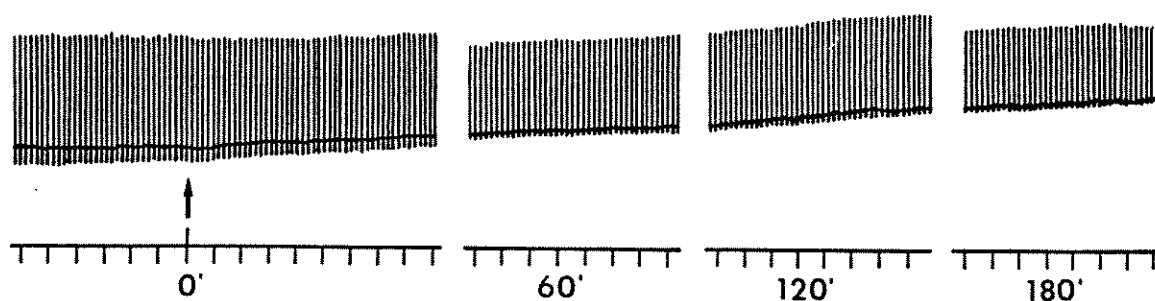


FIGURA 23. Registro da contração isotônica produzida por estímulo elétrico de campo da preparação músculo biventer cervicis de pintainho, antes e após a adição da fração F32. No tempo indicado pela seta, a fração F32 com atividade fosfolipásica foi adicionada numa concentração final de  $50 \mu\text{g/ml}$ .

**V - D I S C U S S Ã O**

O fato de que vários investigadores como BRAGANCA e col., (1970); VIDAL e STOPPANI, (1971) tenham relatado a presença de inibidores de fosfolipase nos venenos de *Naja naja*, *B. newiiedi* e *B. alternatus* como responsável pela baixa atividade fosfolipásica dos mesmos foi por nós lembrado quando quantificamos esta atividade no veneno de *B. lanceolatus*. Também a diferença observada no comportamento frente a diferentes substratos poderia ser explicada e estaria ligada a prévia dissociação de um complexo inibidor-fosfolipase, sendo lenta com poucos minutos de duração na ausência de detergente e muito rápida dando-se dentro poucos segundos na presença de Triton X-100 ou cloreto de sódio.

Mais ainda, estudando a cinética de reação do veneno verificamos um aumento na velocidade inicial de hidrólise que se estabilizava após alguns minutos, o que poderia reforçar a hipótese de presença de um inibidor (que só atuaria após o tempo necessário para sua dissociação) ou

então, que a atividade catalítica do *B. lanceolatus* seria maior para substratos de fosfolipídeos agregados do que para estruturas monoméricas correspondentes (PIETERSON e col., 1974) e que portanto sua atividade dependeria largamente da adição de detergentes (DENNIS, 1983). A idéia de que ácidos graxos ou liso derivativos ou uma mistura de ambos poderiam se comportar também como "detergentes" evocando uma modificação no estado físico da lecitina foi avaliada em substrato pré-tratado com fosfolipase de veneno de abelha. Entretanto os resultados observados que fixam o valor aproximado de 5% de hidrólise para que seja atingido o valor máximo de reação, tanto em substrato pré como não tratado, são semelhantes aos obtidos por APTIZ-CASTRO e col., (1982) em fosfolipase A<sub>2</sub> de pâncreas de porco e não apoiam nenhuma das hipóteses já aventadas.

O isolamento e purificação da fosfolipase presente, impôs-se portanto, como etapa seguinte e imprescindível.

Como o veneno de *B. lanceolatus* é rico em enzimas proteolíticas, procurou-se evitar perdas da atividade fosfolipásica, mantendo-se o processo de purificação em pH baixo já que nestas condições WELCHES e col., (1985) verificaram que vários venenos mantiveram-se estáveis em relação a esta atividade. O resultado obtido em que as frações com atividade fosfolipásica sempre se agruparam em um único pico ao longo do fracionamento, mostra o



acerto desta escolha. As etapas subsequentes culminaram com o isolamento da fração  $F_{32}$ , que encerra a atividade fosfolipásica do veneno total. De fato, a recuperação de 30%, mostra que essa fração que representa 6% das proteínas do veneno, sofreu um processo de purificação de 15 vezes, em proporções semelhantes aquelas já observadas para outros componentes isolados de venenos ofídicos (IWANAGA e SUZUKI, 1979).

Contudo, apesar de isolada e purificada, a fosfolipase obtida comportou-se com as mesmas características do veneno, ou seja, sua atividade foi variável com diferentes substratos, a velocidade de reação sofreu o mesmo tipo de platonamento e a ativação ocorreu também a nível de 5% de hidrólise. Desta forma, ativação da fosfolipase  $A_2$  de *B. lanceolatus* parece ser uma propriedade catalítica da enzima e não da presença de uma proteína inibidora que se dissociaria durante o ensaio.

Cientes de termos em mãos uma nova fosfolipase, passamos então a estudá-la em maiores detalhes procurando relacionar as duas bandas iguais em atividade fosfolipásica (com pontos isoelétricos diferentes) obtidas por isoeletrofocalização com a existência de duas ou mais fosfolipasas como referido nos venenos de *Bothrops neuwiedii*, por VIDAL e STOPPANI, (1971) e em *Bothrops jararacussu* por HOMSI-BRANDÉBURGO e col., (1988).

Por outro lado, a detecção de uma banda espessa na eletroforese em gel de poliacrilamida e a presença de duas linhas na imunoeletroforese da fração  $F_3^2$  sugeriam além da idéia de um contaminante, ou de duas fosfolipases a existência de forma agregada na molécula. Esta última possibilidade era reforçada pelos achados de IWANAGA e SUZUKI, (1979), a propósito da capacidade de formar agregados que é comum nas fosfolipases  $A_2$ .

Embora agregados solúveis possam ser mantidos por ligações covalentes não redutíveis que persistem através da eletroforese (DUBOURDIEU e col., 1987) os tratamentos com SDS e  $\beta$ -mercaptoetanol são muito eficientes na dissociação de agregados unidos com interações hidrofóbicas, eletrostáticas ou ponte dissulfeto (WEBER e OSBORNE, 1969). Em nosso caso a fração  $F_3^2$  foi submetida à cromatografia de troca iônica por FPLC o que nos levou à obtenção de cinco picos que se mostraram idênticos quanto à atividade fosfolipásica, muito próximos quanto ao peso molecular (14.500 e 15.000) e diferentes somente quanto aos pontos isoelétricos (5,1 e 5,6) o que nos levou ao agrupamento dois a dois destas frações ( $a \approx c$ ;  $b \approx d$ ;  $F_3^2 \approx e$ ).

A fração  $F_3^2$  ficou assim caracterizada como uma fosfolipase com várias isoenzimas (**a**, **b**, **c** e **d**) que somente se separam por diferirem ligeiramente em sua carga elétrica. A presença de isoenzimas ocorrendo num mesmo veneno é frequentemente descrita na literatura (SALACH, 1971;

SHILOAH, 1973; BREITHAUPT, 1975; ALAGON, 1980; DURKIN, 1981; FAURE e BON, 1987). A fração  $e$  deve ser a mistura dessas isoformas que se absorveram de forma não iônica à coluna, sendo eluídas somente quando a concentração de LiCl foi aumentada abruptamente.

Além disso, a fosfolipase de *B. lanceolatus* foi eluída do Sephadex G.50 como proteína globular de PM 15 a 20 kDa. Como duas de suas isoformas,  $c$  e  $d$  são polipeptídeos de 14,5 e 15 kDa respectivamente, pode-se concluir que essa fosfolipase é uma enzima monomérica. Entretanto, deve-se notar que agregados díméricos (ou maiores) podem também estar presente no veneno, pois a gel filtração em Sephadex mostra que alguma atividade fosfolipásica foi eluída como um ombro antes do pico proteico principal (figura 8).

A total identidade antigênica entre  $F_32$ ,  $c$  e  $d$  detectada pela técnica de imunodifusão, sugere que a fosfolipase presente no veneno de *B. lanceolatus* é uma fosfolipase ácida cujas isoformas apresentam determinantes antigênicos bastante semelhantes. Fato análogo foi assinalado para fatores hemorrágicos, isolados do veneno de *B. jararaca*, os quais apresentaram total identidade imunológica, a despeito de suas evidentes diferenças químicas e biológicas, conforme descrito por ASSAKURA e col., (1986).

Em estudos feitos por RADVANYI (1989) para determinar o ponto de ação desta fosfolipase, foram

submetidos à cromatografia de camada delgada os produtos de hidrólise obtidos sobre o substrato purificado fosfatidilcolina contendo um ácido graxo fluorescente na posição dois (1-palmitoil-2-6-pirenil hexanoil sn-glicero 3 fosforilcolina). Após hidrólise, somente uma mancha fluorescente foi observada caracterizando esta fosfolipase como sendo do tipo  $A_2$ , pois hidrolisa a ligação éster na posição sn-2 do fosfolípido utilizado como substrato.

Como no caso de outras fosfolipases  $A_2$  de pâncreas e de venenos ofídicos a atividade enzimática da fosfolipase  $A_2$  de *B. lanceolatus* é  $Ca^{++}$  dependente e outros íons divalentes como  $Sr^{2+}$ ,  $Mg^{+}$  e  $Ba^{2+}$ , mostraram-se inibidores competitivos do  $Ca^{2+}$ . O fato de sua atividade não ser inativada pelo brometo de para-bromofenacil que alquila o resíduo de histidina, sítio ativo de várias fosfolipases  $A_2$  (SLOTBOOM, 1982), requer outros estudos para sua melhor compreensão.

As características químicas apresentadas pela fosfolipase presente no veneno de *B. lanceolatus* mostram grande similaridade com a de outras fosfolipases de venenos de serpentes tais como peso molecular na faixa de 11.000 a 18.000 para a forma monomérica, elevado conteúdo de resíduos de ácido aspártico, meia cistina, glicina e tirosina, um menor número de histidinas (1-3) e argininas (3-6). O número de resíduos de meia cistina (12-14) apresentado pelas isoformas e nenhum grupo SH livre, sugere o

mesmo número de pontes dissulfeto entre ambas (IWANAGA e SUZUKI, 1979).

A diferença nos pontos isoeletricos das isoformas **c** e **d** pode ser devida à diferença no número de resíduos de lisina e/ou de ácido aspártico ~~ou glutâmico~~. Já os coeficientes de absorção que foram determinados mostram o mesmo valor de  $34,5 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$  sendo mais uma semelhança observada.

Em relação à toxicidade o próprio veneno não é muito tóxico já que sua  $DL_{50}$  determinada em camundongos é de 10mg/kg e em pintainhos de 6,0 mg/kg.

De forma geral, entre as fosfolipases isoladas do veneno de serpentes as ácidas e neutras são menos tóxicas do que as básicas (TU, 1977; ROSENBERG, 1979; KARLSSON, 1979), embora NISENBON e col., (1986b) tenham descrito o isolamento de uma fosfolipase  $A_2$  ácida do veneno de *B. alternatus* mais potente do que o veneno bruto. Este não é o caso da fosfolipase isolada do veneno de *B. lanceolatus* a qual mesmo sendo capaz de evocar sinais de envenenamento, é muito menos tóxica quando comparada com o veneno total, evidenciando não desempenhar sozinha, um papel importante para a letalidade do mesmo. Este não é um fato isolado na fisiopatologia do envenenamento botrópico onde predomina a ação sinérgica de todos os componentes. Como por exemplo pode ser citar o fato de que o quadro hemorrágico produzido pela ação das hemorraginas sobre a membrana basal

mg/ml = 3  
2,2 /  
33 x 10<sup>3</sup>

vascular pode ser agravado pela incoagulabilidade sanguínea causada pela ação de outros componentes do veneno sobre os fatores da coagulação.

O veneno de *B. lanceolatus* apresenta atividade - tipo trombina uma vez que consegue promover a coagulação direta do fibrinogênio a exemplo dos demais venenos botrôpicos (EAGLE, 1937; ROSENFELD e col., 1959; NAHAS e col ., 1979). Sabe-se ainda que os venenos botrôpicos também apresentam como característica, a elevada atividade coagulante sobre o plasma devido ou à ação direta sobre o fibrinogênio ou por ação de ativação dos fatores II e X (NAHAS e col ., 1964 e 1979). Entretanto, o veneno de *B. lanceolatus* não coagula o plasma. Os resultados obtidos sugerem que esta falta de atividade esteja relacionada aos inibidores de proteases inespecíficos presentes no meio plasmático tais como  $\alpha$  2 macroglobulina,  $\alpha$  1 antitripsina, antitrombina III. Evidentemente, esse fato não ocorre quando se utiliza como substrato o fibrinogênio. Por outro lado, o prolongamento do tempo de tromboplastina parcial ativada do plasma humano pelo veneno, sugere a presença de um inibidor de cogulação a exemplo do que foi observado por KAMIGUTI e col., (1985) no veneno de *B. castelnaudi*.

A fosfolipase isolada e purificada mostrou - se mais eficiente do que o próprio veneno em promover este efeito, caracterizando-se como uma fosfolipase A<sub>2</sub> anticoagulante. Embora fosfolipases com atividade anticoagulante já

tenham sido descritas para venenos de *Naja nigricollis* (CONDREA, 1981) *Naja naja*, *Naja naja atra* e *Hemachatus - haemachatus* (ROSENBERG, 1986) esta é a primeira a ser detectada em venenos botrópicos.

O efeito hemolítico indireto presente tanto no veneno total como na fração  $F_32$  concorda com o fato de que os venenos de serpentes viperídicas apresentam atividade hemolítica indireta, devido a presença de fosfolipases nestes venenos (DELEZENNE e FOURNEAU, 1914).

A análise feita com o veneno total de *B. lanceolatus* e a fração fosfolipásica na junção neuromuscular de pintainhos baseou-se nos sinais apresentados pelos animais durante o teste de avaliação da toxicidade. De fato o "head-drop" precoce como a morte por insuficiência respiratória apontavam para um efeito bloqueador da junção neuromuscular que foi realmente detectado para o veneno total. Entretanto, a fosfolipase  $A_2$  purificada foi menos efetiva. Tudo indica que o efeito observado com o veneno é provavelmente de cooperatividade, onde atuam outros componentes além da fosfolipase. Vale salientar ainda que a ação na junção neuromuscular pode estar dissociada da atividade fosfolipásica (RODRIGUES-SIMIONI, 1983).

Nossos resultados falam a favor de ter sido isolado mais um constituinte de veneno em elevado grau de pureza o que acreditamos possa a vir contribuir para a

compreensão dos complexos mecanismos que envolvem as proteínas presentes nos venenos não são em relação as diversas atividades biológicas por elas desempenhadas, como também na detecção de vínculos que possam esclarecer as ligações filogenéticas entre as várias espécies que constituem o gênero *Bothrops*.



**VI - RESUMO E CONCLUSÕES**

No presente trabalho procuramos inicialmente obter informações gerais sobre o veneno total de *Bothrops lanceolatus*, comparando suas atividades enzimáticas com aquelas das *Bothrops* brasileiras, encontrando valores médios entre *B. jararaca* e *B. jararacussu* para atividade de lítica sobre caseína e TAME, como também em relação a atividade hemorrágica. Apesar de não exibir efeito coagulante sobre o plasma, o veneno total coagula o fibrinogênio, apresenta atividade hemolítica indireta e prolonga o tempo de tromboplastina parcial ativada. Como esses dois últimos efeitos foram mais evidentes com a fração F<sub>3</sub>2 podemos caracterizá-la como uma fosfolipase A<sub>2</sub> ácida e anticoagulante.

O isolamento desta fosfolipase A<sub>2</sub> foi realizado através de cromatografias de exclusão e de troca iônica, sendo acompanhado sistematicamente em cada etapa de teste de atividade não só para localizar a fração fosfolipásica - como também para determinar seu rendimento o qual foi da ordem de 32%. Quatro etapas foram necessárias para tal

isolamento e pelo menos quatro isoformas com atividade fosfolipásica foram encontradas nas condições utilizadas. As duas isoformas estudadas apresentaram como características principais a presença de uma única cadeia polipeptídica com peso molecular de aproximadamente 15 kDa e igual coeficiente de extinção para ambas, diferindo somente em relação ao ponto isoelétrico que foi de 5,1 para uma e 5,6 para outra. Apresentaram atividade enzimática idêntica a qual é  $\text{Ca}^{2+}$  dependente exibindo um período de latência que se observa usualmente com o substrato gema de ovo, sendo esta uma propriedade intrínseca desta fosfolipase. O estado de pureza da fosfolipase isolada demonstrado por uma única banda através de eletroforese em gel de poliacrilamida foi confirmado também através de testes imunológicos em diferentes níveis de sensibilidade. A identidade antigênica foi observada tanto pela técnica de imunodifusão como em imunoeletroforese simples e cruzada. Essa abordagem inicial nos servirá de base para estudos futuros que possam contribuir na elucidação da especificidade imunológica dos antígenos proteicos através de reações cruzadas com outras fosfolipases imunologicamente relacionadas.

**VII - SUMMARY**

In the present work we initially obtained some information on the crude venom of *Bothrops lanceolatus*, comparing its enzymatic activities with those of Brazilian *Bothrops* species. Caseinolytic, TAME esterase and hemorrhagic activities were intermediate to those of *B. jararaca* and *B. jararacussu*. Despite having no coagulant effect on plasma, crude venom clotted fibrinogen, possessed indirect hemolytic activity and prolonged the partial thromboplastin time. Since these last two activities were most marked with fraction F<sub>32</sub>, this fraction may be characterized as an anticoagulant acidic phospholipase A<sub>2</sub>.

Isolation of this phospholipase A<sub>2</sub> was achieved using gel filtration and ion exchange chromatography. Enzyme activity was determined at each stage in order to locate the phospholipase fractions during chromatography and also to determine the enzyme yield at the end of purification. The latter was approximately 32%. Four stages were required for this isolation and at least four isoforms with

phospholipase activity were identified under the conditions used. The two isoforms studied in detail each consisted of a single polypeptide chain with an approximate molecular weight of 15 KDa and identical extinction coefficients. However, they differed in their isoelectric points (5.1 and 5.6). Both isoforms possessed identical enzyme activity which was  $\text{Ca}^{2+}$  dependent and exhibited a lag or latency period which was usually observed when egg yolk was used as the substrate. This lag period was an intrinsic property of the phospholipase.

The purity of the phospholipase as shown by the single band obtained following polyacrylamide gel electrophoresis was confirmed using various immunochemical tests of varying sensitivities. Immunological identity was observed using immunodiffusion and simple or crossed immunoelectrophoresis. These initial results provide a base for future studies of the cross-reactions with other immunologically related phospholipases.

VII - REFERÊNCIAS  
BIBLIOGRÁFICAS

- ABE, T.; ALEMA, S. and MILEDI, R. (1977). Isolation and characterization of presynaptically acting neurotoxins from the venom of Bungarus snakes. Eur. J. Biochem. 80: 1.
- ABE, T.; ALEMA, S. and MILEDI, R. (1977). Phospholipase activity in  $\beta$ -bungarotoxin action. J. Physiol. (London) 270: 55.
- ADAMICH, M.; ROBERTS, M.F. and DENNIS, E.A. (1979). Phospholipid activation of Cobra venom phospholipase A<sub>2</sub>. 2. Characterization of the phospholipid-enzyme interaction. Biochemistry 18: 3308.
- 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: 7054.



- 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: 296.
- ALDERICE, M.T. and VOLLE, R.L. (1978). Multiple actions of  $\beta$ -bungarotoxin on acetylcholine release at amphibian motor nerve terminals. Naunyn-Schmied. Arch. Pharmacol. 316: 126.
- ANDERSON, S.G. and ADA, G.L. (1960). A lipid component of Murray Valley encephalitis virus. Nature 188: 876.
- APITZ-CASTRO, R.; JAIN, M.K. and DE HAAS, G.H. (1982). Origin of the Latency Phase During the action of phospholipase A<sub>2</sub> on unmodified phosphatidylcholine vesicles. Biochimica et Biophysica Acta 688: 349.
- ARSENIEV, A.S.; WIDER, G.; JOUBERT, F.J. and WUTHRICH, K. (1982). Assignment of the <sup>1</sup>H nuclear magnetic resonance spectrum of the trypsin inhibitor E from Dendroaspis polylepis polylepis. Two dimensional nuclear magnetic resonance at 500 MHz. J. Mol. Biol. 159: 323.

- ASSAKURA, M.T.; REICHL, A.P. and MANDELBAUM, F.R. (1986). Comparison of immunological, biochemical and biophysical properties of three hemorrhagic factors isolated from the venom of Bothrops jararaca (jararaca). *Toxicon* 24: 943.
- AURELL, L.; FRIBERGER, P.; KARLSSON, G. and GLAESON, G. (1977). A new sensitive and highly specific chromogenic peptide substrate for factor Xa. *Thromb. Res.* 11: 595.
- BACHMAN, F.; DUCKERT, F. and KOLLER, F. (1959). The Stuart-Prower factor assay and clinical significance. *Thrombos. Diathes. Haemorrh. (Stuttg)* 2(1-2): 24.
- BAKHLE, Y.S. (1968). Conversion of angiotensin I to angiotensin II by cell free extracts of dog lung. *Nature* 220: 919.
- BARRABIN, H.; MARTIARENA, J.L.; VIDAL, J.C.; BARRIO, A. Isolation and characterization of gyroxin from Crotalus durissus terrificus venom. Centro Nacional de Investigaciones Iologicas (CENAI). Serrano, 661, Argentina.
- BATZRI-IZRAELI, R. and BDOLAH, A. (1982). A basic phospholipase A. The main toxic component of Pseudocerastes fieldi venom. *Toxicon* 20: 203.

- BEAVEN, G.H. and HOLIDAY, E.R. (1952). Ultraviolet Absorption Spectra of Proteins and Amino Acids. *Advances in Protein Chemistry* 7: 319.
- BIEBER, A.L. (1979). Metal and nonprotein constituents in snake venoms. In: *Snake Venoms. Handbook of Experimental Pharmacology*. Lee, C.Y. vol. 52, pp. 295. Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York.
- BJARNASON, J.B.; TU, A.T. (1978). Hemorrhagic toxins from Western diamond back rattlesnake (Crotalus atrox) venom: Isolation and characterization of five toxins and the role of zinc in hemorrhagic toxins. *Biochemistry* 17: 3395.
- BON, C. and CHANGEUX, J.P. (1977). Chemical and pharmacological characterization of toxic polipeptides from the venom of Bungarus caeruleus. *Eur. J. Biochem.* 74: 31.
- 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.
- BON, C. (1982). Synergism of the two subunits of crotoxin. *Toxicon* 20: 105.

- BON, C. and SALIOU, B. (1983). Ceruleotoxin: Identification in the venom of Bungarus fasciatus, molecular properties and importance of phospholipase A<sub>2</sub> activity for neurotoxicity. *Toxicon* 21: 681.
- BOQUET, P.; DÉTRAIT, J.; FARZANPAY, R. (1969). Recherches Biochimiques et immunologiques sur le venin des serpents. III Étude des analogues de l'antigène Alpha du venin de Naja nigricollis. *Ann. Inst. Pasteur* 116: 522.
- BOQUET, P. (1979). Immunological properties of snake venoms. In: *Handbook of Experimental Pharmacology*: vol. 52, pp. 751824. (Chen-Yuan Lee, Ed.) Berlin: Springer-Verlag.
- BORN, G.V.R. and CROSS, M.J. (1963). The Aggregation of Blood Platelets. *J. Physiol.* 168: 178.
- BRAGANCA, B.M.; SAMBRAY, Y.M. and SAMBRAY, R.Y. (1970). Isolation of Polypeptide inhibitor of Phospholipase A from Cobra Venom. *Eur. J. Biochem.* 13: 410.
- BREITHAUPT, H.; OMORI-SATOH, T.; LANG, J. (1975). Isolation and characterization of three phospholipases A from the crotoxin complex. *Biochim. Biophys. Acta (Amst)*, 403: 355.

- BRUNIE, S.; BOLIN, J.; GEWIRTH, D. and SIGLER, P.B. (1985).  
The refined crystal structure of dimeric phospholipase  
 $A_2$  at 2,5Å. Access to a shielded catalytic center. J.  
Biol. Chem. 260: 9742.
- BULBRING, E. (1946). Observations on the isolated phrenic  
nerve diaphragm preparation of the rat. Brit. J.  
Pharmacol. 1: 38.
- CAMORATTO, A.M. and GRANDISON, L. (1985). Evidence supporting  
a correlation between arachidonic acid release and  
prolactin secretion from  $GH_3$  cells. Endocrinology 116:  
1506.
- CARATSCH, C.G.; MARANDA, B.; MILEDI, R. and STRONG, P.N.  
(1981). A further study of the phospholipase-independent  
action of  $\beta$ -bungarotoxin at frog end-plates. J.  
Physiol. (London) 319: 179.
- CARATSCH, C.G.; MILEDI, R. and STRONG, P.N. (1985). Influence  
of divalent cations on the phospholipase-independent  
action of  $\beta$ -bungarotoxin at frog neuromuscular junctions.  
J. Physiol. (London) 363: 169.
- CATE, R.L. and BIEBER, A.L. (1978). Purification and  
characterization of mojave (Crotalus scutulatus scutu-  
latus) toxin and its subunits. Arch. Biochem. Biophys.  
189: 397.

- CHANG, C.C. and LEE, C.Y. (1963). Isolation of neurotoxins from the venom of Bungarus multicinctus and their modes of neuromuscular blocking action. Arch. Int. Pharmacodyn. 144: 241.
- CHANG, C.C. and LEE, J.D. (1977). Crotoxin, the neurotoxin of South American rattle snake venom is a presynaptic toxin acting like  $\beta$ -bungarotoxin. Naunyn. Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 296: 159.
- CHANG, C.C. and SU, M.J. (1981). A study on the interaction of crotapotin with crotoxin phospholipase A<sub>2</sub>, notexin and other presynaptic neurotoxins. Br. J. Pharmac. 73: 495.
- CHANG, C.C. (1985). Neurotoxins with phospholipase A<sub>2</sub> activity in snake venoms. Proc. Natn. Sci. Coun. 9: 126.
- CHANGEUX, J.P.; KASAI, M. and LEE, C.Y. (1970). Use of a snake venom toxin to characterize the cholinergic receptor protein of Torpedo electric tissue. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 67: 1241.
- CHANGEUX, J.P.; MEUNIER, J.C.; HUCHET, M. (1971). Studies of the cholinergic receptor protein of Electrophorus Electricus. I. An Assay in vitro for the cholinergic receptor site and solubization of the receptor protein from electric tissue. J. Molec. Pharmacol. 7: 538.

CHANGEUX, J.P. (1981). The acetylcholine receptor: an allosteric membrane protein. Harvey Lect. 75: 85.

CHEN, I.L.; LEE, C.Y. (1970). Ultrastructural changes in the motor nerve terminals caused by  $\beta$ -bungarotoxin. Virchows Arch. Abt. Bzellularpath., 6: 318.

CONDREA, E.; DE VRIES, A.; MAGER, J. (1964). Hemolysis and splitting of human erythrocyte phospholipids by snake venoms. Biochem. Biophys. Acta (Amst). 84: 60.

CONDREA, E. (1979). Hemolytic effects of snake venoms: In: Snake Venoms. Handbook of Experimental Pharmacology. Lee, C.Y., vol. 52, pp. 448, Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York.

CONDREA, E.; YANG, C.C. and ROSENBERG, P. (1981). Lack of correlation between anticoagulant activity and phospholipide hydrolysis by snake venom phospholipases  $A_2$ . Thromb. Haemost. 45: 82.

CULL-CANDY, S.G.; FOHLMAN, J.; GUSTAVSSON, D.; LULLMANN-RANCH, R.; THESLEF, D. (1976). The effect of Taipoxin and notexin on the function and fine structural of the murine neuromuscular junction. J. Neurosci. 1: 175.

DE BOSE, C.D. and ROBERTS, M.F. (1983). The interaction of dialkyl ether lecithins with phospholipase A<sub>2</sub> (Naja naja naja). Composition of the interface modulates lecithin binding. J. Biol. Chem. 258: 6327.

DELEZENNE, C.; FOURNEAU, E. (1914). Constitution du phosphatide hémolysant (lysolecithine) provenant de l'action du venin de cobra sur le vitellus d'oeuf de poule. Bull. Soc. Chim. Fr. 15: 421.

DEMEL, R.A.; GEURTS VAN KESSEL, W.S.M.; ZWAAL, R.F.A.; ROELOFSEN, B. and VAN DEENEN, L.L.M. (1975). Relation between various phospholipase actions on human red cell membranes and the interfacial phospholipid pressure in monolayers. Biochim. Biophys. Acta 406:97.

DENNIS, E.A. (1983). Phospholipases. In the Enzymes (Boyer, P.D. Ed.) vol. XVI. pp. 307-353. Academic Press New York.

DENSON, K.W. (1961). The specific assay of Prower-Stuart factor and factor VII. Acta Haemat. 25: 105.

DESNUELLE, P.; CONSTANTIN, J.M. and BALDY, J. (1955). Technique potentiométric pour la mesure de l'activité de la lipase pancréatique. Bull. Soc. Chim. Biol. 37: 285.



- DIJKSTRA, B.W.; DRENTH, J.; KALK, K.H. and VANDERMAELEN, P.J. (1978). Structure of bovine pancreatic phospholipase A<sub>2</sub> at 2.4 Å resolution. J. Mol. Biol. 124: 53.
- DIJKSTRA, B.W.; KALK, K.H.; HOL, W.G.J. and DRENTH, J. (1981a). Structure of bovine pancreatic phospholipase A<sub>2</sub> at 1.7 Å resolution. J. Mol. Biol. 147: 97.
- DIJKSTRA, B.W.; DRENTH, J. and KALK, K.H. (1981b). Active site and catalytic mechanism of PLA<sub>2</sub>. Nature 289: 604.
- DIJKSTRA, B.W.; RENETSEDER, R.; KALK, K.H.; HOL, W.G. and DRENTH, J. (1983). Structure of porcine pancreatic phospholipase A<sub>2</sub> at 2.6 Å resolution and comparison with bovine phospholipase A<sub>2</sub>. J. Mol. Biol. 168: 163.
- 
- DONNE-OP DEN KELDER, G.M.; HILLE, J.D.R.; DIJKMAN, R.; DE HAAS, G.H. and EGMOND, M.R. (1981). Binding of porcine pancreatic phospholipase A<sub>2</sub> to various micellar substrate analogues. Involvement of histidine-48 and aspartic acid-49 in the binding process. Biochemistry 20: 4074.
- DUBOURDIEU, D.J.; KAWAGUCHI, H.; SHIER, W.T. (1987). Molecular weight variations in the diversity of phospholipase A<sub>2</sub> forms in reptile venoms. Toxicon 25: 333.

- DUFOURCO, J. and FAUCON, J.F. (1978). Specific bindings of a cardiotoxin from Naja mossambica mossambica to charged phospholipids detected by intrinsic fluorescence. *Biochemistry* 17: 1170.
- DUFTON, M.J. and HIDER, R.C. (1983). Classification of phospholipase A<sub>2</sub> according to sequence. Evolutionary and pharmacological implications. *Eur. J. Biochem.* 137: 545.
- DUNCAN, C.J. (1978). Role of intracellular in promoting muscle damage: a strategy for controlling the dystrophic condition. *Experientia* 34: 1531.
- DURKIN, J.P.; PICKWELL, G.V.; TROTTER, J.T.; SHIER, W.T. (1981). Phospholipase A<sub>2</sub> eletroctrophoretic variants in reptile venoms. *Toxicon* 19: 535.
- EAGLE, H. (1937). The coagulation blood by snake venoms and its physiologic significance. *J. Exp. Med.* 65: 613.
- FABIANO, R.J.; TU, A.T. (1981). Purification and biochemical study of viriditoxin, tissue damaging toxin, from prairie rattlesnake venom. *Biochemistry* 20: 21.
- FAURE, G. and BON, C. (1978). Several isoforms of crotoxin are present in individual venoms from the South American rattlesnake Crotalus durissus terrificus. *Toxicon* 25: 229.

FERREIRA, S.H. (1965). A bradykinin potentiating factor (bpf) present in the venom of Bothrops jararaca. Brit. J. Pharmacol. 24: 163.

FLEER, E.A.M.; VERHEIJ, H.M. and DE HAAS, G.H. (1978). The primary structure of bovine pancreatic phospholipase A<sub>2</sub>. Eur. J. Biochem. 82: 261.

FLOWER, R.J. and BLACKWELL, G.J. (1976). The importance of phospholipase A<sub>2</sub> in prostaglandin biosynthesis. Biochem. Pharmacol. 25: 285.

FOHLMAN, J.; EAKER, D.; KARLSSON, E. and THESLEFF, S. (1976). Taipoxin, an extremely potent presynaptic neurotoxin from the venom of the Australian snake taipan (Oxyranus s. scutellatus). Isolation, characterization, quaternary structure and pharmacological properties. Eur. J. Biochem. 68: 457.

FOHLMAN, J. and EAKER, D. (1977). Isolation and characterization of a lethal myotoxic phospholipase A from the common sea snake Enhydrina schistosa causing myoglobinuria in mice. Toxicon 15: 385.

FOHLMAN, J.; LIND, P. and EAKER, D. (1977). Taipoxin, an extremely potent presynaptic snake venom neurotoxin. Elucidation of the primary structure of the acidic carbohydrate-containing taipoxin-subunit, a prophospholipase homolog. FEBS Lett 84: 367.

FOHLMAN, J. (1979). Comparison of two highly toxic australian snake venoms: the taipan (Oxyuranus s. scutellatus) and the fierce snake (Parademansia microlepidotus).  
Toxicon 17: 170.

FONSECA, F. (1949). Animais peçonhentos. Inst. Butantan, São Paulo.

FRAENKEL-CONRAT, H. (1982-1983). Snake venom neurotoxins related to phospholipase A<sub>2</sub>. J. Toxicol. Toxin reviews 1(2): 205.

GAN-ELEPANO, M. and MEAD, J.F. (1978). The function of phospholipase A<sub>2</sub> in the metabolism of membrane lipids. Biochem. Biophys. Res. Commun. 83: 247.

GINSBORG, B.L. and JOAN WARRINER (1960). The isolated chick biventer cervicis nerve-muscle preparation. Brit. J. Pharmacol. 15: 410.

GOPALAKRISHNAKONE, P.; WAWGOOD, B.J.; HOLBROOKE, S.E.; MARSH, N.A.; SANTANA DE SÁ, S. and TU, A.T. (1980). Sites of action of mojave toxin isolated from the mojave rattlesnake. Br. J. Pharmacol. 69: 421.

GRABAR, P. et WILLIAMS, C.A. (1953). Méthode permettant l'étude conjuguée des propriétés électrophorétiques et immunochimiques d'un mélange de protéines. Application au sérum sanguin. *Biochim. Biophys. Acta.* 10: 193.

GRABAR, P.; BURTIN, P. (1964). *Immuno-electrophoretic Analysis.* Amsterdam, London, New York: Elsevier Publishing Company.

GRASSET, E.; BRACHBUHLER, T.; SCHWARTZ, D.E. & PONGRATZ, E. (1956a). Comparative analysis and electrophoretic fractionations of snake venoms with special reference to Vipera russeli and Vipera aspis venoms. In: Buckley, E.E. & Porges, N. eds. *Venoms.* Washington, p. 153-169. (American Association for the Advancement of Science. Publications n<sup>o</sup>. 44).

GRASSET, E., PONGRATZ, E. & BRECHBUHLER, T. (1956b). Analyses immunochimique des constituants des venins de serpents par la méthode de précipitation en milieu gélifié. *Ann. Inst. Pasteur* 91: 162.

GROTTO, L.; JERUSHALMY, Z. and de VRIES, A. (1969). Effect of purified Vipera palestinae hemorrhagin on blood coagulation and platelet function. *Thromb. Diath. Haemorrh.* 22: 482.

- GUBENSEK, F.; RITONJA, A. and TURK, D. (1986). Localization of the toxic site in ammodytoxins. Proc. 7th Europ. Symp. on Animal, Plant and Microbial Toxins.
- GUTIÉRREZ, J.M.; CHAVES, F.; BOLAÑOS, R.; CERDAS, L.; ROJAS, E.; ARROYO, O. and PORTILLA, E. (1981). Neutralización de los efectos locales del veneno de Bothrops asper por un antiveneno polivalente. *Toxicon* 19: 493.
- GUTIÉRREZ, J.M.; OWNBY, C.L. and ODELL, G.V. (1984). Isolation of a myotoxin from Bothrops asper venom: partial characterization and action on skeletal muscle. *Toxicon* 22(1): 115.
- HALPERT, J. and EAKER, D. (1975). Amino acid sequence of a presynaptic neurotoxin from the venom of Notechis scutatus scutatus (Australian tiger snake). *J. Biol. Chem.* 250: 6990.
- HALPERT, J. and EAKER, D. (1976). Isolation and amino acid sequence of a neurotoxic phospholipase A from the venom of the Australian tiger snake Notechis scutatus scutatus. *J. Biol. Chem.* 251: 7343.
- HALPERT, J.; EAKER, D. and KARLSSON, E. (1976). The role of phospholipase activity in the action of a presynaptic neurotoxin from the venom of Notechis scutatus scutatus. (Australian tiger snake). *FEBS Lett.* 61: 72.

- HARRIS, J.B. (1984). Polypeptides from snake venoms which act on nerve and muscle. In: Progress in Medical Chemistry. Ellis, G.P., West, G.B., vol. 21, pp. 64. Elsevier Science Publishers, B.V.
- HARTREE, E.F. (1972). Determination of protein: A modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. Analytical Biochemistry 48: 422.
- HARVEY, A.L. and KARLSSON, E. (1982). Protease inhibitor homologues from mamba venoms: facilitation of acetylcholine release and interactions with prejunctional blocking toxins. Br. J. Pharmac. 77: 153.
- HARVEY, A.L., ANDERSON, A.J., KARLSSON, E. (1984a). Facilitation of transmitter release by neurotoxins from snake venoms. J. Physiol. 79: 222.
- HARVEY, A.L.; ANDERSON, A.J.; MBUGUA, P.M., E. (1984b). Toxins from mamba venoms that facilitate neuromuscular transmission. J. Toxic-Toxin. Rev. 3: 91.
- HAWGOOD, B.J. and SMITH, J.W. (1977). The presynaptic action of crotoxin at the murine neuromuscular junction. J. Physiol. 266: 91.

HAWGOOD, B.J. and SANTANA de SA, S. (1979). Changes in spontaneous and evoked release of transmitter induced by the crotoxin complex and its component phospholipase A<sub>2</sub> at the frog neuromuscular junction. *Neuroscience* 4: 293.

HEINRIKSON, R.L.; KRUEGER, E.T. and KEIM, P.S. (1977). Amino acid sequence of phospholipase A<sub>2</sub>- from the venom of Crotalus adamanteus. A new classification of phospholipase A<sub>2</sub> based upon structural determinants. *J. Biol. Chem.* 252: 4913.

HENDON, R.A. and FRAENKEL-CONRAT, H. (1971). Biological roles of the two components of crotoxin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 68: 1560.

HENDON, R.A. and TU, A.T. (1979). The role of crotoxin subunits in tropical rattlesnake neurotoxic action. *Biochim. Biophys. Acta* 578: 243.

HENDRICKSON, H.S.; TRYGSTAD, W.M.; LOFTNESS, T.L. and SAILER, S.L. (1981). Phospholipase A<sub>2</sub> activity on mixed lipid monolayers: inhibition and activation of phospholipases A<sub>2</sub> from porcine pancreas and Crotalus adamanteus by anionic and neutral amphiphiles. *Arch. Biochem. Biophys.* 212: 508.



HIDER, R.C.; KHADER, F. (1982). Biochemical and Pharmacological properties of cardiotoxins isolated from cobra venom. *Toxicon* 20: 175.

HIRS, C.H.W. (1967). Determination of Cystine as Cysteic Acid<sup>1</sup>. *Methods in Enzymology* 11: 59.

HO, C.Y. and LEE, C.Y. (1981). Presynaptic actions of mojave toxin isolated from mojave rattlesnake (Crotalus scutulatus). *Toxicon* 19: 889.

HO, C.Y. and LEE, C.Y. (1983). Mode of neuromuscular blocking action of ceruleotoxin. *Toxicon* 21: 301.

HOFMANN, H. and BON, C. (1987b). Blood coagulation induced by the venom of Bothrops atrox. 1. Identification, purification and properties of prothrombin activator. *Biochemistry* 26: 772.

HOFMANN, H. & BON, C. (1987a). Blood coagulation induced by the venom of Bothrops atrox. 2. Identification, purification and properties of two factor X activators. *Biochemistry* 26: 780.

HOLLECKER, M. and CREIGHTON, T.E. (1983). Evolutionary conservation and variation of protein folding pathways. Two protease inhibitor homologues from black mamba venom. *J. Mol. Biol.* 168: 409.

HOMSI-BRANDEBURGO, M.I., QUEIROZ, L.S.; SANTO-NETO, H.; RODRIGUES-SIMIONI, L. and GIGLIO, J.R. (1988). Fractionation of Bothrops jararacussu snake venom: Partial chemical characterization and Biological activity of Bothropstoxin. *Toxicon*, vol. 26, nº. 7, pp. 615-627.

HOUSSAY, B.A. & NEGRETE, J. (1918). Estudios sobre venenos de serpientes. III. Accion de los venenos de serpientes sobre las substancias proteicas. *Rev. Inst. Bacteriol. (Dep. Nac. Higiene)*, 1: 341.

HOWARD, B.D. and TRUOG, R. (1977). Relationship between the neurotoxicity and phospholipase A activity of  $\beta$  - bungarotoxin. *Biochemistry* 16: 122.

HOWARD, B.D. and GUNDERSEN, C.B. (1980). Effects and mechanism of polypeptide neurotoxins that act presynaptically. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 20: 307.

- HUMMEL, B.C.W. (1959). A modified spectrophotometric determination of chymotrypsin, trypsin and thrombin. *Canad. J. Biochem. Physiol.* 37: 1393.
- IWANAGA, S. and SUZUKI, T. (1979). Enzymes in snake venom. In: *Snake Venoms. Handbook of Experimental Pharmacology*, Lee, C.Y., vol. 52, pp. 61, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, New York.
- JAIN, M.K.; ROGERS, J.; JAHAGIRDAR, D.V.; MARECEK, J.F. and RAMIREZ, F. (1986). Kinetics of interfacial catalysis by phospholipase A<sub>2</sub> in intravesicle scooting mode, and heterofusion of anionic and zwitterionic vesicles. *Biochim. Biophys. Acta* 860: 435.
- JENG, T.W. and FRAENKEL-CONRAT, H. (1978). Chemical modification of histidine and lysine residues in crotoxin. *FEBS Lett.* 87: 291.
- JERMYN, M.A. (1975). Increasing the sensitivity of the Anthrone method for carbohydrate. *Analytical Biochemistry* 68: 332.
- JIMENEZ-PORRAS, J.M. (1973). Reptile toxins. In: *Biology Data Book*, 2nd Ed., vol. II, p. 697. Rockville Pibe: Federation of American Societies for Experimental Biology (FASEB).

- JOUBERT, F.J., TOWNSHEND, G.S. and BOTES, D.P. (1983).  
Purification, some properties of two phospholipases A<sub>2</sub>  
(CM-I and CM-II) and the amino acid sequence of CM-II  
from Bitis nasicornis (horned adder) venom. Hoppe-  
Seyler's Z. Physiol. Chem. 364: 1717.
- KAMENSKAYA, M.A. and THESLEFF, S. (1974). Neuromuscular  
blocking action of an isolated toxin from the Elapid  
(Oxyuranus scutellatus). Acta Physiol. Scand. 90: 716.
- KAMIGUTI, A.S.; SILVA, M.C.C.S.; MORENA, P. and NAHAS, L.  
(1985). The anticoagulant effect of Bothrops  
castelnaudi snake venom (Castelnaud's Pit Viper).  
Toxicon 23(3): 383.
- KARLSSON, E.; EAKER, D. and RYDEN, L. (1972). Purification  
of a Presynaptic neurotoxin from the venom of the  
Australian tiger snake Notechis scutatus scutatus.  
Toxicon 10: 405.
- KARLSSON, K.V. (1979). Chemistry of protein toxins in  
snake venoms. In: Snake Venoms. Handbook of Experimen-  
tal Pharmacology, Lee, C.Y., vol. 52, pp. 159.  
Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York.
- KEITH, C., FELDMAN, D.S., DEGANELLO, S., GLICK, J.,  
WARD, K.B.; JONES, E.O. and SIGLER, P.B. (1981). The  
2,5 A crystal structure of a dimeric PLA<sub>2</sub> from the  
venom of Crotalus atrox. J. Biol. Chem. 256: 8602.

- KLEMMER, K. (1963). Liste der rezenten Giftschlangen. Elapidae, Hidropidae, Viperidae und Crotalidae. In: Die Giftschlangen der Erde. Wirkung und Antigenität der Gifte. Therapie von Giftschlangenbissen. Behringwerk-Mitteilungen, pp. 255. Marburg/Lahn: Elwert.
- KLOBUSITZKY, D. (1961). Coagulant and anticoagulant agents in snake venoms. Am. J. Med. Sci. 242: 107.
- KONDO, H. ; KONDO, S. ; IKEZAWA, H. ; MURATA, R. and OHSAKA, A. (1960). Studies on the quantitative method for determination of hemorrhagic activity of habu snake venom. Jpn. J. Med. Sci. Biol. 13: 43.
- KONDO, K. ; NARITA, K. and LEE, C.Y. (1978). Amino acid sequences of the two polypeptides chains in  $\beta_1$ -bungarotoxin from the venom of Bungarus multicinctus. J. Biochem. 83: 101.
- KONDO, K. ; TODA, H. ; NARITA, K. and LEE, C.H. (1982a). Amino acid sequence of  $\beta$ -bungarotoxin from Bungarus multicinctus venom. The amino acid substitutions in the B chains. J. Biochem. 91: 1519.
- KONDO, K. ; TODA, H. ; NARITA, K. and LEE, C.Y. (1982b). Amino acid sequences of three  $\beta$ -bungarotoxins ( $\beta_3$ ,  $\beta_4$  and  $\beta_5$  bungarotoxins) from Bungarus multicinctus venom. Amino acid substitutions in the A chains. J. Biochem. 91: 1513.

- KUNITZ, M. (1946). Crystalline soybean trypsin inhibitor. II. J. gen. Physiol: 30: 291.
- LAEMMLI, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T<sub>4</sub>. Nature, Lond. 227: 680.
- LEE, C.Y. (1972). Chemistry and pharmacology of polypeptide toxins in snake venoms. Ann. Rev. Pharmacol. 12: 265.
- LEE, C.Y. (1979). Recent advances in chemistry and Pharmacology of snake toxins. In: Advances in Cytopharmacology. Ceccarelli, B., Clementi, F., vol. 3, pp. 1. Raven Press, New York.
- LEE, C.Y.; HO, C.L. and BOTES, D.P. (1982). Site of action of caudoxin, a neurotoxic phospholipase A<sub>2</sub> from the horned puff adder (Bitis caudalis) venom. Toxicon 20: 637.
- LEE, C.Y.; HO, C.L. (1982). The pharmacology of phospholipase A<sub>2</sub> isolated from snake venoms, with particular reference to their effects on neuromuscular transmission. In: Advances in Pharmacology and Therapeutics II. Biochemical and Immunological Pharmacology. Yoshida, H. ; Hagihara, J.; Ebashi, S., vol. 4, pp. 37, Oxford; Pergamon Press.

- LIN SHIAU, S.Y.; HUANG, M.C.; LEE, C.Y. (1976). Mechanism of action of cobra cardiotoxin in the skeletal muscle. *J. Pharmacol. exp. Ther.* 196: 758.
- LIND, P. (1982). Amino acid sequence of the  $\beta_1$  isosubunit of taipoxin, an extremely potent presynaptic neurotoxin from the Australian snake Taipan (Oxyuranus s. scutellatus). *Eur. J. Biochem.* 128: 71.
- LIND, P. and EAKER, D. (1982). Amino-acid sequence of the  $\alpha$ -subunit of taipoxin, an extremely potent presynaptic neurotoxin from the Australian snake Taipan (Oxyuranus s. scutellatus). *Eur. J. Biochem.* 124: 441.
- LÓBO DE ARAÚJO, A. and RADVANYI, F. (1987). Determination of phospholipase A<sub>2</sub> activity by a colorimetric assay using a pH indicator. *Toxicon* 25(11): 1181.
- LOEB, L.A. and GROSS, W. (1986). Identification and purification of sheep platelet phospholipase A<sub>2</sub> isoforms. Activation by physiologic concentrations of calcium ion. *J. Biol. Chem.* 261: 10467.
- LOMONTE, B. (1985). Edema-forming activity of bushmaster (*Lachesis muta stenophrys*) and central american rattlesnake (Crotalus durissus durissus) venoms and neutralization by a polyvalent antivenom. *Toxicon* 23: 173.

- LOMONTE, B. ; GUTIÉRREZ, J.M., MORENO, E. and CERDAS, L. (1987). Antibody neutralization of a myotoxin from the venom of Bothrops asper (terciopelo). *Toxicon* 25: 443.
- LOWRY, O.H., ROSENBOUGH, N.J., FARR, A.L. and RANDALL, R.J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265.
- MAGAZANIK, L.G. and SLAVNOVA, T.I. (1978). Effects of presynaptic polypeptide neurotoxin from snake venom (Notechis-II-5 and Notexin) on frog neuromuscular junction. *Physiol. bohemoslov.* 27: 421.
- MANDELBAUM, F.R.; REICHL, A.P. and ASSAKURA, M.T. (1976). Some physical and biochemical characteristics of HF<sub>2</sub>, one of the hemorrhagic factor in the venom of Bothrops jararaca. In: *Animal, Plant and Microbial Toxins*, Ohsaka, A., Hayashi, K., Saway, Y., Eds., vol. I, pp. 111. London, Plenum Press.
- MANDELBAUM, F.R.; REICHL, A.P. and ASSAKURA, M.T. (1982). Isolation and characterization of a proteolytic enzyme from the venom of the snake Bothrops jararaca (jararaca). *Toxicon* 20: 955.



- MANDELBAUM, F.R.; REICHL, A.P. and ASSAKURA, M.T. (1988). Hemorrhagic factors from the venoms of two species of Bothrops snakes. Anais do XI Simpósio Anual da Acad. Ciências do Estado de São Paulo, vol. I, pp. 9.
- MARAGANORE, M. and HEINRIKSON, R.L. (1986). The lysine-49 phospholipase A<sub>2</sub> from the venom of Agkistrodon piscivorus piscivorus. Relation of structure and function to other phospholipases A<sub>2</sub>. J. Biol. Chem. 261: 4797.
- MEBS, D. (1970). A comparative study of enzyme activities in snake venoms. Int. J. Biochem. I: 335.
- MEBS, D.; SAMEJIMA, Y. (1980). Purification from Australian elapid venoms, and properties of phospholipases A which cause myoglobinuria in mice. Toxicon 18: 393.
- MEISTER, A. (1956). The use of snake L-amino acid oxydase for the preparation of Keto acids. In Venoms, Ed. E. E. Buckley and N. Porges, 295-301. Published by The American Association for the advancement Science.
- MINTON JR., S.A. (1979). Common antigens in snake venoms. In: Hand-Book of Experimental Pharmacology, vol. 52, pp. 847-862 (Chen-Yuan Lee, Ed.). Berlin: Springer-Verlag.

- MOSKOWITZ, N.; SCHOOK, W. and PUSZKIN, S. (1982).  
Interaction of brain synaptic vesicles induced by  
endogenous  $Ca^{2+}$  dependent phospholipase  $A_2$ . *Science*  
216: 305.
- NAHAS, L.; BENSON, K.W.E.; MACFARLANE, R.G. (1964). A  
study of the coagulant action of eight snake venoms.  
*Thromb. Diath. Haemorrh.*, 12: 355.
- NAHAS, L.; KAMIGUTI, A.S.; BARROS, M.A.R. (1979).  
Thrombin-like and factor X-activator components of  
Bothrops snake venoms. *Thromb. Haemostasis* 41: 314.
- NEVILLE, D.M. and HUDSON, T.H. (1986). Transmembrane  
transport of diphtheria toxin, related toxins, and  
colicins. *Ann. Rev. Biochem.* 55: 195.
- NG, R.H. and HOWARD, B.D. (1978). Deenergization of  
nerve terminals by  $\beta$ -bungarotoxin. *Biochemistry* 17:  
4978.
- NIEUWENHUIZEN, W.; KUNZE, H. and DE HAAS, G.H. (1974).  
Phospholipase  $A_2$  (Phosphatide Acylhydrolase, EC 3.1.1.4)  
from Procine Pancreas. *Methods Enzymology* 32: 147.

NIKAI, T.; MORI, N.; KISHIDA, M.; SUGIHARA, H. and TU, A.T. (1984). Isolation and biochemical characterization of hemorrhagic toxin from the venom of Crotalus atrox (Wester diamondback rattlesnake). Arch. Biochem. Biophys. 231: 309.

NISENBON, H.E.; PERAZZO, J.C.; MONSERRAT, A.I. and VIDAL, J.C. (1986b). Contribution of phospholipase A<sub>2</sub> to the lethal potency of Bothrops alternatus (vibora de la cruz) venom. Toxicon 24: 807.

NISHIDA, S.; TERASHIMA, M. and TAMIYA, N. (1985). Amino acid sequences of phospholipases A<sub>2</sub> from the venom of an Australian elapid snake (King brown Snake, Pseudechis australis). Toxicon 23: 87.

ONDETTI, M.A.; WILLIAMS, N.J.; SABO, E.F.; PLUSCEC, J.; WEAVER, E.R. and KOCY, O. (1971). Angiotensin converting enzyme inhibitors from the venom of Bothrops jararaca. Isolation, elucidation of structure and synthesis. Biochemistry 10: 4033.

OP DEN KAMP, J.A.F.; DE GIER, J. and VAN DEENEN, L.L.M. (1974). Hydrolysis of phosphatidylcholine liposomes by pancreatic phospholipase A<sub>2</sub> at the transition temperature. Biochim. Biophys. Acta 345: 253.

- OTHMAN, I.B.; SPOKES, J.W. and DOLLY, J.O. (1982). Preparation of neurotoxic (3H)  $\beta$ -bungarotoxin. Demonstration of stable binding to brain synapse and its inhibition by toxin I. *Eur. J. Biochem.* 128: 267.
- OUCHTERLONY, O. (1967). Immunodiffusion and Immunoelectrophoresis. In: B.M. Wier (Ed.). *Handbook of Experimental Immunology*, Blackwell Scientific Publications, Oxford, pp. 665-705.
- OUYANG, C.; YEH, H. and HUANG, T. (1983). A potent platelet aggregation inhibitor purified from Agkistrodon halys (Mamushi) snake venom. *Toxicon* 21: 797.
- OUYANG, C.; HUANG, T.F. (1983). Potent platelet aggregation inhibitor from Trimeresurus gramineus snake venom. *Biochim. Biophys. Acta* 757: 332.
- PATTUS, F.; SLOTBOOM, A.J. and DE HAAS, G.H. (1979). Regulation of phospholipase A<sub>2</sub> activity by the lipid-water interface: a monolayer approach. *Biochemistry* 18: 2691.
- PIETERSON, W.A.; VIDAL, J.C.; VOLWERK, J.J. and DE HAAS, G.H. (1974). Zymogen-catalysed hydrolysis of monomeric substrates and the presence of a recognition site for lipid-water interfaces on phospholipase A<sub>2</sub>. *Biochemistry* 13: 1455.

- PLÜCKTHUN, A. and DENNIS, E.A. (1985). Activation, aggregation, and product inhibition of Cobra venom phospholipase A<sub>2</sub> and comparison with other phospholipases. J. Biol. Chem. 260: 11099.
- RADVANYI, F. and BON, C. (1982). Catalytic activity and reactivity with p-bromophenacyl bromide of the phospholipase subunit of crotoxin. Influence of dimerization and association with the noncatalytic subunit. J. Biol. Chem. 257: 12616.
- RADVANYI, F.; SALIOU, B.; BON, C. and STRONG, P.N. (1987). The interaction between the presynaptic phospholipase neurotoxins  $\beta$ -bungarotoxin and crotoxin and mixed detergent-phosphatidylcholine micelles: a comparison with non-neurotoxic snake venom phospholipases A<sub>2</sub>. J. Biol. Chem. 262: 8966.
- RADVANYI, F. (1987). Mode d'action possible de la crotoxine, une neurotoxine présynaptique à activité phospholipase A<sub>2</sub>. These de Doctorat D'Etat ès Sciences Naturelles. Université Pierre et Marie Curie, Paris VI.
- RANDOLPH, A. and HEINRIKSON, R.L. (1982). Crotalus atrox PLA<sub>2</sub>. Amino acid sequence and studies on the function of the NH<sub>2</sub>-terminal region. J. Biol. Chem. 257: 2155.
- REHM, H. and BETZ, H. (1982). Binding of  $\beta$ -bungarotoxin to synaptic membrane fractions of chick brain. J. Biol. Chem. 257: 10015.

- REHM, H. (1984). News about the neuronal membrane protein which binds the presynaptic neurotoxin  $\beta$ -bungarotoxin. J. Physiol. (Paris) 79: 265.
- RENETSEDER, R.; BRUNIE, S.; DIJKSTRA, B.W.; DRENTH, J. and SIGLER, P.B. (1985). A comparison of the crystal structures of phospholipase A<sub>2</sub> from bovine pancreas and Crotalus atrox venom. J. Biol. Chem. 260: 11627.
- RITONJA, A. and GUBENSEK, F. (1985). Amodytoxin A, a highly lethal phospholipase A<sub>2</sub> from Vipera ammodytes ammodytes venom. Biochim, Biophys. Acta 828: 306.
- ROBERTS, M.F.; DEEMS, R.A. and DENNIS, E.A. (1977). Dual role of interfacial phospholipid in phospholipase A<sub>2</sub> catalysis. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 74: 1950.
- ROBERTS, M.F.; ADAMICH, M.; ROBSON, R.J.; DENNIS, E.A. (1979). Phospholipid activation of Cobra venom phospholipase A<sub>2</sub>. 1. Lipid-lipid or lipid-enzyme interaction. Biochemistry 18: 3301.
- ROHOLT, O.A. and SCHLAMOWITZ, N. (1961). Studies of the use of dihexanoyl-lecithin and other lecithins as substrates for phospholipase A. Arch. Biochem. Biophys. 94: 364.

- ROSENFELD, G.; HAMPE, O.G.; KELEN, E.M.A. (1959). Coagulant and fibrinolytic activity of animal venoms: determination of coagulant and fibrinolytic index of different species. Mem. Inst. Butantan (São Paulo) 29: 143.
- ROSENFELD, G. (1971). Simptomatology, pathology and treatment of snakes bites in South America. In: Venomous animals and their venoms. Bucherl, W., Buckley, E., Deulofev, V., vol. 2, pp. 345. New York, Academic.
- ROSENBERG, P. (1979). Pharmacology of phospholipase A<sub>2</sub> from snake venoms. In: Snake Venoms. Handbook of Experimental Pharmacology. Lee, C.Y., vol. 52, pp. 403. Springer-Verlag Berlin. Heidelberg New York.
- ROSENBERG, P. (1986). The relationship between enzymatic activity and pharmacological properties of phospholipases in natural poisons. In: Natural Toxins, pp. 129-174. Harris, J.B. Ed. Oxford: Oxford University.
- ROTHSCHILD, A.M.; ROTHSCCHILD, Z. (1979). Liberation of Pharmacologically active substances by snake venoms. In: Snake Venom. Handbook of Experimental Pharmacology, Lee, C.C., vol. 52, pp. 591, Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York.

RUSSEL, F.E. (1979). The clinical problem of Crotalid snake venom poisoning. In: Snake Venoms. Handbook of Experimental Pharmacology, Chen-Yuan Lee, vol. 52, pp. 978, Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York.

SALACH, J.I.; TURINI, P.; SENG, R.; HAUBER, J.; SINGER, T.P. (1971). Phospholipase A of snake venoms. I. Isolation and molecular properties of isoenzymes from Naja naja and Vipera russellii venoms. J. Biol. Chem. 246: 331.

SARKAR, N.K. (1947). Isolation of cardiotoxin from cobra venom (Naja tripudians monocellate variety). J. Ind. Chem. Soc. 24: 227.

SCAVINI, L.M. & FERRARESI, R.W. (1962). Capacidad de proteccion y coincidencias antigenicas de sueros anti-ofidicos. An. soc. cient. argent. 174: 87.

SCHENBERG, S. (1958). Estudo comparativo da composicao do veneno de Bothrops neuwiedii em placas de Ouchterlony. Ciênc. e Cultura 10: 163.

SCHENBERG, S. (1961). Análise imunológica (micro-difusão em gel) de venenos individuais de Bothrops jararaca. Ciênc. e Cultura 13: 225.



- SCHENBERG, S. (1963). Immunological (Ouchterlony method) identification of intrasubspecies qualitative differences in snake venom composition. *Toxicon* 1: 67.
- SEEGERS, W.H. and OUYANG, C. (1979). Snake venoms and blood coagulation. In: *Hand. Exp. Pharm.* (C.Y. Lee Ed.) 52: 684-750, Springer-Verlag.
- SHIER, W.T. (1982). Cytolytic mechanisms: self-destruction of mammalian cells by activation of endogenous hydrolytic enzymes. *J. Toxicol. Toxin Rev.* 1: 1.
- SHILOAH, J.; KLIBANSKY, C.; de VRIES, A., BERGER, A. (1973). Phospholipase B activity of a purified phospholipase A from Vipera palestinae venom. *J. Lipid Res.* 14: 267.
- SHIPOLINI, R.A. ; CALLEWAERT, G.L.; COTTRELL, R.C. and VERNON, C.A. (1974). The amino-acid sequence and carbohydrate content of phospholipase A<sub>2</sub> from bee venom. *Eur. J. Biochem.* 48: 465.
- SILES VILLARROEL, M. (1972). Contribuição ao estudo de venenos de serpentes do gênero Bothrops (B. jararaca, B. alternatus, B. insularis, B. jararacussu, B. atrox e B. cotiara). São Paulo (Tese-Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo).

SILES VILLARROEL, M.; ROLIM, ROSA, R.; FURLANETTO, R.S. & ZELANTE, F. (1973). Estudo eletroforético em "Celloge1" de venenos do gênero Bothrops. Mem. Inst. Butantan 37:83.

SIMIONI, L.R.; BORGESE, N. and CECCARELLI, B. (1983). The effects of Bothrops jararacussu venom and its components on frog nerve-muscle preparation. Neuroscience 10(2): 475.

SLOTTA, K.H. and FRAENKEL-CONRAT, H. (1938). Schlangengifte-III. Mitteilung und kristallisation des klapperschlangengiftes. Ber. dt. chem. Ges. 71: 1076.

SLOTBOOM, A.J.; JANSEN, E.H.J.M.; VLIJM, H.; PATTUS, F.; SOARES DE ARAÚJO, P. and DE HAAS, G.H. (1978).  $Ca^{2+}$  binding to porcine pancreatic phospholipase  $A_2$  and its function in enzyme-lipid interaction. Biochemistry 17: 4593.

SLOTBOOM, A.J.; VERHEIJ, H.M. and DE HAAS, G.H. (1982). On the mechanism of phospholipase  $A_2$ . In Phospholipids, (Hawthorne, J.N. and Ansell, G.B., Eds.), vol. 4, pp. 359. Elsevier biomedical, New York.

SOSA, B.P.; ALAGON, A.C.; MARTIN, B.M. and POSSANI, L.D. (1986). Biochemical characterization of the phospholipase  $A_2$  purified from the venom of the mexican beaded lizard (*Heloderma horridum horridum* Wiegmann). Biochemistry 25: 2927.

SPACKMAN, D.H.; STEIN, W.H. and MOORE, S. (1958).

Automatic recording apparatus for use in the chromatography of amino acids. Anal. Chem. 30: 1190.

STRONG, P.N.; GOERKE, J.; OBERG, S.G.; KELLY, R.B. (1976).

$\beta$ -bungarotoxin, a presynaptic toxin with enzymatic activity. Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash.) 73: 178.

STRONG, P.N. (1987). Presynaptic phospholipase  $A_2$  neurotoxins: relationship between biochemical and electrophysiological approaches to the mechanism of toxin action. In: Cellular and Molecular Basis of Cholinergic Function (Dowdall, M.J. and Hawthorne, J.N. Eds), Ellis Horwoods, Chichester Sussex.

SU, M.J. and CHANG, C.C. (1981). Effect of bivalent cations on the presynaptic actions and phospholipase  $A_2$  activity of notexin. A comparison with other complex presynaptic neurotoxins. Proc. Natl. Sci. Council. (Roc) B5: 82.

SU, M.J.; COULTER, A.R.; SUTHERLAND, S.K. and CHANG, C.C. (1983). The presynaptic neuromuscular blocking effect and phospholipase  $A_2$  activity of textilotoxin, a potent toxin isolated from the venom of the Australian brown snake, Pseudonaja textilis. Toxicon 21: 143.

- TAKAHASHI, T.; OHSAKA, A. (1970). Purification and some properties of two hemorrhagic principles (HR2a and HR 2b) in the venom of Trimeresurus flavoviridis; complete separation of the principles from proteolytic activity. *Biochim. Biophys. Acta* 207: 65.
- TANAKA, S.; NOHRI, N.; KINARA, H. and OHNO, M. (1986). Amino acid sequence of Trimeresures flavoviridis phospholipase A<sub>2</sub>. *J. Biochem.* 99: 281.
- THOIN, L.G. ; RITONJA, A.; GUBENSEK, F. and RUSSEL, F.E. (1982). Neuromuscular and lethal effects of phospholipase A from Vipera ammodytes venom. *Toxicon* 20: 1051.
- TINKER, D.O. and WEI, J. (1979). Heterogenous catalysis by phospholipase A<sub>2</sub>: formulation of a kinetic description of surface effects. *Can. J. Biochem.* 57: 97.
- TSAI, M.C.; LEE, C.Y. and BDOLAH, A. (1983). Mode of neuromuscular blocking action of a toxic phospholipase A<sub>2</sub> from Pseudocerastes fieldi (Field's horned viper) snake venom. *Toxicon* 21: 527.
- TU, A.T. (1977). Phospholipase A<sub>2</sub>. In: *Venoms: Chemistry and Molecular Biology*. Wiley, J., Cap. 2, pp. 23, New York.

- TU, A.T. (1977). Venoms: Biochemistry and molecular biology p. 23-63 (Wiley, J., and Sons, eds.), New York.
- TU, A.T.; STERMITZ, J.; ISHIZAKI, N. and NONAKA, S. (1980). Comparative study of pit viper venoms of genera Trimeresurus from Asia and Bothrops from South (America: an immunological and isotachophoretic study. Comp. Biochem. Physiol. 66B, 249.
- UNDERWOOD, G. (1979). Classification and distribution of venomous snakes in the world. Handb. Exp. Pharm. 52, 15-40, Editor C.Y. Lee, Springer-Verlag.
- URIEL, J.; SANTINA, D.M. & RIZZO, E. (1968). Characterization d'enzymes dans le venin de Bothrops jararaca par les méthodes d'immunodiffusion. Bull. Soc. Chim. Biol. (Paris) 50: 938.
- VAN DEN BOSCH, H. (1982). Phospholipases. In: Phospholipids, (Hawthorne, J.N. and Ansell, Eds), vol. 4, pp. 313-357, Elsevier Biomedical, New York.
- VAN EIJK, J.H.; VERHEIJ, H.M.; DIJKMAN, R. and DE HAAS, G.H. (1983). Interaction of phospholipase A<sub>2</sub> from Naja melanoleuca snake venom with monomeric substrate analogs. Activation of the enzyme by protein-protein or lipid-protein interactions. Eur. J. Biochem. 132: 183.

- VERGER, R.; VAN DAM-MIERAS, M.C.E. and DE HAAS, G.H. (1973).  
Action of PLA at interfaces. *J. Biol. Chem.* 248: 4023.
- VERGER, R. and DE HAAS, G.H. (1976). Interfacial enzyme kinetics of lipolysis. *Annu. Rev. Biophys. Bioeng.* 5: 77.
- VERHEIJ, H.M.; VOLERK, J.J.; JANSEN, E.H.J.M.; PUYK, W.C.; DIJKSTRA, B.W.; DRENTH, J. and DE HAAS, G.H. (1980a). Methylation of histidine-48 in pancreatic phospholipase A<sub>2</sub>. Role of histidine and calcium ion in the catalytic mechanism. *Biochemistry* 19: 743.
- VERHEIJ, H.M.; SLOTBOOM, A.J. and DE HAAS, G.H. (1981a). *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 91: 91.
- VERHEIJ, H.M.; EGMOND, M.R. and DE HAAS, G.H. (1981b). Chemical modification of the  $\alpha$ -amino group in snake venom phospholipases A<sub>2</sub>. A comparison of the interaction of the pancreatic and venom phospholipase with lipid-water interfaces. *Biochemistry* 20: 94.
- VIDAL, J.C. and STOPANI, A.O.M. (1970). Inhibition of Phospholipase A by a Naturally Occurring Peptide in Bothrops venoms. *Experientia* 26: 831.

- VIDAL, J.C. and STOPANI, A.O. (1971). Isolation and purification of two phospholipases A from Bothrops venoms. *Archs, Biochem. Biophys.* 145: 543.
- VILJOEN, C.C.; BOTES, D.P. and KRUGER, H. (1982). Isolation and amino acid sequence of caudoxin, a presynaptic acting toxic phospholipase A<sub>2</sub> from the venom of the horned puff adder (Bitis caudalis). *Toxicon* 20: 715.
- VINCENT, J.P.; BALERNA, M.; LAZDUNSKI, M. (1978). Properties of association of cardiotoxin with lipid vesicles and natural membrane. *FEBS Lett.* 85: 103.
- VITAL BRAZIL, (1901a). Contribuição ao estudo do veneno ophidico. I. O veneno de algumas espécies brasileiras. *Rev. Med. de São Paulo* 4: 296.
- VITAL BRAZIL, ; RANGEL PESTANA, B. (1909c). Nova contribuição ao estudo do envenenamento ophidico. VII. Ação proteolytica. *Revista Médica de São Paulo* 12: 442.
- VITAL BRAZIL, (1911). La défense contre l'ophidisme. 2a. edição, Pocai & Weiss, pp. 48, São Paulo.
- VITAL BRAZIL & VELLARD, J. (1928). Action coagulante et anticoagulante des venims. *Ann. Inst. Pasteur* 42: 403.

VITAL BRAZIL, O. (1966). Pharmacology of crystalline crotoxin. II. Neuromuscular blocking action. Mem. Inst. Butantan 33: 981.

VITAL BRAZIL, O. and EXCELL, B.J. (1970=). Action of crotoxin and crotactin from the venom of Crotalus durissus terrificus (South American rattlesnake) on the frog neuromuscular junction. Proc. Phys. Soc. 34P-35P.

VITAL BRAZIL, O. (1982). Peçonhas. In: Farmacodinâmica, Corbett, C.E., pp. 1044, Guanabara, R.J.

VOLWERK, J.J.; PIETERSON, W.A. and DE HAAS, G.H. (1974). Histidine at the active site of phospholipase A. Biochemistry 13: 1446.

WADA, A.; SAKURAI, S.; KOBAYASHI, H.; YANAGIHARA, N. and IZUMI, F. (1983). Suppression by phospholipase A<sub>2</sub> inhibitors of secretion of catecholamines from isolated adrenal medullary cells by suppression of cellular calcium uptake. Biochem. Pharmacol. 32: 1175.

WAITE, M. (1985). Approaches to the study of mammalian cellular phospholipases. J. Lipid. Res. 26: 1379.



WEBER, K.; OSBORN, M. (1969). The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis. J. Biol. Chem. 244: 4406.

WEICHSELBAUM, T.E. (1946). An accurate and method for the determination of protein in small amount of blood serum and plasma. Amer. J. Clin. Path. Tech. 10: 40.

WEIL, C.S. (1952). Tables for convenient calculation of median effective dose ( $LD_{50}$  or  $ED_{50}$ ) and instructions in their use. Biometrics 9\_ 249.

WELCHES, W., FELSHER, D.; LANDSHULZ, W. and MARAGANORE, J. M. (1985). A Rapid method for the Purification of Monomeric and/or Dimeric Phospholipases  $A_2$  in Crotalid snake venoms. Toxicon 23(5): 747.

WROGEMANN, K.; PENA, S.D.Ĵ. (1976). Mitochondrial calcium overload: a general mechanism for cell necrosis in muscle diseases. Lancet I: 674.

YAMAMOTO, S.; NAKADATE, T.; NAKAKI, T.; ISHII, K. and KATO, R. (1982). Tumor promoter 12-0-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate-induced insulin secretion: inhibition by phospholipase  $A_2$  and lipoxygenase inhibitors. Biochem. Biophys. Commun. 105: 759.

YAMANAKA, M.; MATSUDA, M.; ISOBE, J.; OHSAKA, A.; TAKAHASHI, T. and OMORI-SATOH, T. (1974). Effect of purified hemorrhagic principles from Habu snake venom on platelet aggregation. In: Platelets, Thrombosis, and inhibitors (Didisheim, P.; Shimamoto, T.; Yamazaki, H., Eds.), pp. 335 Schattauer, Stuttgart.

YANG, C.C. (1984). Snake neurotoxins. Snake 16: 90.

YAWO, H. and KUNO, M. (1983). How a nerve fiber repairs its cut end: involvement of phospholipase A<sub>2</sub>. Science 222: 1351.

ZAHEER, W.; NORONHA, S.H.; HOSPATTANKAR, A.V.; BRAGANCA, B.M. (1975). Inactivation of (Na<sup>+</sup> + K<sup>+</sup>) stimulated ATPase by a cytotoxic protein from cobra venom in relation to its lytic effects on cells. Biochim. Biophys. Acta 394: 293.

ZWAAL, R.F.A.; ROELOFSEN, B.; COMFURIUS, P. and VAN DEENEN, L.L.M. (1975). Organization of phospholipids in human red cell membranes as detected by the action of various purified phospholipases. Biochim. Biophys. Acta 406: 83.