

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS



EDUARDO BRITTO DOS SANTOS DIZ FILHO

**“CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E FARMACOLÓGICA DE  
NOVAS ISOFORMAS DE PLA<sub>2</sub> CROTALICAS: *Crotalus  
durissus cumanensis* e *Crotalus durissus ruruima*”**

Este exemplar corresponde à redação final  
da tese defendida pelo(a) candidato (a)

*Eduardo Brito dos Santos Diz Filh.*

e aprovada pela Comissão Julgadora.

*Sergio Marangoni*

Dissertação apresentada ao Instituto de  
Biologia para obtenção do Título de  
Mestre em Biologia Funcional e  
Molecular, na área de Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. Sergio Marangoni

Campinas, 2007

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP

D648c

Diz Filho, Eduardo Britto dos Santos

Caracterização estrutural e farmacológica de novas isoformas de PLA<sub>2</sub> crotálicas, dos venenos de *Crotalus durissus cumanensis* e *Crotalus durissus ruruima* / Eduardo Britto dos Santos Diz Filho. – Campinas, SP: [s.n.], 2007.

Orientador: Sérgio Marangoni.  
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Fosfolipase A<sub>2</sub>. 2. Crotoxina. 3. *Crotalus durissus cumanensis*. 4. *Crotalus durissus ruruima*. I. Marangoni, Sérgio. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

(rcdt/ib)

**Título em inglês:** Structural and pharmacological characterization of new crotalic PLA<sub>2</sub> isoforms, from *Crotalus durissus cumanensis* and *Crotalus durissus ruruima* venoms.

**Palavras-chave em inglês:** Phospholipase A<sub>2</sub>; Crotoxin; *Crotalus durissus cumanensis*; *Crotalus durissus ruruima*.

**Área de concentração:** Bioquímica.

**Titulação:** Mestre em Biologia Funcional e Molecular.

**Banca examinadora:** Sérgio Marangoni, Marcos Hikari Toyama, Daniela Diógenes de Carvalho.

**Data da defesa:** 06/02/2007.

**Programa de Pós-Graduação:** Biologia Funcional e Molecular.

Campinas, 06 de Fevereiro de 2007

**BANCA EXAMINADORA**

Prof. Dr. Sérgio Marangoni (Orientador)

  
Assinatura

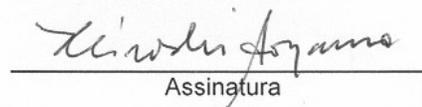
Prof. Dr. Marcos Hikari Toyama

  
Assinatura

Profa. Dra. Daniela Diógenes de Carvalho

\_\_\_\_\_  
Assinatura

Prof. Dr. Hiroshi Aoyama

  
Assinatura

Profa. Dra. Lea Rodrigues Simioni

\_\_\_\_\_  
Assinatura

## Agradecimentos

A Deus, por Adão e Eva e pela Serpente.

A Universidade Estadual de Campinas, pela formação e oportunidade, em especial ao instituto de Biologia e ao Departamento de Bioquímica.

A Capes pelo apoio financeiro.

Ao Professor Sergio Marangoni, pela oportunidade e confiança.

Aos meus Pais, Eduardo e Eliana, aos meus Irmãos Ana Carolina e Gustavo e a meus Familiares, pelo apoio durante todo o período, que estive longe.

Aos meus Amigos do Laquip, Paulinho, Fabio, Vera, Frey, Daniela, Andrana, Vitor, Simone, sempre me deram força e principalmente estavam presentes para conversar fiado.

Aos meus amigos de republica e afins, Gabriel, Janaina, Edy, Luis, Mauricio, Roberta, Bruno, Cássio, Lucas, Rubens, Paula, Luciana, Dalila, Stefan, Carolina que sempre me deram força e tinham tempo para fazer churrasco no meio da semana.

Muito Obrigado

# ÍNDICE

<b>ABREVIACÕES</b>	<b>VII</b>
<b>ABREVIACÕES PARA AMINOÁCIDO</b>	<b>VIII</b>
<b>RESUMO</b>	<b>IX</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>XI</b>
<b>1 INTRODUÇÃO</b>	<b>13</b>
1.1 CARACTERÍSTICAS GERAIS DOS ACIDENTES OFÍDICOS	13
1.2 EPIDEMIOLOGIA.	13
1.3 CROTALUS DURISSUS	17
1.3.1 CROTALUS DURISSUS CUMANENSIS	19
1.3.2 CROTALUS DURISSUS RURUIMA	21
1.4 O VENENO – CARACTERÍSTICAS GERAIS	23
1.4.1 COMPONENTES PROTÉICOS	24
1.4.2 COMPONENTES NÃO PROTÉICOS	26
1.5 O VENENO CROTÁLICO	26
1.5.1 CROTAMINA.	27
1.5.2 CONVULXINA	27
1.5.3 GIROXINA	28
1.5.4 CROTACETINA	28
1.5.5 CROTOXINA.	29
1.6 CROTAPOTINA	32
1.7 FOSFOLIPASE A <sub>2</sub>	33
1.8 CLASSIFICAÇÃO DAS FOSFOLIPASES.	39
1.9 ESTRUTURA E FUNÇÃO DAS FOSFOLIPASES A <sub>2</sub>	41
1.10 FOSFOLIPASES A <sub>2</sub> LYS 49 (CATALITICAMENTE NÃO ATIVAS).	46
<b>2 OBJETIVOS</b>	<b>49</b>
2.1 GERAIS	49
2.2 ESPECÍFICOS.	49
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>50</b>
3.1 ANIMAIS	50
3.2 VENENOS E REAGENTES	50
3.3 PURIFICAÇÃO DO VENENO	50
3.3.1 CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO MOLECULAR EM HPLC	50
3.3.2 CROMATOGRAFIA DE FASE REVERSA EM HPLC	51
3.3.3 ELETROFORESE EM PAGE-SDS	52
3.3.4 ANÁLISE POR ESPECTROMETRIA DE MASSA DE TIPO MALDI-TOF (MS).	53
3.4 CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA	53
3.4.1 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE PLA <sub>2</sub>	53
3.4.2 ANÁLISE DE AMINOÁCIDOS	54
3.4.3 DETERMINAÇÃO DA SEQÜÊNCIA N-TERMINAL	54
3.5 ATIVIDADE FARMACOLÓGICA	56

3.5.1	MEDIDA DA ATIVIDADE NEUROTÓXICA EM NERVO FRÊNICO-DIAFRAGMA DE CAMUNDONGO	56
3.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA	57
<b>4</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>58</b>
4.1	CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO MOLECULAR DOS VENENOS DE C.D.R E C.D.C. EM HPLC (PROTEIN PACK SW 300).	58
4.2	ANÁLISE DO VENENO TOTAL EM HPLC DE FASE REVERSA.	62
4.3	ISOLAMENTO DAS FOSFOLIPASES A2 (PLA2) E CROTAPOTINAS (CRTP).	65
4.4	ELETROFORESE EM PAGE-SDS	69
4.5	ESPECTROMETRIA DE MASSA.	73
4.6	ANÁLISE COMPARATIVA DA ATIVIDADE FOSFOLIPÁSICA A2 NOS VENENOS DE C.D.R E C.D.C.	77
4.7	ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO DE AMINOÁCIDOS DAS PLA2 DOS VENENOS DE C.D.R E C.D.C.	81
4.8	ALINHAMENTO DA SEQÜÊNCIA DE AMINOÁCIDOS DAS PLA2 DOS VENENOS DE C.D.R E C.D.C. COM OUTRAS PLA2.	82
4.9	ANÁLISE FILOGENÉTICA DAS PLA2 DOS VENENOS DE C.D.R E C.D.C., EM COMPARAÇÃO COM OUTRA PLA2.	83
4.10	ANÁLISE POR DICROÍSMO CIRCULAR	85
4.11	ATIVIDADE NEUROTÓXICA DOS VENENOS E CROTOXINAS DE C.D.R E C.D.C.	88
<b>5.</b>	<b>DISCUSSÃO</b>	<b>92</b>
<b>5</b>	<b>CONCLUSÃO</b>	<b>100</b>
<b>6</b>	<b>BIBLIOGRAFIA</b>	<b>103</b>

## Abreviações

PLA 2 - Fosfolipase A2

pBPB - Brometo de Bromofenacil

NOBA - Acido 4-nitro-3-(octanoiloxi) benzóico

Tris – Tris[Hidroximetil]aminometano

TFA – Ácido Trifluoracético

TEMED – N-N-N'-N'-Tetrametiletilenoamina

SDS – Dodecil Sulfato de Sódio, Lauril Sulfato de Sódio

PAGE – Eletroforese em gel de Poliacrilamida

HPLC – High Pressure Liquid Chromatography

kDa – Kilo Daltons

C-18 – 18 High Carbon Load, High activity silica

u-Bondapak – Coluna de HPLC com n-octadecyl como base da fase estacionaria.

CRTX - Crotoxina

GYR - Giroxina

CTN - Crotacetina

CVX - Convulxina

CROT - Crotamina

CRTP - Crotapotina

C.d.c. - *Crotalus durissus cumanensis*

C.d.r. - *Crotalus durissus ruruima*

C.d.t. – *Crotalus durissus terrificus*

## Abreviações para aminoácidos

AMINOÁCIDOS	ABREVIÇÕES (TRÊS LETRAS)	SÍMBOLO
Alanina	Ala	A
Arginina	Arg	R
Asparagina	Asn	N
Ácido aspártico	Asp	D
Cisteína	Cys	C
Glutamina	Gln	Q
Ácido glutâmico	Glu	E
Glicina	Gly	G
Histidina	Hys	H
Isoleucina	Iso	I
Leucina	Leu	L
Lisina	Lys	K
Metionina	Met	M
Fenilalanina	Phe	F
Prolina	Pro	P
Serina	Ser	S
Treonina	Thr	T
Triptofano	Trp	W
Tirosina	Tyr	Y
Valina	Val	V

## Resumo

Na região norte do Brasil a serpente *Crotalus durissus ruruima* (C.d.r) é responsável por diversos casos de acidentes ofídicos, e é principalmente encontrada próxima à fronteira com a Venezuela e Colômbia. Contudo a *Crotalus durissus cumanensis* (C.d.c). é outra serpente bastante comum no sul da Venezuela próximo a fronteira com o Brasil. Ambas as serpentes são encontradas na região equatorial da América do Sul e ambos os venenos mostraram diferenças significativas em suas composições, se comparadas com a *Crotalus durissus terrificus* (C.d.t.).

A crotoxina é a principal toxina, e responsável pelos principais efeitos toxicológicos do veneno de C.d.t.. O objetivo principal desta dissertação foi o de isolar e caracterizar isoformas de PLA2s isoladas de ambos os venenos e caracterizar farmacológica e bioquimicamente estas PLA2s e outras toxinas.

A análise comparativa do veneno total de C.d.r. mostrou uma presença sutil de convulxina e giroxina, enquanto a análise da C.d.c. revelou ausência de convulxina no veneno. Além disso, ambos demonstraram significativas diferenças para a atividade de PLA2. A análise de cada crotoxina isolada de C.d.r. ou de C.d.c. também revelou significativa variação em comparação com a C.d.t. Neste trabalho nos isolamos duas novas isoformas de PLA2 de C.d.r. e C.d.c.. Ambas as proteínas foram caracterizadas como básicas e ambas demonstram massa molecular de aproximadamente 14 kDa.

Em dicroísmo circular ambas as proteínas demonstraram a presença de alta quantidade de alfa hélice, contudo foi encontrada uma pequena diferença para a

quantidade de folha Beta e cadeias randômicas. Estes resultados sugerem que a diferença estrutural entre estas proteínas, corrobora com os resultados da análise de seqüência N-terminal e a análise filogenética.

Além das diferenças bioquímicas encontradas para os dois venenos, para a crotoxina, PLA2 e crotapotina, nos observamos que o veneno e a crotoxina isolada da C.d.c. exibiram alta atividade neurotóxica em preparação de músculo nervo frênico-diafragma de camundongo, enquanto o veneno e a crotoxina de C.d.r. não.

Logo nos concluimos que ambos os venenos mostraram diferenças em suas propriedades bioquímicas e farmacológicas, entre os dois venenos e estes em comparação com a *C. d. terrificus* e *C. d. collilineatus*. Ambas as isoformas de PLA2 demonstraram algumas similaridades estruturais em alguns aspectos, mas nos observamos algumas poucas diferenças que provavelmente estão associadas com as diferenças farmacológicas e enzimáticas encontradas entre as isoformas de PLA2 isoladas de C.d.r. e C.d.c..

## Abstract

In the north region of Brazil the *Crotalus durissus ruruima* (C.d.r.) is responsible for several snake bit cases and mainly found in the region near the Venezuela and Colombia. Although the *Crotalus durissus cumanensis* (C.d.c.) is other wide spread rattlesnake in south Venezuela frontier. Both snakes are only found in the equatorial region of South America and both venoms showed significative difference in the composition if compared to *Crotalus durissus terrificus* (C.d.t).

The crotoxin is the principal toxin and responsible for the main toxicology effect of the *Crotalus durissus terrificus* venom. The main focus of the thesis was isolation and characterization of the PLA2 isoforms isolated from the both venom and characterized the pharmacological and biochemical characterization PLA2 and other toxins.

The comparative analysis of whole venom of C.d.r. showed the marginal presence of convulxin and gyroxin while the analysis of the C.d.c. the convulxin was absent in the venom. Beyond this, both also showed significative differences for the PLA2 activity. The analysis of the each crotoxin isolated from the C.d.r. or C.d.c. also showed significant variation in comparison with C.d.t. In this work we isolated two new isoforms of PLA2 from the C.d.r. and C.d.c. Both proteins were characterized as basic protein and both showed a molecular mass around 14 kDa.

In the circular dichroism, both proteins showed the presence of high content of alpha helix although they found slights differences for the beta sheets or random coil.

These results suggest the structural difference of both proteins that were corroborated by the N-terminal sequence analysis and by phylogenetic analysis.

Beside the biochemical differences found for both venom, crotoxins, PLA2 and crotopotins, we observed the venom and Crotoxins isolated from the C.d.c. exhibited higher neurotoxic activity on the phrenic nerve diaphragm preparation while the venom and crotoxin isolated from the C.d.r. was not.

Thus we conclude that both venoms showed differences at biochemical and pharmacological properties between both venom and these in comparison with C.d. terrificus or C.d. collilineatus. Both PLA2 isoforms showed some similar structural aspects but we observed some slight different that probably were associated with the pharmacological and enzymatical differences found for both PLA2 isolated from the C.d. c. and C.d.r.

# **1 INTRODUÇÃO**

## **1.1 *Características gerais dos acidentes ofídicos***

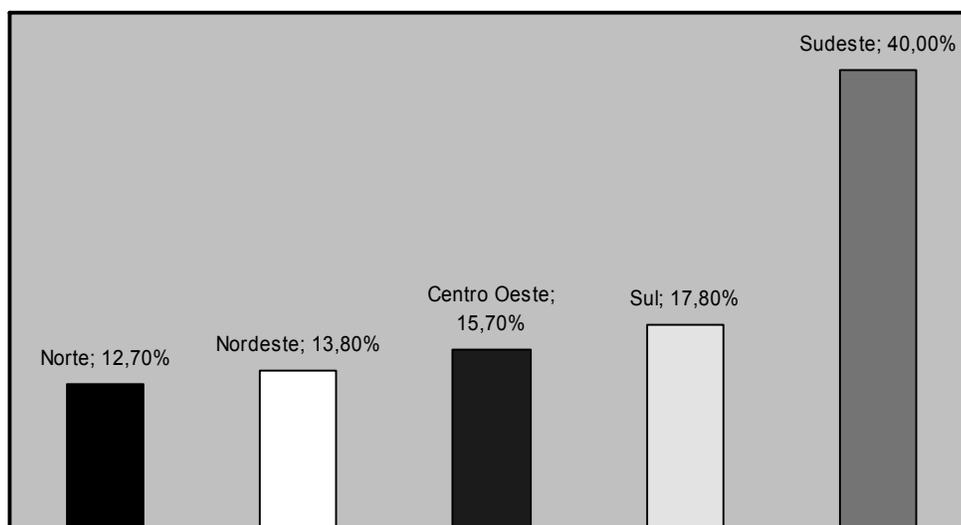
Em nível mundial, o envenenamento por serpentes é um problema maior na Ásia e nas regiões da América Latina, como é o caso das ilhas do Caribe. A exatidão do número de casos é discutível, como fica ilustrado em um estudo dos anos 50, que sugere uma mortandade anual de 25 a 30 mil pessoas no mundo. No entanto, estes dados parecem não representar a real magnitude do problema, pois acredita-se que a mortandade anual apenas na Ásia chegue a ser de até 100 mil pessoas (Rodriguez-Acosta, A. 2001).

Com exceção de locais muito frios, de algumas altitudes e dos círculos polares, as serpentes habitam praticamente todas as regiões do planeta e são divididas em quatro grandes famílias: Hydrophidae, Elapidae, Viperidae e Crotalidae (Matsui et al., 2000). Segundo Barraviera (1994) o Brasil possui aproximadamente 250 espécies de serpentes, das quais cerca de 70 são venenosas e destas 32 pertencem ao gênero *Bothrops* da família Viperidae, seis ao gênero *Crotalus* da família Crotalidae, dois ao gênero *Lachesis* da família Crotalidae e 29 ao gênero *Micrurus* da família Elapidae.

## **1.2 *Epidemiologia.***

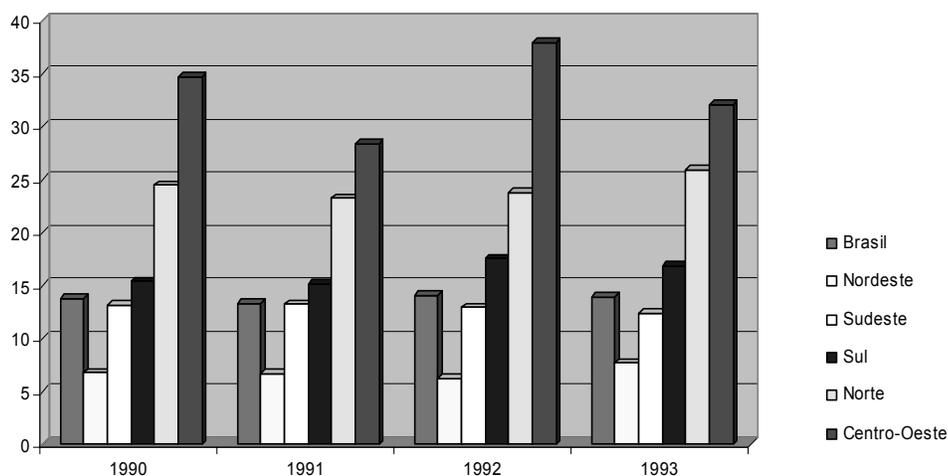
No Brasil no período de janeiro de 1990 a dezembro de 1993 foram notificados a Fundação Nacional de Saúde – Ministério da Saúde (FUNASA - Ministério da Saúde)

81.611 casos de acidentes por serpentes, o que representa aproximadamente 20.000 casos / ano no país (Quadro 1).



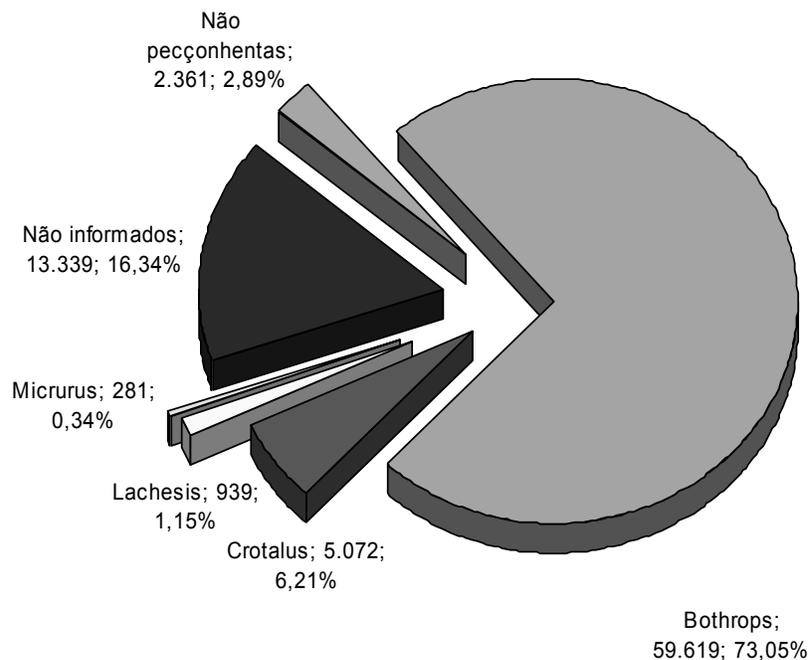
Quadro 1 Procedência das notificações segundo as regiões fisiográficas Brasil, 1990 – 1993 (FUNASA 2001)

A maioria das notificações procedeu das regiões Sudeste e Sul, como mostra o quadro 2. Estas são regiões as mais populosas do país e as que contam com melhor organização de serviços de saúde e sistema de informação, para a obtenção dos dados coletados.



Quadro 2 Coeficiente de incidência anual (por 100.000 habitantes) dos acidentes ofídicos por região fisiográfica - 1990 a 1993 (FUNASA 2001)

Em 84% das 81.611 notificações analisadas o gênero da serpente envolvida é conhecido e em 16,34% não foi informado. A distribuição dos 65.911 casos de acidentes por serpente peçonhenta, de acordo com o gênero da serpente envolvida, quando esta variável foi referida, pode ser observada na Quadro 3.



Quadro 3 Distribuição dos acidentes ofídicos, segundo o gênero da serpente envolvido Brasil, 1990 – 1993 (FUNASA 2001).

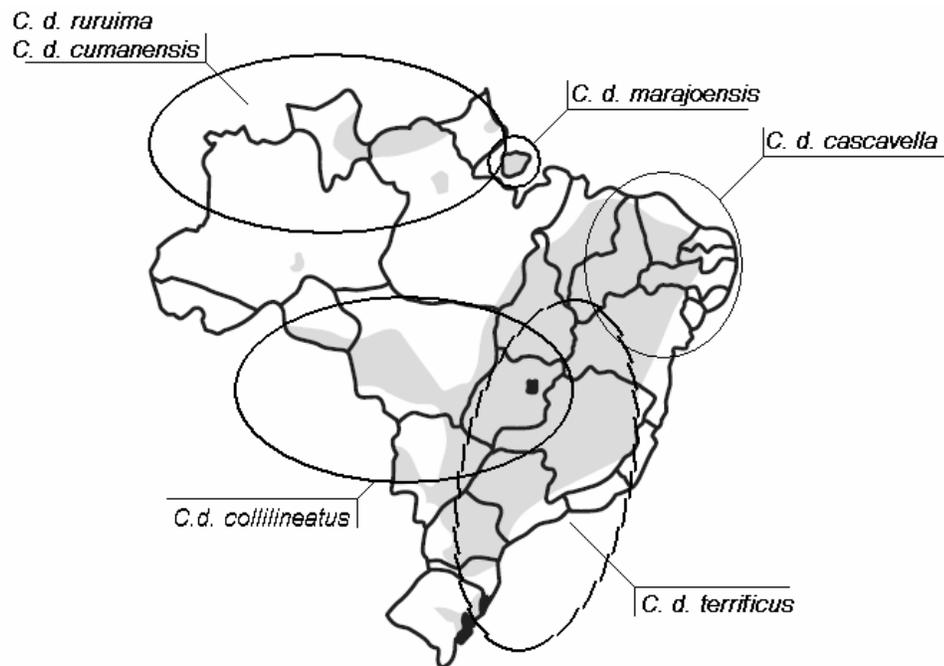
Estatisticamente o veneno Bothrópico é o que se apresenta com os maiores números de notificações em âmbito nacional, contudo se for colocado estatísticas de notificações em algumas regiões particularizadas como no caso da região de Ribeirão Preto ou de Botucatu, o acidente crotálico aparece em segundo lugar, mas com uma porcentagem de notificações próximas 6% ao ano. Mesmo a nível nacional, o acidente botrópico em letalidade representa apenas 0.31% de letalidade, já o veneno crotálico pode, pelas análises epidemiológicas, ser considerado o mais importante (Quadro 4).

<b>Gênero</b>	<b>n° Casos</b>	<b>n° Óbitos</b>	<b>Letalidade (%)</b>
<i>Bothrops</i>	119.238	369	0,31
<i>Crotalus</i>	10.143	189	1,87
<i>Lachesis</i>	1878	18	0,95
<i>Micrurus</i>	558	6	0,36
Não informado	26.678	138	0,52
<b>Total</b>	<b>158.495</b>	<b>720</b>	<b>0,45</b>

Quadro 4. Letalidade dos acidentes ofídicos, divididos por gênero.

### 1.3 *Crotalus durissus*

Do ponto de vista médico sanitário, são quatro os gêneros de serpentes peçonhentas do Brasil: *Bothrops*, *Crotalus*, *Lachesis*, da família Viperidae e *Micrurus*, da família Elapidae. No Brasil ocorre uma única espécie de cascavel, também conhecida como cascavelha, boicininga, maracabóia ou cascavella, a qual é denominada de *Crotalus durissus ssp.* Esta espécie e suas subespécies distribuem-se desde o sul do México até o Brasil e Paraguai, com interrupções zoogeográficas no Panamá e ao norte do Brasil. As cascavéis medem aproximadamente 1,80 metros e se alimentam principalmente de mamíferos e outros répteis menores (Janzen Daniel, 1991).



Quadro 5. Distribuição das principais subespécies de cascavéis no território brasileiro.

No Brasil já foram identificadas algumas subespécies de *Crotalus durissus* (Quadro 5):

1) *Crotalus durissus terrificus*.- Encontrada em regiões altas e secas do Brasil, desde Minas Gerais até o Rio Grande do Sul.

2) *Crotalus durissus collilineatus* - Distribuída nas regiões secas da zona Centro-Oeste do Brasil desde o Mato Grosso do Sul, Goiás, Minas Gerais até o Norte do Estado de São Paulo.

3) *Crotalus durissus cascavella*.- é encontrada nas áreas de caatinga do Nordeste do Brasil, desde o Maranhão até o norte do estado de Minas Gerais.

4) *Crotalus durissus marajoensis*.- Encontrada na Ilha de Marajó e em toda América Equatorial.

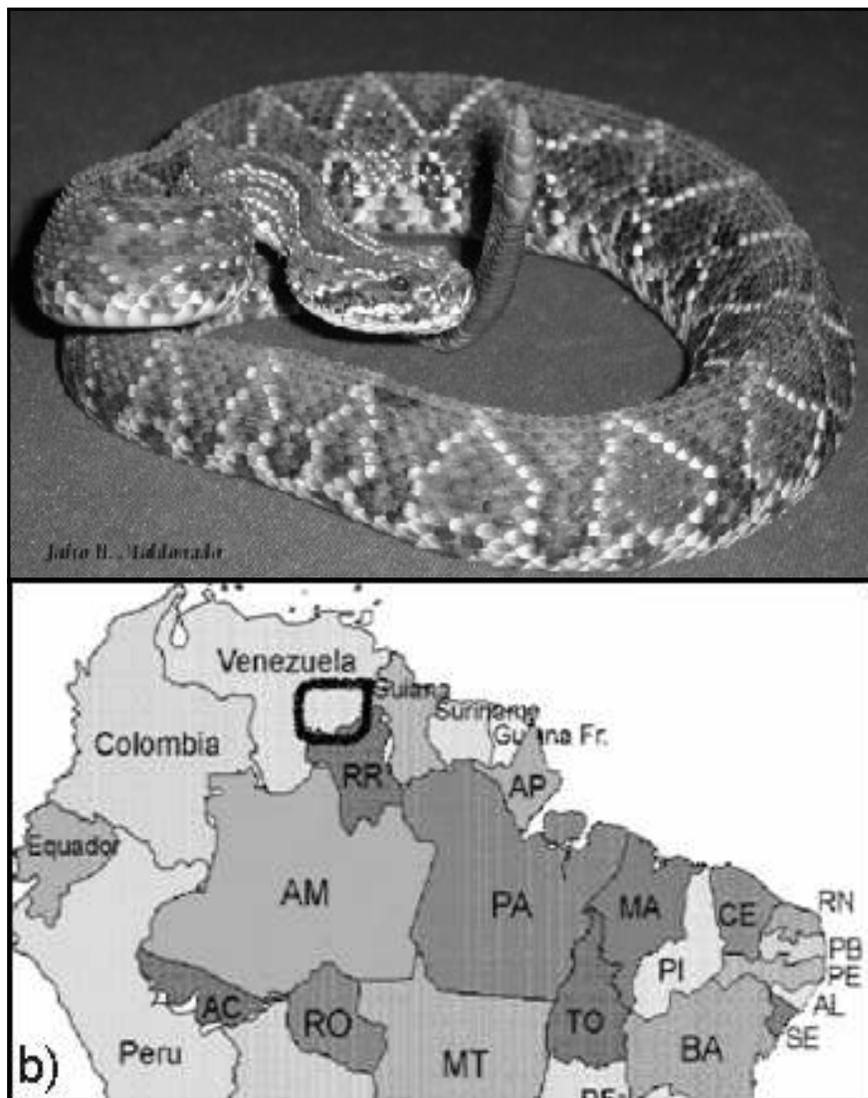
5) *Crotalus durissus trigonicus*.- Encontrada em Roraima.

6) *Crotalus durissus cumanensis* – Amplamente distribuída na vegetação de cerrado da Venezuela e no extremo norte do estado de Roraima.

7) *Crotalus durissus ruruima*.- Distribuída em algumas regiões de Roraima, Amapá, Pará, Amazonas e Rondônia, bem como na América Equatorial.

### **1.3.1 *Crotalus durissus cumanensis***

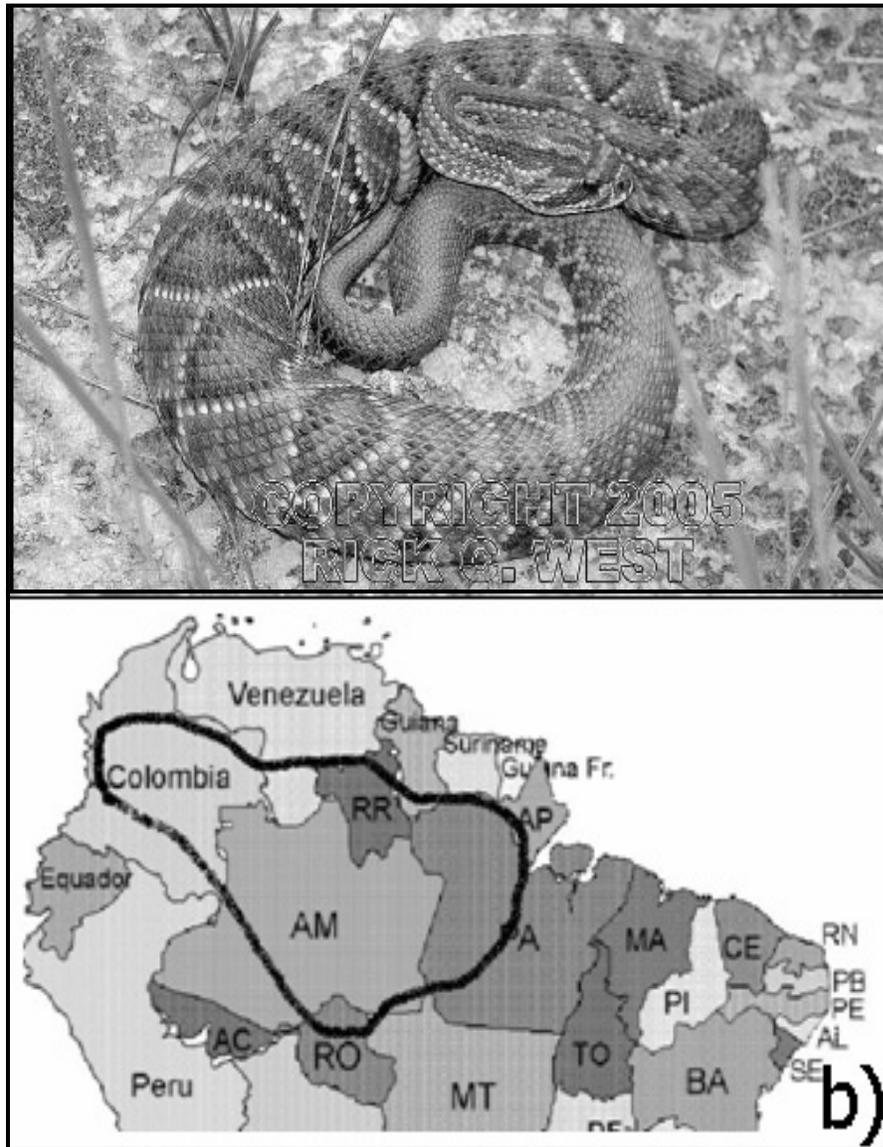
A serpente *Crotalus durissus cumanensis* (Quadro 6a) foi originalmente descrita como *Crotalus cumanensis* e depois como *Crotalus durissus terrificus*, e foi somente em 1965 que Hoge a designou como uma subespécie válida. (O. Grilo Rodrigues, et al 1974). Esta confusão se deve provavelmente a suas particularidades morfométricas e também pelo ecossistema em que estas serpentes são encontradas. A *C. d. cumanensis* é uma das espécies mais comuns na Venezuela e responsável por um grande número de acidentes. (Roze, 1996) (Quadro 6b). Seu veneno é composto principalmente por um complexo protéico de atividade neurotóxica denominado crotoxina, além de possuir atividade hemolítica, proteolítica, esterolítica e miotóxica. Embora seja uma serpente endêmica da Venezuela existe uma região de contato com uma espécie brasileira chamada *Crotalus durissus ruruima*, encontrada no estado de Roraima (Rodriguez e Scannone 1996).



Quadro 6. Em 6a é mostrado a foto de um exemplar adulto de *C.d. cumanensis* e sua localização mais provável (6b).

### **1.3.2 *Crotalus durissus ruruima***

A serpente *Crotalus durissus ruruima*, também descrita por Hoge em 1965, é encontrada em uma região de cerrado ao extremo sul da Venezuela e em terras cultivadas do norte do estado de Roraima (Hoge e Romano, 1972)(Quadro 7). Dados do ministério da saúde do Brasil mostram que 30% dos acidentes crotálicos do Brasil ocorrem no estado de Roraima. Assim como a *Crotalus durissus terrificus*, a espécie *Crotalus durissus ruruima* tem mostrado dois tipos de venenos, uma de coloração amarela e a outra branca, trazendo como consequência diferenças bioquímicas, e biológicas, quando comparado com o veneno de *Crotalus durissus terrificus*, estes dois tipos de veneno podem ser produzidos por um único animal (Dos Santos M. C., *et al.*, 1993).



Quadro 7. Em 7a temos a vista da *C. d. ruruima* e sua região de prevalência (7b)

#### **1.4 O veneno – Características gerais**

Aproximadamente 90 a 95% do peso seco do veneno de serpentes é constituído por proteínas, as quais apresentam importantes funções biológicas quando comparadas com a fração não protéica (Tu, 1982). A fração não protéica é constituída por sais, carboidratos, íons, lipídios e outros. (Tu, 1977). Esta mistura de toxinas e enzimas tem evoluído para ajudar tanto na captura quanto na digestão da presa, assim como para o uso na defesa contra os predadores (Meier e Stocker, 1995).

Ainda não é conhecido com exatidão o mecanismo de ação do veneno, contudo, com relação à patogênese decorrida da ação do veneno, acredita-se que estes efeitos são combinatórios e multi-fatoriais. (Gutierrez, J.M. e Lomonte, B. 2003).

Segundo Varanda & Giannini (1994), os venenos de serpentes são ricos em substâncias farmacologicamente e bioquimicamente ativas. Sua composição química varia de espécie para espécie e sua ação depende da natureza dos elementos presentes no veneno e da interação biológica entre estes elementos. Segundo Daltry et al. (1996), serpentes da mesma espécie podem diferir na composição do veneno devido a uma pressão seletiva do ambiente em que se encontram e a diversidade de animais disponíveis para sua alimentação.

Embora serpentes da mesma espécie possam diferir na composição do veneno, seus componentes parecem ter proporções comuns e similares dentro de uma mesma família, isto é, neurotoxinas (que agem sobre o sistema nervoso) são geralmente encontradas no veneno das famílias Hydrophidae e Elapidae, enquanto que toxinas

hemorrágicas e mionecróticas são encontradas no veneno das Crotalidae e Viperidae (Matsui et al., 2000).

Sendo a composição química das peçonhas tão complexa, as lesões produzidas por elas dependem da natureza desses elementos e da interação biológica de cada um deles, também contribui para o envenenamento, outros fatores como infecções secundárias, por exemplo, mesmo o estado clínico do paciente ou ainda os tratamentos fitoterápicos em uso pela medicina popular. Por essa razão, alguns venenos são considerados principalmente neurotóxicos, como são os casos da *Micrurus ssp*, outros caracterizam-se por fortes efeitos vasculares, como o veneno da *Bothrops jararaca*, ou miotóxicos, citando como exemplo a *Bothrops jararacussu*.

#### **1.4.1 Componentes protéicos**

Em relação à porção protéica do veneno das serpentes, sabe-se que sua constituição é majoritariamente formada por enzimas de natureza hidrolítica tais como:

1) Oxirredutases.

Basicamente são encontrados dois tipos destas enzimas no veneno total das serpentes, a L-aminoácidos oxidase que convertem o aminoácido livre a um alfa-cetoácido (Meister, 1965; Mebs, 1970) e a lactato desidrogenase, que é responsável pela catálise da reação de conversão do lactato a ácido pirúvico (McClean, et al., 1971).

2) Fosfatases.

Fosfatases são enzimas que quebram ligações fosfomonoéster e fosfodiésteres, sendo que as fosfodiesterases são as mais conhecidas e muito utilizadas como ferramenta no sequenciamento ou caracterização de oligonucleotídeos e polinucleotídeos (Lasckowski, 1971).

### 3) Glicosidases

A hialuronidase é um exemplo de glicosidade, sendo a primeira uma enzima capaz de catalisar a reação de hidrólise do ácido hialurônico, facilitando a difusão das toxinas do veneno para dentro do tecido das vítimas. Este ácido hialurônico é um mucopolissacarídeo, encontrado na pele, nos tendões. (Meyer et al, 1960).

### 4) Proteases

Existe um grande número de proteases encontradas no veneno, quase todas dependentes de cofatores como íons metálicos (cálcio e magnésio). As proteases podem ser classificadas em dois grandes grupos: as exopeptidases e as endopeptidases (Iwanaga et al., 1976).

### 5) Lipases

O veneno também possui várias enzimas lipolíticas, tais como as fosfolipases e as acetilcolinesterases. As fosfolipases A<sub>2</sub> são as lipases mais estudadas devido a sua importância biológica. (Tu, 1977).

#### **1.4.2 Componentes não protéicos**

Além das enzimas hidrolíticas o veneno total possui também outras moléculas de importância biológica sem atividade enzimática como as desintegrinas, lectinas, potencializadores de bradicinina, precipitados natriureticos. A porção não protéica do veneno de serpentes é constituída por compostos orgânicos e inorgânicos.

##### **1) Orgânicos**

Os compostos orgânicos são constituídos por aminoácidos livres, lipídios, açúcares, nucleotídeos e aminas biogênicas. (Sasaki, 1960; Shipolini et al., 1965).

##### **2) Inorgânicos**

No veneno total encontram-se vários tipos de íons, sendo o cálcio, o magnésio e o zinco os principais. Estes íons são importantes cofatores de várias enzimas, tais como as metaloproteases (dependentes do zinco e magnésio), as fosfolipases A<sub>2</sub> (dependentes do Ca<sup>+2</sup>) e as proteínas trombina-like (dependentes de Mg<sup>+2</sup>) (Tu, 1977; Jia et al., 1996).

#### **1.5 O veneno Crotálico**

Em 1938 Freankel e Conrat, pela primeira vez isolaram a partir do veneno da *Crotalus durissus terrificus* uma fração por técnicas de precipitação com sulfato de amônio, uma proteína denominada de crotoxina, posteriormente outras frações

passaram a ser isoladas e purificadas. Posteriormente vários autores durante as décadas de 60 e 70 isolaram os demais componentes do veneno total.

### **1.5.1 Crotamina.**

Esta fração isolada do veneno total da cascavel é uma proteína neurotóxica de baixo peso molecular, de caráter básico, integralmente caracterizada pela primeira vez por Gonçalves e Vieira, (1950) no Brasil. Foi uma das primeiras toxinas isoladas do veneno total de *Crotalus durissus terrificus* a ser seqüenciada completamente por Laure (1975). Seus efeitos farmacológicos analisados e caracterizados por Vital Brazil e colaboradores em 1979 (Brazil et al., 1979).

### **1.5.2 Convulxina**

Esta lectina tipo C símile foi caracterizada por induzir convulsões e distúrbios respiratórios e circulatórios, é uma toxina de alta massa molecular, que se comporta como uma proteína homogênea. (Prado-Franceschi, J. e Vital Brazil O. 1981). Apesar de sua similaridade estrutural com outras lectinas tipo C multiméricas de outras serpentes, esta proteína não é capaz de hemaglutinação de eritrócitos, mas possui capacidade de interação com receptores protéicos específicos, mas que podem contribuir para, por exemplo, aumento da secreção de insulina via ativação de quinases e que podem induzir outros efeitos farmacológicos como a toxicidade renal (Toyama et al., 2001 e Martins et al., 2002).

### **1.5.3 Giroxina**

Esta fração protéica é farmacológica e bioquimicamente pouco conhecida, produz uma síndrome convulsiva, em condições experimentais em camundongos. A primeira descrição do isolamento da giroxina foi feita por Seki et al., (1980), sendo posteriormente o processo de fracionamento modificado por Alexander et al., (1988) que foram os primeiros a caracterizar a sua atividade trombina likesímile desta fração. Além deste componente trombina like, recentemente Fonseca et al., (2006) isolaram da giroxina da *Crotalus durissus cascavella* uma proteínas com atividade L-amino-oxidásica com forte atividade sobre a agregação plaquetária.

### **1.5.4 Crotacetina**

A crotacetina é uma outra lectina tipo C, que apresenta uma homologia seqüencial muito próxima a da convulxina. Foi isolada e caracterizada por Radis-Baptista et al., (2006), que mostraram que esta proteína diferentemente da convulxina, apresenta uma atividade hemaglutinante e antibacteriana. Esta toxina aparentemente parece ser um produto derivado da biossíntese da convulxina e que é isolada junto com a convulxina por processos convencionais de fracionamento em Sephadex G 75, mas que podem ser separadas por colunas de exclusão molecular realizadas sobre matrizes de sílica ou poliestirenos de alta resistência (Protein Pack 300SW).

### 1.5.5 Crotoxina.

Esta proteína é a principal neurotoxina encontrada no veneno total da cascavel *Crotalus durissus terrificus*, representa aproximadamente 50% do peso seco do veneno total e foi a primeira neurotoxina a ser purificada e analisada em 1938 por Fraenkel-Conrat. A crotoxina é a responsável pela alta toxicidade do veneno, atuando nas terminações nervosas, respondendo pelas paralisias motoras e respiratórias, em condições experimentais.

Além destas atividades, a crotoxina bem como o veneno total tem um efeito inibitório sobre a resposta humoral e não sobre a resposta celular sugerindo que o veneno de *Crotalus durissus terrificus* e seus componentes tóxicos principais, possam ter um efeito supressivo da resposta humoral. Esta seria modulada através de seu efeito sobre os macrófagos que podem causar diminuição dos níveis de anticorpos. Não se conhecem os mecanismos envolvidos na atividade imunossupressora do veneno de *Crotalus durissus terrificus* ou da crotoxina (Rangel-Santos, A. C., e Mota, I. 2000).

Esta proteína é um heterodímero composto por duas diferentes subunidades: uma fosfolipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) (componente básico) com uma massa molecular de 14,5 kDa e um componente denominado crotapotina, (componente ácido) com uma massa molecular de 9 kDa. (Bon et al., 1979).

A crotoxina é o componente majoritário encontrado no veneno total de *Crotalus durissus sp.* Segundo Breithaupt (1976) e Bon et al. (1979), a crotoxina, do ponto de vista farmacológico e fisiológico, possui dois tipos de ações: uma pré-sináptica (Bon et

al., 1979, Hawgood e Santana de Sá, 1979) e uma pós-sináptica (Hawgood e Santana de Sá 1979 e Bon et al., 1979) ela pode inibir a transmissão axônica afetando fortemente o fluxo normal de íons Na<sup>+</sup> e K<sup>+</sup> ao longo da ação.

O efeito da crotoxina na transmissão pré-sináptica causa uma modificação trifásica na liberação de neurotransmissores das terminações nervosas motoras. Esta modificação trifásica é caracterizada por uma depressão fugaz na liberação de acetilcolina seguida de um ligeiro aumento que precede o bloqueio irreversível da transmissão neuromuscular (Chang e Su 1982).

Os efeitos da crotoxina em nível pós-sináptico, caracteriza-se pelo bloqueio da resposta da acetilcolina através de uma estabilização do receptor de acetilcolina de um estado conformacional inativo (Bon, et al., 1979). Com isso, impede a transmissão do estímulo nervoso para o músculo se contrair. Elas causam morte por falência respiratória, sendo a ptose palpebral um dos primeiros sinais da ação do veneno.

Sabe-se, porém que as metodologias utilizadas para purificação destas neurotoxinas não conseguem distinguir diferentes isoformas presentes no próprio veneno. De fato a crotoxina, que é a principal toxina no veneno de *Crotalus durissus terrificus*, pode possuir até 16 diferentes isoformas, com diferentes graus de potência quanto à sua toxicidade (Faure e Bon, 1987).

A Crotoxina apresenta várias isoformas que são consequência, muitas vezes da alteração de um único aminoácido (Faure e Bom 1987). A multiplicidade e a diversidade destas isoformas de crotoxina parecem ser resultado de:

- Modificação pós-transducional que ocorre sobre uma única forma do transcrito primário levando a formação de isoformas de crotapotina (Bouchier et al., 1991).
- A expressão de diferentes RNAs mensageiros, levando a formação de isoformas de PLA2 ( Faure et al., 1994). A crotoxina, principal neurotoxina, pertence a classe das  $\beta$ -neurotoxinas, da serpente de *Crotalus durissus terrificus*, possui várias isoformas, que podem ser, na verdade, combinações das subunidades de crotapotina e fosfolipase A<sub>2</sub>.

A crotoxina é uma proteína heterogênea. Várias isoformas já foram isoladas do veneno de uma única serpente e resultam da associação de várias isoformas de duas subunidades (Faure e Bom 1988). O grande problema para o estudo desta neurotoxina é se obter um material com alto grau de homogeneidade molecular, que sirva para o estudo tanto da ação isolada do complexo crotapotina-fosfolipase, bem como da atividade biológica de suas subunidades.

A crotoxina ligaria ao receptor, formando, portanto um complexo ternário, depois do qual, uma mudança conformacional ocorreria induzindo a dissociação da crotapotina (DELOT E BON, 1993). Além de ter um efeito neurotóxico, a crotoxina é também miotóxica, afetando diretamente as células do músculo esquelético (GOPALAKRISHNAKONE et al.,1981). A toxicidade ao músculo esquelético foi demonstrada in vivo por GOPALAKRISHNAKONE et al. (1984).

## 1.6 Crotapotina

A crotapotina foi inicialmente descrita como uma molécula “chaperone” das Fosfolipases A<sub>2</sub> de *Crotalus durissus terrificus*. A crotapotina potencializa a toxicidade da PLA<sub>2</sub> (Bon, et al., 1979); e este fenômeno de potencialização é interpretado como um fenômeno farmacocinético, onde o componente ácido pode proteger a fosfolipase A<sub>2</sub> da inativação por ligação a sítios de baixa afinidade. No entanto, a crotapotina inibe a atividade enzimática da PLA<sub>2</sub>. (Laure, 1990). Além deste efeito, a crotapotina isolada do veneno total de *Crotalus durissus terrificus* também possui uma atividade antiinflamatória. Inibindo a atividade inflamatória não somente da PLA<sub>2</sub> de *C. d. terrificus*, mas outras PLA<sub>2</sub> de outros venenos (Landucci et al., 1995). Câmara e colaboradores (Câmara et al., 2003), mostraram que a crotapotina de *C.d. terrificus* não induziu qualquer tipo de alteração em edema de pele, mas já uma das crotapotinas isoladas do veneno total de *Crotalus durissus cascavella* (*C. d. cascavella*) e *Crotalus durissus collilineatus* (*C. d. collilineatus*) mostraram serem capazes de induzir um edema agudo e discreto se comparado ao das PLA<sub>2</sub> isoladas. Oliveira et al., (2003), usando a crotapotina de *C.d. cascavella* mostraram uma discreta atividade antibacteriana e nefrotóxica e Garcia et al., (2003) mostraram que a crotapotina, foi capazes de induzir uma modificação na proliferação celular de linfócitos via mediação da síntese de prostaglandinas PG<sub>2</sub> pela crotapotina de *C. d. collilineatus*. E, recentemente tem sido evidenciado que a crotapotina de *Crotalus durissus terrificus* é capaz de inibir em até 54% o efeito inflamatório e miotóxico de várias PLA<sub>2</sub> de origem botrópico, tais como: Bothropstoxina-I (BthTX-I) e Bothropstoxina-II (BthTX-II), de

*Bothrops jararacussu*; Pirotoxina-I (PrTX-I) e Pirotoxina-III (PrTX-II), de *Bothrops pirajai* e Moojenitoxina-II (MjTX-II), de *Bothrops moojeni* (Cecchini et al., 2004).

### **1.7 Fosfolipase A<sub>2</sub>**

As fosfolipases A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) são enzimas amplamente distribuídas na natureza, podendo ser encontradas em bactérias, plantas, tecidos de mamíferos (pulmão, fígado, baço, coração, eritrócitos, plaquetas e leucócitos polimorfonucleares). No entanto, as mais conhecidas e amplamente estudadas são aquelas encontradas nos tecidos pancreáticos de mamíferos e nos venenos de serpentes e insetos (Verheij, et.al., 1981). Todas as PLA<sub>2</sub>s de venenos contêm cerca de 120-135 aminoácidos, várias pontes de sulfeto e uma alta conservação da estrutura tridimensional. Além disso, a maioria dessas PLA<sub>2</sub>s têm atividade catalítica, mas a caracterização sistemática destas tem conduzido para a identificação de várias variantes de PLA<sub>2</sub> como as PLA<sub>2</sub>-like que são cataliticamente inativas (Gutierrez et al., 1995).

Estas moléculas são enzimas que desempenham importante papel no metabolismo de lipídios com alta especificidade estereo específica para hidrolise da ligação 3sn-fosfoglicideos na posição sn-2, sendo, portanto denominada de PLA<sub>2</sub> (Roberts, 1996 e Dennis, 1997). O mecanismo para catalise das PLA<sub>2</sub> foi proposto por Scott e Singer (1994), envolve uma interação altamente específica com glicofosfolipídios, nesta catálise há participação de cálcio como cofator, o sitio ativo e molecular da água. As PLA<sub>2</sub> consistem uma superfamília de proteínas que têm sido caracterizadas como uma importante família de enzimas transdutoras de sinal, atuando

como proteínas que interagem de forma específica com receptores denominados do tipo M e N ou como efetores de atividades biológicas intracelulares (Dennis, 1997). Desta forma é possível dividir as PLA2 em um outro tipo, as citosolicas.

As PLA2 secretórias são proteínas de baixo peso molecular com a presença de pontes de sulfeto, com uma massa molecular de aproximadamente 13 a 15 Kda e são produzidas e secretadas por células (Gutierrez et al., 1995, Valentin e Lambeau, 2000). Estas proteínas normalmente requerem concentrações milimolares de  $Ca^{+2}$  para a atividade catalítica ótima.

As PLA2 pancreáticas de mamíferos são produzidas no pâncreas e secretadas com zimógenos, com a presença de um heptapeptídeo na região N-terminal na enzima inativa. Contudo, no caso das serpentes ou de outros animais peçonhentos, diversas isoformas de PLA2 são constantemente sintetizadas (Ducancel et al., 1988)

As isoformas geralmente apresentam graus diferenciados de atividade enzimática e atividade tóxica, sendo que estas podem estar conectadas ou relacionadas com a atividade enzimática ou não, como evidenciados para as miotoxinas K49 que exibem várias atividades farmacológicas, desde a atividade neurotóxica, cardiotoxica, nefrotóxica, mionecróticas, anticoagulante, convulsionante, hipertensivo e edematogenico. Portanto estas PLA2 K49 diferentemente das PLA2 D49 (cataliticamente ativas) são capazes de desencadear suas atividades biológicas independentemente da liberação do ácido araquidônico (Pederson, 1994). Neste contexto, segundo Kini R.M. (2003), as PLA2 procedentes de veneno de serpentes

compartilham uma similaridade em estrutura e função com as enzimas de mamíferos. No entanto dentre as PLA2 de veneno de serpentes, muitas são tóxicas e induzem um amplo espectro de efeitos farmacológicos. Prepõe-se que as PLA2 procedentes de veneno de serpentes possuam uma habilidade de se unir a um “sítio específico”, devido à sua alta afinidade de se ligar a proteínas específicas que atuam como receptores ou aceptores. Essa ligação específica de PLA2 se dispõe pela presença de um sítio “farmacológico” em sua superfície, que é independente do sítio catalítico. Assim, o quadro 8 representa a hipótese apresentada por Kini, R.M. (2003):

De acordo com este modelo as PLA2 podem exercer sua atividade biológica pelos seguintes mecanismos.

1 – A célula alvo difere de uma célula não alvo (extremo direito), pela presença de um sítio alvo (A). As células ou tecidos diferentes possuem os sítios alvos distintos na superfície. Estes sítios alvos podem ser uma proteína ou glicoproteína transmembrana que se encontra na superfície da célula.

2 – Temos o sítio complementar ao sítio alvo, o sítio farmacológico (Far) está presente na PLA2 específica, além do sítio catalítico (Cat). Uma PLA2 não específica (extremo direito) não possui o sítio farmacológico (F). A natureza e a ubiquação dos sítios farmacológicos na superfície molecular das PLA2 variam com a enzima.

3 – Quando se administra a PLA2, através da via intraperitoneal ou intravenoso, as PLA2 específicas procuram e se ligam às células alvos, devido à sua afinidade alta pelo sítio alvo. Esta ligação específica, assim como a acessibilidade do sítio alvo,

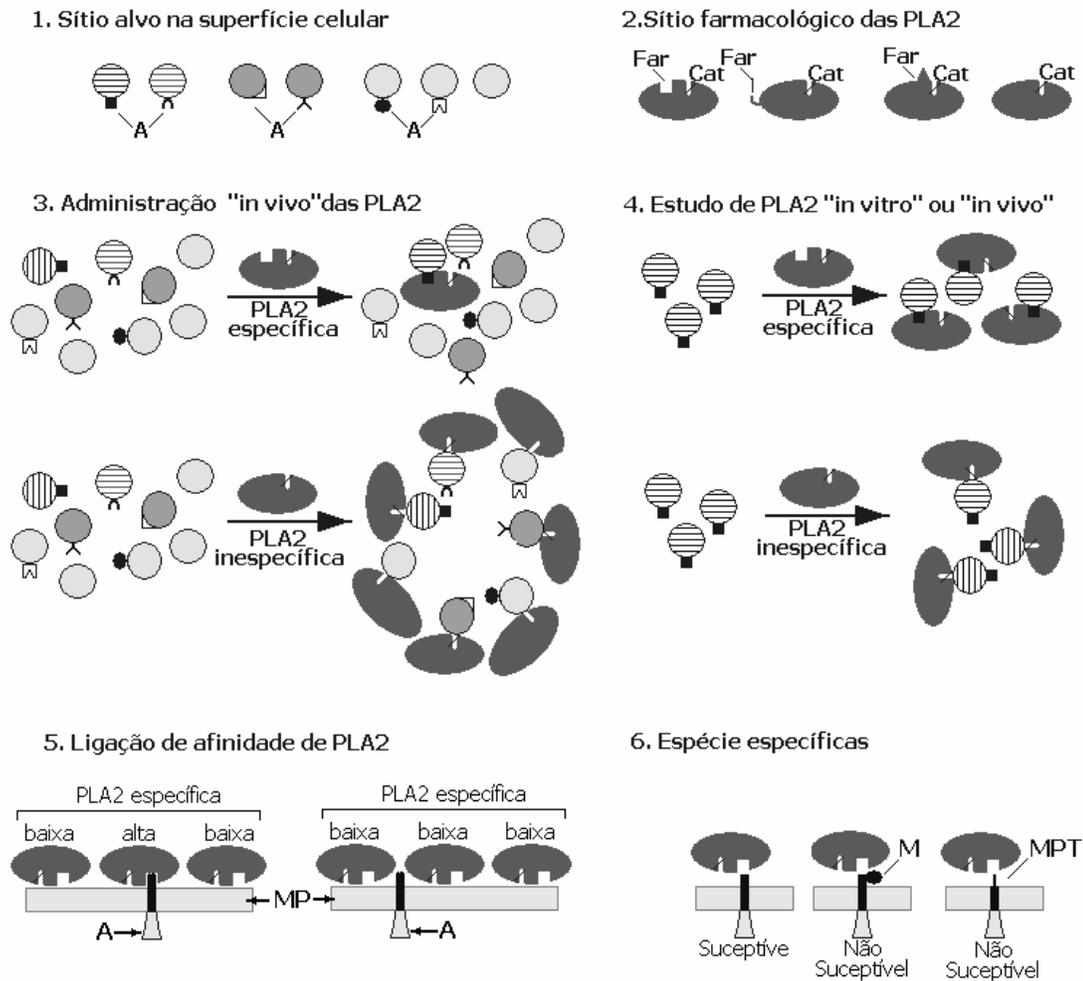
dependeria da acessibilidade da célula. De outro lado, uma PLA2 não específica vai se ligar a muitos tipos diferentes de células. As PLA2 não específicas, assim, não vão lesar a célula alvo eficazmente como a PLA2 específica.

4 – Um sistema in vitro ou ex vivo, uma célula, tecido ou órgão incuba-se com a PLA2. As PLA2 específicas e não específicas podem lesar a célula alvo e poderiam exibir “efeitos farmacológicos”. Isto é particularmente verdade quando a atividade enzimática desempenha um papel maior, induzindo o efeito farmacológico, embora sejam necessárias quantidades mais altas (ou cataliticamente as quantidades muito eficazes) de enzimas não específicas para induzirem os efeitos similares das PLA2 específica.

5 – As PLA2 específicas se ligam ao alvo (ou aceptor), a proteína na membrana plasmática (MP) com uma alta afinidade ( $10^9$  a  $10^8$  M). No entanto, também ocorre uma afinidade baixa ( $10^4$  a  $10^6$  M) quando se liga a fosfolípidios. Os estudos de ligação específica sempre indicam a afinidade alta e baixa aos sítios alvos. A afinidade é alta ao sítio alvo, é baixa comparada a sítios de ligação de baixa afinidade. Os tratamentos para destruir as proteínas alvo produzem a perda da alta afinidade de se ligar, mas não baixa a afinidade dos sítios alvos. Assim, as PLA2 não específicas ligam-se aos fosfolípidios com a afinidade baixa e não se liga ao sítio alvo.

6 – Vemos que o sítio alvo é um “bom encaixe” para o sítio farmacológico em espécies de células ou tecidos susceptíveis. Nas espécies não susceptíveis, aquelas que têm sofrido processos de mutações (M) ou modificações pós traducionais (MPT)

como glicosilações, células ou tecidos susceptíveis são suficientes para alterar a afinidade específica da PLA2 com a célula alvo. Isso explica a especificada das espécies observadas, na habilidade das PLA2 de exibir seus efeitos farmacológicos (Kini, M.R 2003).

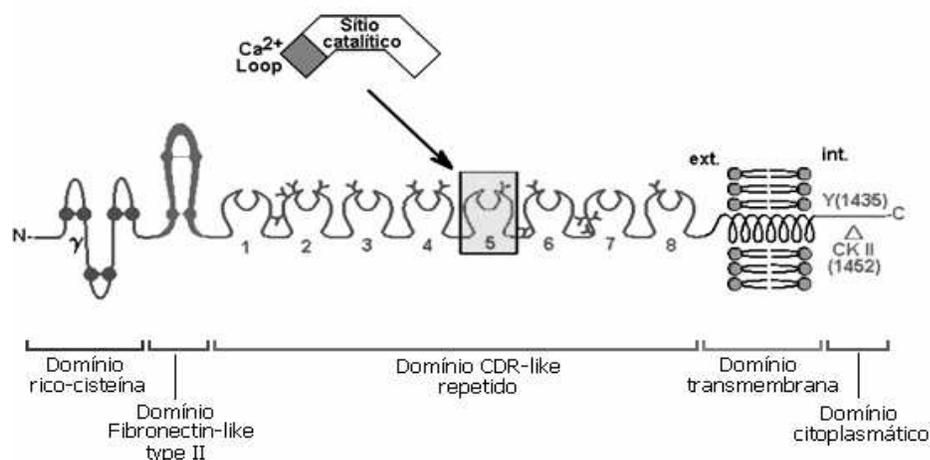


Quadro 8 - Modelo para explicar os efeitos farmacológicos das PLA2 (Kini, M.R. 2003).

Além destes mecanismos, recentemente, nestas ultimas décadas, receptores e proteínas pra PLA2 secretórias e de venenos tem sido identificados em mamíferos,

sugerindo que as PLA2 do veneno possam exercer sua toxicidade através da interação com proteínas, que seriam, portanto os mesmos receptores para as PLA2 secretórias produzidas pelos mamíferos além da atividade enzimática. Até o presente momento foram caracterizados dois receptores denominados M e N. (Valentine e Lamdeau, 2000) (Quadro 9).

A interação de alta afinidade da PLA2 com seu receptor (proteína alvo) deve-se provavelmente à complementaridade de carga, hidrofobicidade e forças de Van der Waals, que se dá entre o sítio farmacológico e o sítio alvo na superfície do receptor protéico ou receptor. A PLA2 pode induzir seus efeitos farmacológicos por mecanismos dependentes ou independentes de sua atividade enzimática.

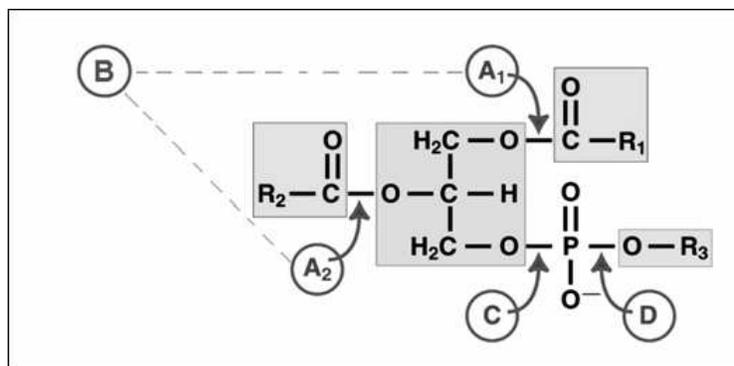


Quadro 9. Receptor tipo M para PLA2 secretórias e possível local de interação da PLA2 com o receptor.

A identificação dos sítios farmacológicos tem o potencial para a exploração no desenvolvimento de novos sistemas úteis, devido ao amplo espectro de especificidade em tecidos e órgãos, para o “direcionamento” de proteínas específicas a um tecido alvo particular ou órgão. De acordo com a literatura as PLA2 são muito mais que simplesmente enzimas hidrolíticas, as pesquisas recentes buscam os novos papéis das PLA2 intracelulares, no entanto, várias enzimas secretadas têm sido registradas na maioria das células. Também têm sido encontrados vários novos papéis das PLA2 que diferem consideravelmente das PLA2 secretadas. A extensa literatura sobre PLA2 indica a importância destas enzimas para muitas áreas de pesquisa em bioquímica, biologia molecular, biologia estrutural, toxicologia, toxinologia e medicina.

### 1.8 Classificação das Fosfolipases.

As fosfolipases são classificadas dependendo de sua estrutura, do seu mecanismo de catálise e de acordo com seu sítio de hidrólise sobre o triacilglicerol. Podendo desta forma ser inicialmente classificadas em Fosfolipase A1, Fosfolipase A2, Fosfolipase B, Fosfolipase C, Fosfolipase D (Quadro 10).



Quadro 10. Principais classes de lipases e seus respectivos sítios de atuação catalítica.

No caso das PLA2, estas também podem ser classificadas segundo algumas características tais como, localização celular (secretórias ou citosolicas), de acordo com a massa molecular (de alto ou baixo massa), dependência ou não de cálcio para sua atividade enzimática, de acordo com o número de pontes de sulfeto. Desta forma as PLA2 conhecidas até o presente momento podem ser colocadas em algumas das classes de PLA2. Atualmente estas PLA2 estão colocadas de acordo com a Tabela 1.

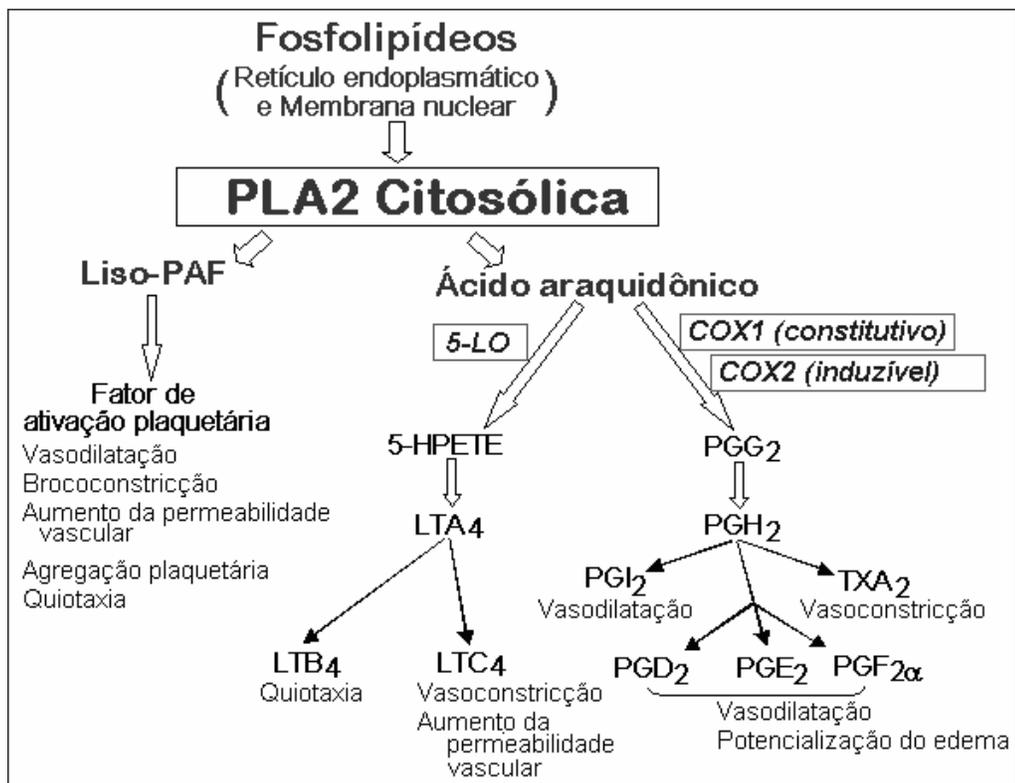
Grupo	Origem	Localização	kDa	Ca <sup>2+</sup>	S-S	Características
I						
A	Elapídico e Hidrofílico	Secretada	13-15	mM	7	Par His-Asp
B	Pâncreas suíno/ humano	Secretada	13-15	mM	7	Par His-Asp, alça elapídica
II						
A	Crotálicas, fluido sinovial humano e plaquetas	Secretada	13-15	mM	7	Par His-Asp, C-terminal.
B	Víbora de Gordon	Secretada	13-15	mM	6	Par His-Asp, C-terminal.
C	Testículo de rato	Secretada	15	mM	8	Par His-Asp, C-terminal.
III	Abelhas e lagartos	Secretada	16-18	mM	5	Par His-Asp, C-terminal.
IV	Rim de rato novo 264.7 Plaqueta humanas U937	Citosólicas	85	< μM		Ser-228 na seqüência consenso GLSGS. Arg-200, Asp-549 Ser-505 fosforilação do sítio Domínio do sítio Gal B
V	Humano/ rato/ coração camundongo, pulmão e macrófago P388D1	Secretada	14	mM	6	Par His-Asp alça não elapídica e não C-terminal.
VI	Macrófago da linhagem celular P228D1	Citosolica	80-85	—		Seqüência consenso repetida CXSXG Complexo de 340 kDa
VII	Plasma humano	Secretada	45	—		Seqüência consenso. GXGXG Ser-273, Asp-298, His-351
VIII	Cérebro bovino	Citosólica	29	—		Ser-47
IX	Caracol marinho	Secretoria	14	<mM	6	Par His-Asp

Tabela 1: Características de um grupo maior de Fosfolipases A2.

### **1.9 Estrutura e função das Fosfolipases A2**

As PLA2 secretórias são proteínas de baixo peso molecular (13 a 15 KDa) com a presença de sete pontes dissulfeto e são secretadas por células. Geralmente requerem concentração mM de cálcio para sua atividade enzimática e podem ser inibidas pelo brometo de bromofenacil (pBPB), que impede a ligação do cálcio modificando aminoácidos e alterando a estrutura da proteína. Estas enzimas foram primeiramente caracterizadas no suco pancreático de mamíferos, mas também são abundantemente encontradas no veneno e na secreção anal de serpentes de todas as famílias.

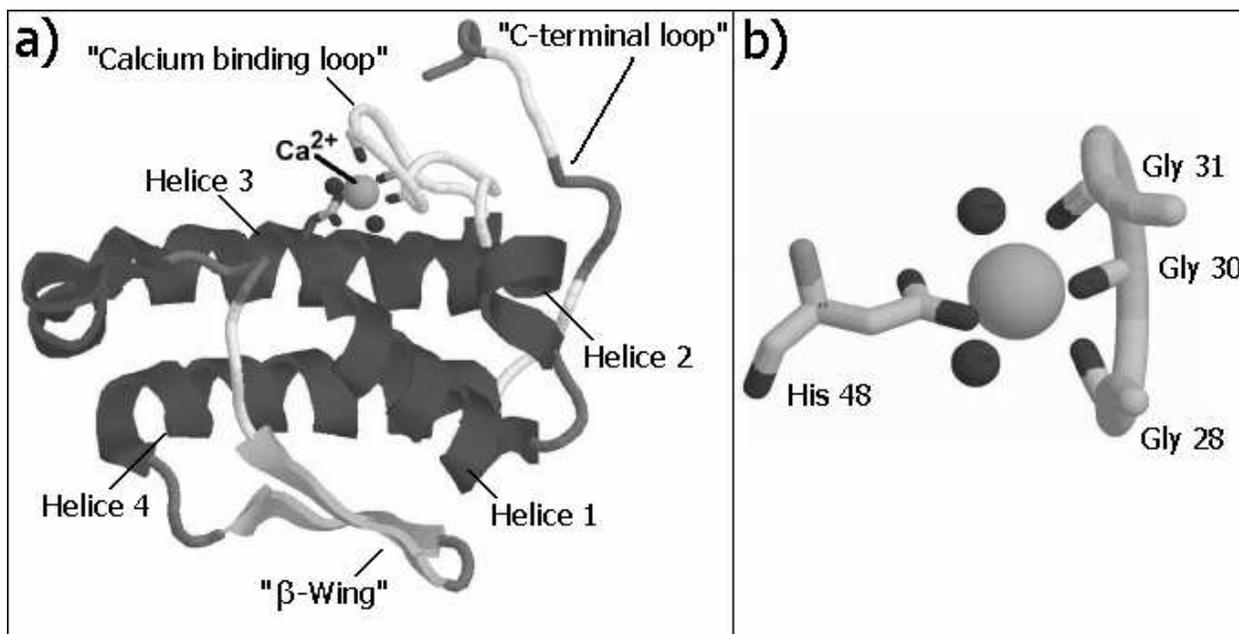
Já foram caracterizados mais de 100 membros desta família de PLA2 que são capazes de hidrolisar glicerofosfolípidios contendo um grupamento de ésteres de fosforil, de colina, etanolamina, inositol e glicerol ao ácido fosfatídil livre. A hidrólise de glicerofosfolípidios esterificados com fosfatídilcolina, etanolamina ou inositol gera dois produtos extremamente importantes, o ácido araquidônico e o lisofosfolípidio que é um precursor de lipídeos bioativos tais como prostaglandinas, leucotrienos e tromboxanos, sendo que há evidências de que estas enzimas poderiam também atuar em respostas imunológicas, inflamações, proliferação celular e vasoconstrição (Chang et al. 1977; Bomalaski e Clark, 1993; Mukherjee et al. 1994; Hanada et al. 1995). Desta forma as PLA2 induzem a produção tecidual de vários tipos de lipídios biologicamente ativos, que irão então induzir os diferentes tipos de atividades farmacológicas (Quadro 11).



Quadro 11. Atividade da PLA2 citosolicas e os produtos da degradação do fosfolipídios de membrana e suas diferentes atividades fisiológicas e farmacológicas.

As enzimas das classes I e II apesar de possuírem origens filogenéticas distintas, possuem uma estrutura terciária com os mesmos motivos estruturais, que incluem a presença de três segmentos em alfa hélice, a presença de alças e folhas beta (Quadro 12). As PLA2s classes I e II contêm um íon de cálcio coordenado dentro desta estrutura, que é definido como núcleo hidrofóbica onde está localizado o sítio catalítico destas moléculas. Este canal formado pela hélice encontra-se aberto à superfície

externa da molécula e durante a atividade enzimática é ocupado pelas cadeias acilas do substrato.



Quadro 12. 12a, mostra a estrutura terciária da PLA2 de *Bothrops pirajai*, destacando-se a localização das estruturas secundárias desta molécula. 12b mostra detalhes da ligação do cálcio e sua coordenação com o loop de ligação do cálcio e com a His 48.

Este canal ou núcleo cor hidrofóbico é ocupado pelas cadeias acilas do substrato (Arni e Ward, 1996). Estas enzimas possuem um loop de ligação de íon cálcio, denominado de “calcium-binding loop” que possui uma seqüência consenso de glicinas que conferem a este loop uma grande flexibilidade estrutural, que permite três átomos de oxigênio das carbonilas proximais para coordenação molecular primária do cálcio. Além disso, a resídua carboxila da Asp 49 participa secundariamente da coordenação do cálcio (Rigden et al., 2003). As PLA2 classe I e II também possuem uma estrutura

em folhas beta antiparalelas conservadas, que formam a  $\beta$ -Wing, apesar desta estrutura secundária não participar da catálise esta estrutura tem sido relacionado a várias atividades farmacológicas tais como neurotoxicidade, miotoxicidade ou atividade anticoagulante (Harris, 1991, Yang, 1994 and Soares et al., 2000).

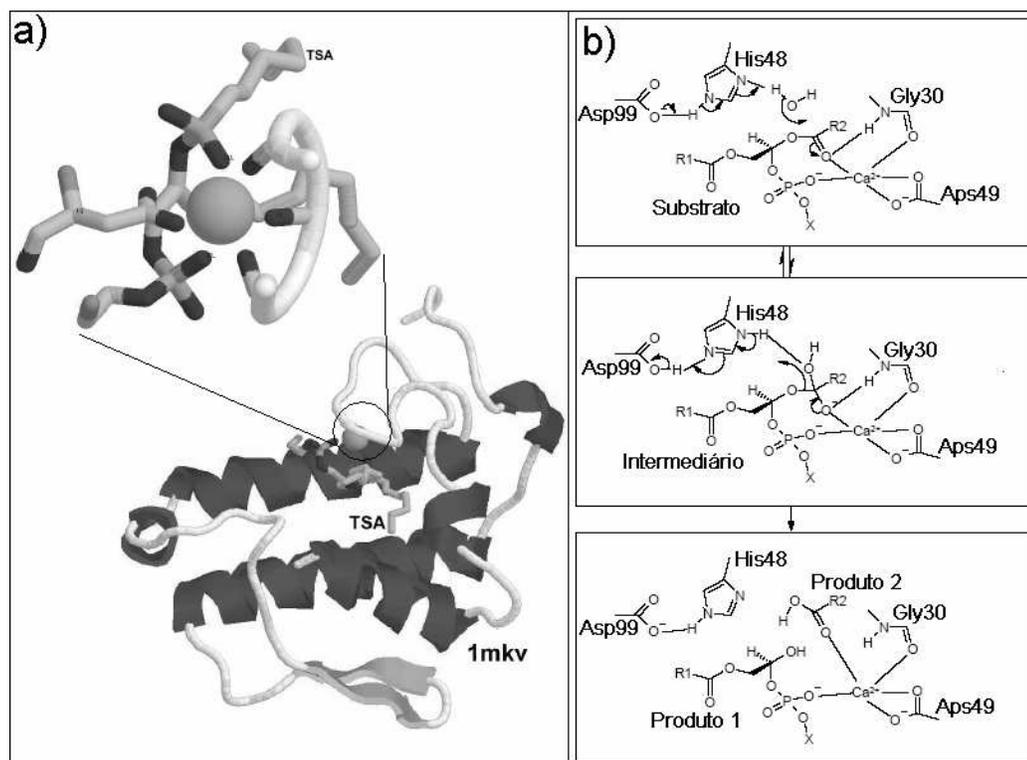
A catálise das PLA2 secretórias é análogo ao mecanismo de ação das serino proteases, envolvendo as cadeias laterais dos resíduos de Asp99, His-48 e uma molécula de água (Scott e Sigler, 1994). Estudos cristalográficos de PLA2 complexados com análogos do estado de transição, que confirmaram alguns aspectos da catálise, que pode ser dividido em três estágios: 1)Ataque base mediado sobre o substrato, 2)Formação e colapso do intermediário tetraédrico e 3)Liberação dos produtos. Quando o substrato esta presente, o cálcio primariamente faz coordenações (pentágono bipiramidal) com os átomos de oxigênio de duas moléculas de água, o oxigênio do Aspartato 49, e do esqueleto formado pelos resíduos de Gly32, Tyr28 e Gly30. Durante a entrada do substrato no sítio catalítico ocorre uma acomodação do substrato dentro do canal hidrofóbico da enzima (Scott e Sigler, 1994).

No modelo de ação das PLA2 a unidade catalítica compreende os resíduos de aminoácidos His 48 (posição 48 da cadeia polipeptídica), Asp 99 e uma molécula de água .

A unidade catalítica das fosfolipases (PLA2) é constituída pelos resíduos His-48, Asp-99 e uma molécula de água. No mecanismo de catálise proposto, (Verheij et al., 1980) um próton na posição 3 do anel imidazol do aminoácido His-48 está envolvido em

uma forte interação com o grupo carboxílico da Asp-49, impedindo que ocorra uma rotação no anel imidazol (que está envolvido com a catálise), deixando o nitrogênio da posição 1 deste anel na posição espacial própria.

Neste modelo de catálise uma molécula de água promove então um ataque nucleofílico ao carbono do grupo éster do substrato e nesse momento o anel imidazol da His-48 recebe um próton da molécula de água facilitando a reação. Logo após ocorre a hidrólise da união acil-éster na posição sn-2 do fosfoglicerídeo (substrato), este próton é doado pelo anel imidazol para o oxigênio que forma então um grupo álcool de lisofosfolípido a ser liberado, (Verheif, et al., 1980) (Quadro 13).



Quadro 13. Representação esquemática do mecanismo catalítico proposto para as PLA2. (Verheij et al., 1980).

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

O íon cálcio cataliticamente importante está ligado pelos oxigênios da Tyr-28, Gly-30, Gly-32 e pelo oxigênio da cadeia lateral do Asp-49. No mecanismo da catálise, o cálcio tem dupla função, fixar o fosfato e estabilizar a carga negativa do oxigênio do grupo carbonil da ligação éster da posição sn-2 do substrato (Yang, 1994). As fosfolipases A2 que não dependem de cálcio, são de forma gerais ativadas e estabilizadas na presença de ATP. Basicamente o ATP modularia a polimerização dessas PLA2, o que a tornaria cataliticamente ativa e estável (Dennis, 1994).

### **1.10 Fosfolipases A2 Lys 49 (Cataliticamente não ativas).**

As PLA2s de serpentes possuem vários efeitos farmacológicas tais como: neurotoxicidade pré e pós sináptica, miotoxidade (Azevedo Marques et al., 1982; Cupo et al., 1988), atividade coagulante (Landucci et al., 1994) e anticoagulante, convulsionante, hipotensiva, hemolítica (Rosenfeld, 1971), hemorrágica e edematológica (Kini e Iwanaga, 1986; Kini e Evans, 1987). Estas atividades não

necessariamente envolvem a geração de lipídeos biologicamente ativos, portanto dependem de mecanismos independentes da atividade catalítica (Gutiérrez e Lomonte, 1995). Segundo Valentin et al (1999), mostram evidências de que os efeitos farmacológicos são mediados via receptores de alta afinidade por determinados tipos de PLA2.

Durante muito tempo a atividade enzimática da PLA2 foi uma condição *sinequanon* para a atividade farmacológica. Após o isolamento e caracterização molecular das PLA2 Lys 49 (Maraganore et al., 1984), que estruturalmente mantém os mesmos motivos estruturais das PLA2 D49 (cataliticamente ativas), que para usarem o cálcio durante a catálise há necessidade de uma coordenação secundária importante dos grupos carboxila das Asp 49. Portanto, a substituição da Asp 49 (D49) por Lys 49 (K49), indisponibiliza a presença deste segundo grupo de coordenação e assim a atividade enzimática é perdida (Quadro 13). As PLA2 Lys 49 são proteínas desprovidas de atividade catalítica, mas responsáveis por várias atividades biológicas, que são independentes da liberação do ácido araquidônico (Maraganore, et al., 1984; Gutierrez e Lomonte, 1995; Arni e Ward, 1996 e Selistre et al., 1996).

Segundo Gutiérrez e Lomonte (1995) as PLA2 poderiam se ligar a determinados sítios, com uma carga parcial negativa que poderiam servir de ancoragem para as PLA2. Unidas assim à membrana celular, poderiam gerar uma desorganização da membrana levando à alteração na permeabilidade e conseqüente destruição celular devido preferencialmente à desorganização celular mais do que pela toxicidade da PLA2. Segundo Kini (1997) as PLA2 isoladas do veneno de serpentes poderiam

interagir com determinadas células mediante reconhecimento específico de determinados receptores ou “sítios ativos”. Desta forma as PLA2 não específicas podem interagir ao acaso com todos os tipos de células, incluindo as “células alvo”. Assim o efeito farmacológico produzido pela interação da PLA2 não específica é menos potente do que em uma interação específica (Kini, 1997).

## **2 Objetivos**

### **2.1 Gerais**

a) Caracterização molecular do veneno das serpentes de *Crotalus durissus ruruima* e *Crotalus durissus cumanensis*.

b) Isolamento e caracterização molecular das crotoxinas isoladas a partir destes venenos.

c) Isolamento e Caracterização molecular e farmacológica de PLA2 do veneno de serpentes de *Crotalus durissus ruruima* e *Crotalus durissus cumanensis*.

### **2.2 Específicos.**

a) Caracterização bioquímica das PLA2

b) Caracterização farmacológica

c) Análise evolutiva das PLA2.

### **3 Materiais e Métodos**

#### **3.1 Animais**

Os animais utilizados foram camundongos Swiss, machos, adultos (45 dias), cedidos pelo Biotério Central do Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista, Campus de Botucatu.

#### **3.2 Venenos e Reagentes**

Os venenos de *Crotalus durissus ruruima* e *Crotalus durissus cumanensis*, foram adquiridos do CETA - Centro de Extração de Toxinas Animais, Morungaba (São Paulo).

Todos os solventes, produtos químicos e reagentes utilizados foram de grau HPLC, grau seqüência ou de alto grau de pureza, obtidos dos laboratórios Sigma, Aldrich Chemicals, Merk, Cristália e Bio Rad.

#### **3.3 Purificação do veneno**

As PLA2s cataliticamente ativas encontradas no veneno de *C.d.c.* e *C.d.r.* foram obtidas a partir de uma combinação de vários processos cromatográficos, que serão discutidos a seguir.

##### **3.3.1 Cromatografia de exclusão molecular em HPLC**

20 mg de veneno total de foram homogeneizados em tampão bicarbonato de amônio 0,1M, pH 7,9 até a sua completa dissolução. Esta solução de veneno foi então

centrifugada a 2500g por 5 minutos para clarificação da solução. O sobrenadante obtido foi então aplicado à coluna pré-empacotada de exclusão molecular, Protein Pack SW 300 (0.78 x 30cm) (Waters) acoplada ao sistema LC-biocompatível, APPS LC 650E (Waters), foi previamente equilibrada com o tampão bicarbonato de amônio, pH 7,9, 0,1M, antes da aplicação da amostra. A eluição do material foi realizada a um fluxo constante de 0,2 ml/min com tampão bicarbonato de amônio, pH 7,9, 0,1M e monitorada a uma absorbância de 280 nm. As frações coletadas em um coletor de frações automático Foxy 200 foram liofilizadas e guardadas a -20°C.

### **3.3.2 Cromatografia de fase reversa em HPLC**

Nas etapas anteriores concomitantes ao fracionamento, foram também realizados experimento para a caracterização PLA2 do veneno e de suas frações ao longo da corrida cromatográfica. O sistema cromatográfico utilizado foi o HPLC - PDA 991 (Waters), equipado com duas bombas Waters modelo 510/B, um injetor automático de amostras U6K com um “loop” de 2,0 ml e uma coluna  $\mu$ -Boundapak C-18 (0,78 X 30 cm analítica Waters), previamente equilibrada com Tampão A (ácido trifluoracético 0,1%, pH 3,5), que também foi utilizado para a homogeneização das amostras.

A corrida cromatográfica foi feita usando um gradiente de concentração de tampão B (acetonitrila 66% em tampão A), o fluxo foi mantido em 1ml/min e o monitoramento do cromatograma foi realizado a 280nm. As frações coletadas foram liofilizadas e posteriormente armazenadas a -20 °C.

### 3.3.3 Eletroforese em PAGE-SDS

A eletroforese em gel de poliacrilamida foi realizada seguindo-se a metodologia descrita por Laemmli (1970). As placas de poliacrilamida foram feitas de modo descontínuo, apresentando um gel de concentração de 5% e um gel de corrida de 12,5%. As placas foram preparadas utilizando-se uma solução de acrilamida estoque (30%T, 0,8%C). O gel de concentração 5% foi preparado utilizando-se o tampão Tris-HCl 1,0 M, pH 6,8. O gel de corrida foi feito utilizando-se o tampão Tris-HCl 1,0M, pH 8,8. Em ambos os géis foram acrescentados 0,1% (v/v) de SDS 20%. A eletroforese PAGE-SDS foi realizada em um sistema duplo de mini placas SE 250 Mighty Small II (Hoefer Scientific Instruments). As amostras e os marcadores de peso molecular foram dissolvidos em tampão de amostra (Tris-HCl, 0,075M, pH 6,8; 10% de Glicerol; 4% de SDS; 0,001% de Bromofenol). A corrida eletroforética foi realizada a 40 mA. Os géis foram corados com solução de Coomassie Blue 0,05% a 37°C, seu excesso foi removido em ácido acético 7%. Também foram utilizadas para a análise do grau de homogeneidade molecular das amostras as eletroforeses em gel de PAGE-SDS-Tricina, de acordo com o método descrito por Schägger and Von Jagow (1987), usando um sistema de eletroforese descontínuo e um gel de corrida a 10%.

Também foi utilizada, para análise do grau de homogeneidade molecular da amostra, a eletroforese em gel de PAGE-SDS-Tricina, de acordo com o método descrito por Schägger e Von Jagow (1987).

### **3.3.4 Análise por Espectrometria de Massa de tipo Maldi-Tof (MS).**

A massa molecular das neurotoxinas foi analisada por Espectrometria de Massa utilizando um Voyager DE PRO MALDI TOF mass spectrometry (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). 1 mL. da amostra em TFA 0,1% foi misturada em 2 mL. da matriz. A matriz foi preparada com *o*-cyano-4-hidroxy-cinnamic acido (Sigma), 60% acetonitrila e 0.1% v/v TFA e massa foi analisada sob as condições seguintes: aceleração de voltagem 25 kV, o laser ajustado a 2890 mJ/cm<sup>2</sup>, em 300 ns e modo de análise linear.

## **3.4 Caracterização bioquímica**

### **3.4.1 Determinação da atividade PLA2**

A medição da atividade enzimática de PLA2 foi realizada de acordo com o método descrito por Holzer e Mackessy (1996) e adaptado para placa de ELISA com 96 poços de acordo com o método descrito por Beghini et al. (19..), utilizando-se como o substrato o ácido 4-nitro-3-(octanoiloxi) benzóico. Foram utilizadas amostras com uma concentração de 1,0 mg/ml, no caso do veneno total, crotoxina e fosfolipase A<sub>2</sub> isoladas. As amostras foram incubadas a 37° C junto com o substrato, tampão de reação (Tris-HCl 0,1M Ca<sup>2+</sup> 0,01M pH 8) e lidas a 425 nm após 20 minutos de incubação. A incubação e leitura foram feitas em leitor de placa de multicanal (Spectramax 340).

### **3.4.2 Análise de aminoácidos**

A análise de aminoácidos foi realizada no analisador automático de aminoácidos PICO TAG (Sistema Waters) seguindo a metodologia descrita por Henrikson e Meredith (1984). Aproximadamente 1 a 2 mols das amostras purificadas, foram hidrolisadas com HCl a 106 °C em presença de fenol 1% durante 24 h em ambiente de vácuo. Após a hidrólise as amostras foram derivatizadas com PITC dando origem aos respectivos PTC aminoácidos que foram aplicados a uma coluna de HPLC específica para a análise de aminoácidos. A identificação dos aminoácidos foi realizada usando-se PTC aminoácidos padrões o que também foi importante para a determinação da composição global de aminoácidos das proteínas.

A determinação do triptofano foi realizada de acordo com metodologia descrita pela Waters, onde a hidrólise é realizada com 4M de ácido metilsulfônico ao invés de HCl 6M e a temperatura de hidrólise é de 110 °C por 20 horas. A derivatização e a análise dos hidrolisados seguiu os procedimentos anteriormente descritos.

### **3.4.3 Determinação da seqüência N-terminal**

Dois miligramas da proteína purificada de acordo com a metodologia anteriormente descrita foram dissolvidos em tampão de redução (Guanidina 6M; Tris 0,4M; EDTA 2mM, pH 8,13) reduzidos com DTT (14h) e carboximetilados com ácidos iodoacético marcado (Marangoni et al 1995) Após a redução e alquilação radioativa, as amostras foram dessalinizadas por meio de coluna de exclusão molecular em G25,

usando o ácido acético 1M como eluente. As amostras de proteína dessalinizadas foram então liofilizadas.

A proteína reduzida e carboximetilada, RC proteína, foi seqüenciada em um seqüenciador automático de proteínas gás-líquido prociser (Applied Biosystem) e a identificação dos aminoácidos foi realizada por comparação do tempo de retenção dos PTC aminoácidos padrões com os PTC aminoácidos das amostras.

A Cys foi identificado como PTH carboximetil cisteína marcada e confirmada por contagem radioativa.

#### **4.4.4. Dicroísmo Circular**

A alteração das estruturas secundárias foi monitorada pelo dicroísmo circular. O aparelho a ser utilizado foi o Jasco J-720 espectropolarímetro (Tóquio, Japão), equipado com um IBM PC-AT PS/2 com monitor multiscan CNS-3436 e com uma impressora Hewlett Packard 7465A. As amostras protéicas foram dissolvidas em fosfato de sódio 10mM pH 7,4 com concentração de 0,1mg/mL a temperatura ambiente. Foi utilizada uma cela de 1mm e monitoração realizada a 195-250nm. Esta técnica foi realizada no Instituto de Química da Unicamp.

### **3.5 Atividade farmacológica**

#### **3.5.1 Medida da atividade neurotóxica em nervo frênico-diafragma de camundongo**

Para estes experimentos foram utilizadas preparações com nervo frênico de diafragma de camundongo. Todos os procedimentos foram aprovados no conselho local de ética (CEEA, IB, UNESP). A preparação foi removida cirurgicamente de animais anestesiados (hidrato de cloral 3mg/ kg), os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e sangria dos vasos cervicais. A preparação músculo diafragma, juntamente com seu nervo motor o nervo frênico, foi cuidadosamente retirada e montada para registro miográfico "in vitro" (Gallacci et al., 2006).

O registro da força de contração muscular, em resposta a estímulos, foi realizado através de transdutor isométrico (Grass, FT03), e este acoplado a um amplificador de sinal (Gould, 13-6615-50), que foi transmitido e gravado no computador através do sistema de aquisição de dados "AcquireLab" (Gould).

O músculo foi submetido à tensão constante de 5g/cm, por meio de um fio preso à porção tendinosa, ligado ao transdutor isométrico, sendo que na estimulação indireta, a extremidade livre do nervo frênico foi aspirada por um eletrodo de platina do tipo "sucção". Um outro eletrodo de platina, mergulhado na solução, servia como eletrodo de referência. As contrações foram provocadas indiretamente, por pulsos elétricos regulares com duração de 0,5 milisegundos, intensidade supramáxima e frequência de 0,2 Hz. e na estimulação direta o músculo diafragma foi posicionado entre os pólos de

um eletrodo bipolar de platina, e este foi acoplado a um estimulador elétrico (Grass-S88K). A tensão de base de cada uma das preparações foi estabelecida individualmente, de modo a fornecer a tensão máxima, em resposta à aplicação de pulsos elétricos regulares com duração de 5 milisegundos, intensidade supramáxima e frequência de 0,2 Hz. Para evitar alguma contribuição da contração indireta, o pancurônio ( $2 \times 10^{-6}$  M) foi adicionado à solução nutriente.

A amostra foi aplicada após o término do período de estabilização de 45 minutos e as respostas indiretas ou diretas, para a porcentagem do bloqueio neuromuscular, foram observadas após 90 e 120 minutos respectivamente, com  $n \geq 3$  para cada experimento.

### **3.6 Análise estatística**

Os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão. A significância das diferenças observadas foi determinada pelo teste não-pareado *t*-Student, com valor  $P < 0,05$  considerado como significativo.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Cromatografia de exclusão molecular dos venenos de *C.d.r* e *C.d.c.* em HPLC (*Protein Pack SW 300*).

A corrida cromatográfica dos venenos de *Crotalus durissus* foi realizada sobre as mesmas condições, a um fluxo de 0.2 ml/min. O primeiro veneno a ser fracionado seguindo o protocolo descrito anteriormente foi o veneno de *Crotalus durissus ruruima*, que mostrou a presença de seis frações principais nomeadas de Ctn (Crotacetina), CVX - I (Convulxina), Gyr - II (Giroxina), Crtx - III (Crotoxina) e Crot (Crotamina) - IV (Fig. 1).

O monitoramento da atividade fosfolipásica A2 foi feito ao longo do fracionamento, que mostrou a presença de PLA2 no pico da crotoxina (Fig. 1). Após o fracionamento, todas as frações foram identificadas e liofilizadas e estocadas a -20°C.

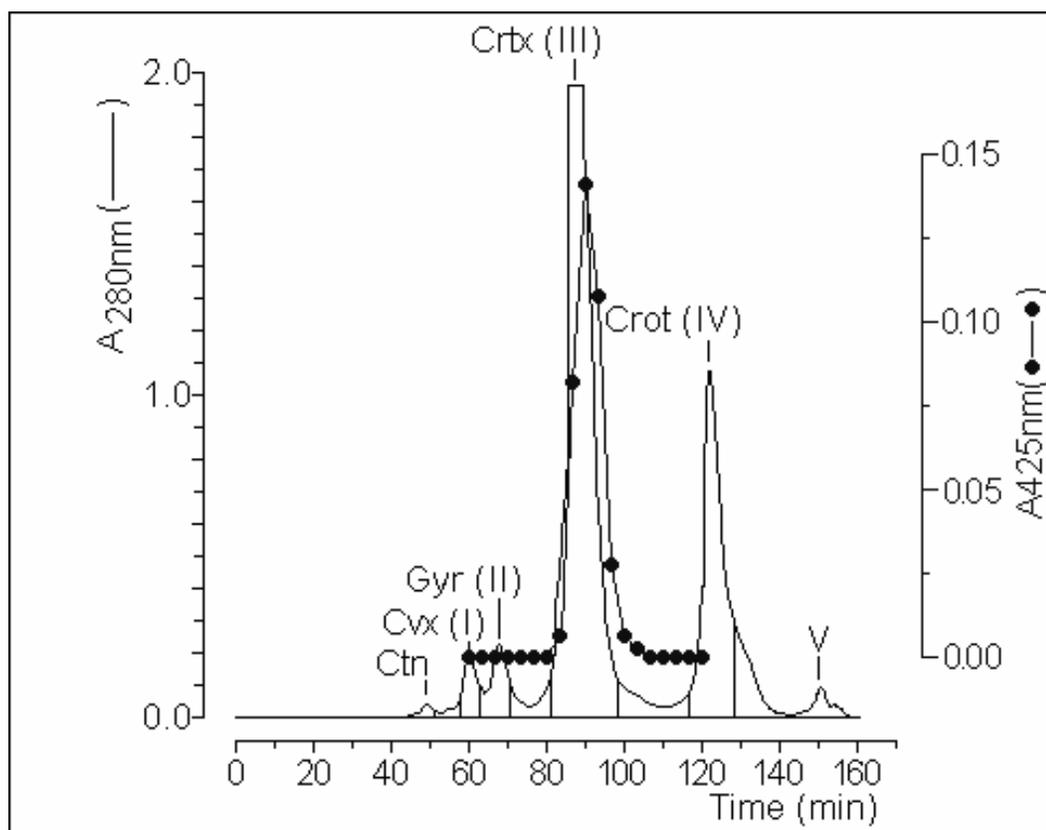


Figura 1. Perfil cromatográfico do fracionamento do veneno total de *C. d. ruruima*, através de cromatografia em sistema de HPLC, utilizando coluna de Exclusão Molecular (Protein Pack SW 300 0,78 x 30 cm - Waters). Pode-se observar a presença dos picos Ctn (Crotacetina), CVX - I (Convulxina), Gyr - II (Giroxina), Crtx - III (Crotoxina) e Crot (Crotamina) - IV. O pico da crotoxina foi evidenciado por ensaio específico para PLA2 .

O segundo veneno a ser fracionado foi proveniente de serpentes de *Crotalus durissus cumanensis*. Este veneno foi pesado e dissolvido em tampão Bicarbonato de amônia (0.1M, pH 7.9) até a sua completa dissolução, esta solução foi então centrifugada e aplicada a uma coluna, sobre as mesmas condições do fracionamento do veneno total de *Crotalus durissus ruruima*. O perfil cromatografia do fracionamento do veneno de Cd cumanensis mostra a presença de três frações majoritariamente, identificadas como Gyr (Giroxina), Crtx (Crotoxina) e Crot (Crotamina) (Fig 2). A fração Crtx mostrou uma forte atividade PLA2, mas ausente nas demais frações deste veneno. Desta forma a análise cromatográfica dos venenos de *Crotalus durissus ruruima* e *Crotalus durissus cumanensis*, revela diferenças significativas não somente em análise quantitativa, mas também do ponto de vista qualitativo. O veneno de *Crotalus durissus ruruima* mostra várias frações sendo a crotoxina e a crotamina predominantes, enquanto que o veneno de *Crotalus durissus cumanensis*, mostrou um perfil cromatográfico com alta concentração de giroxina, crotamina e crotoxina e ausência de Crotacetina e convulxina.

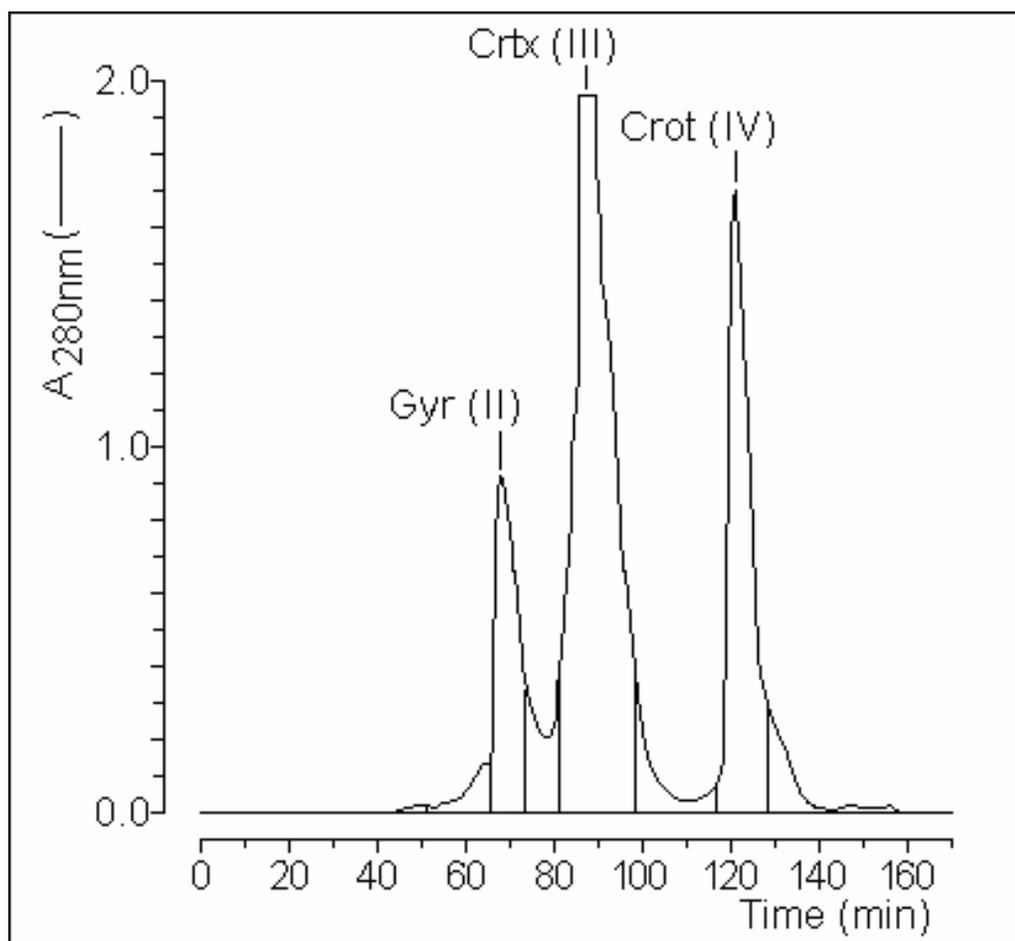


Figura 2. Fracionamento do Veneno total de *C. d. cumanensis*, através de cromatografia em sistema de HPLC, utilizando coluna de Exclusão Molecular (Protein Pack SW 300 0,78 x 30 cm - Waters). Pode-se observar a presença dos picos Gyr (Giroxina), Crtx (Crotoxina) e Crot (Crotamina). Não foi observado o pico da Convulxina.

#### **4.2 Análise do veneno total em HPLC de fase reversa.**

Aproximadamente 10mg do veneno total de cada amostra foi dissolvido em 200ul de solução de bicarbonato de amônia 1M pH 7,8, clarificado por centrifugação. A eluição das frações dos venenos foi realizada fazendo uso de um gradiente linear de concentração de solvente B (acetonitrila 66%) em solvente A (TFA 0,15) As frações que correspondem as crotapotinas e PLA2s estão destacadas e correspondem conjuntamente a aproximadamente 30 % das proteínas totais para o veneno de *C. d. ruruima* (Figura 3) e a aproximadamente 54% das proteínas totais do veneno de *C. d. cumanensis* (Figura 4).

Comparativamente os dados do perfil cromatográfico do veneno total de *C. d. ruruima* foram semelhante ao veneno de *C. d. terrificus*. Uma vez que as corridas cromatográficas foram obtidas nas mesmas condições de ensaio é possível identificar nítidas diferenças entre estes venenos, sendo a mais evidente a ausência de crotamina no veneno total de *C. d. cumanensis*, que possui uma evidente presença de proteínas de alto peso molecular (Figuras 3 e 4).

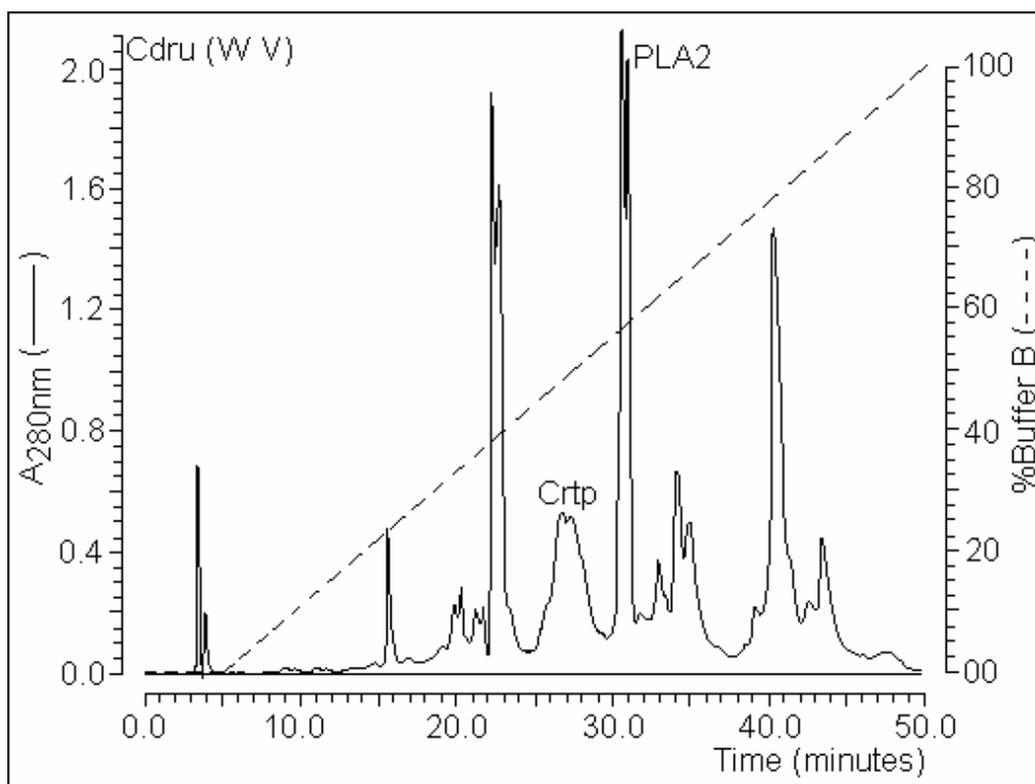


Figura 3. Perfil cromatográficos do fracionamento do veneno total de *C. d. ruruima* através de cromatografia de HPLC, utilizando coluna de Fase Reversa (C-18 u-Bondapak 0,78 x 30 cm - Waters), evidenciando os picos de Crotopotina (Crtp) e fosfolipase A2 (PLA2).

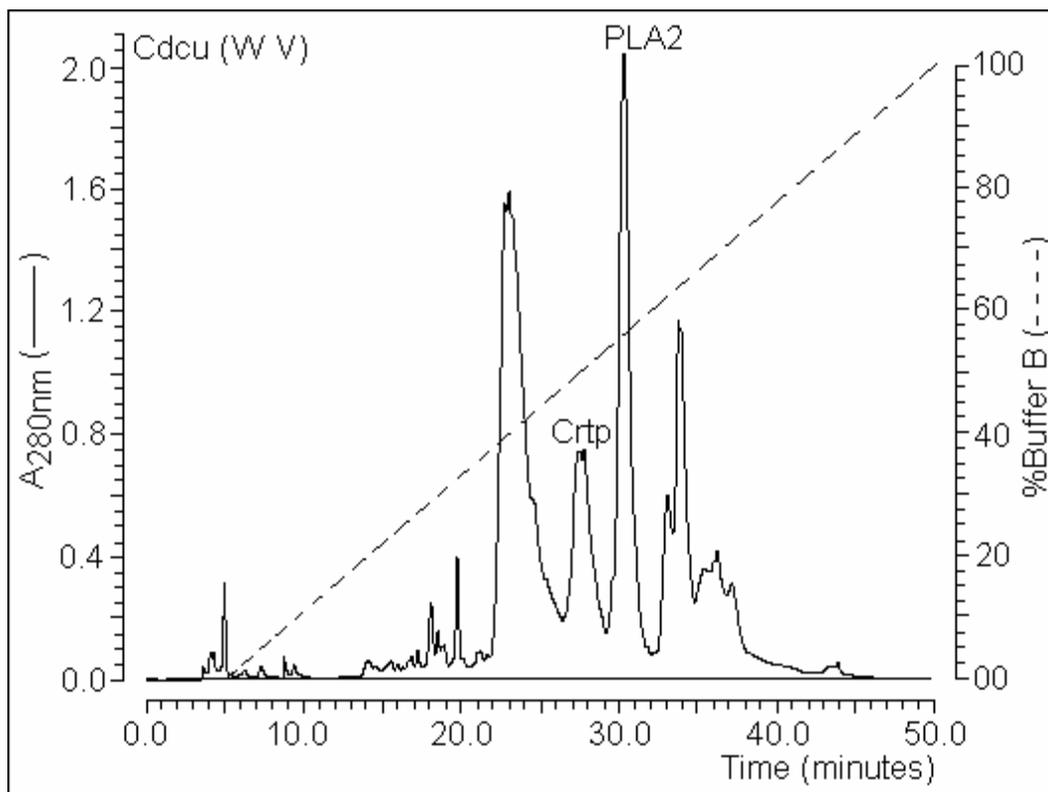


Figura 4. Fracionamento do veneno total de *C. d. cumanensis* através de cromatografia em sistema de HPLC, utilizando coluna de Fase Reversa (C-18 u-Bondapack 0,78 x 30 cm - Waters), evidenciando os picos de Crotapotina e PLA2.

#### **4.3 Isolamento das Fosfolipases A2 (PLA2) e Crotopotinas (Crtp).**

Após o isolamento, por exclusão molecular, da crotoxina do veneno total de *Crotalus durissus ruruima* e *Crotalus durissus cumanensis*, estas frações foram então repurificadas usando-se cromatografia em HPLC de fase reversa. Ambas crotoxinas foram fracionadas nas mesmas condições cromatográficas e que permitiram caracterizar as principais isoformas de PLA2 e Crotopotina . Na figura 5, observamos que o fracionamento por cromatografia de fase reversa da crotoxina de *Crotalus durissus ruruima* (Cd ru) mostrou a presença de três isoformas principais de Crotopotina (Crtp) e duas isoformas de PLA2 (PLA2 iso 1 e iso 2), que foram eluídas aos 30.6 minutos e 34.3 minutos respectivamente da corrida cromatográfica.

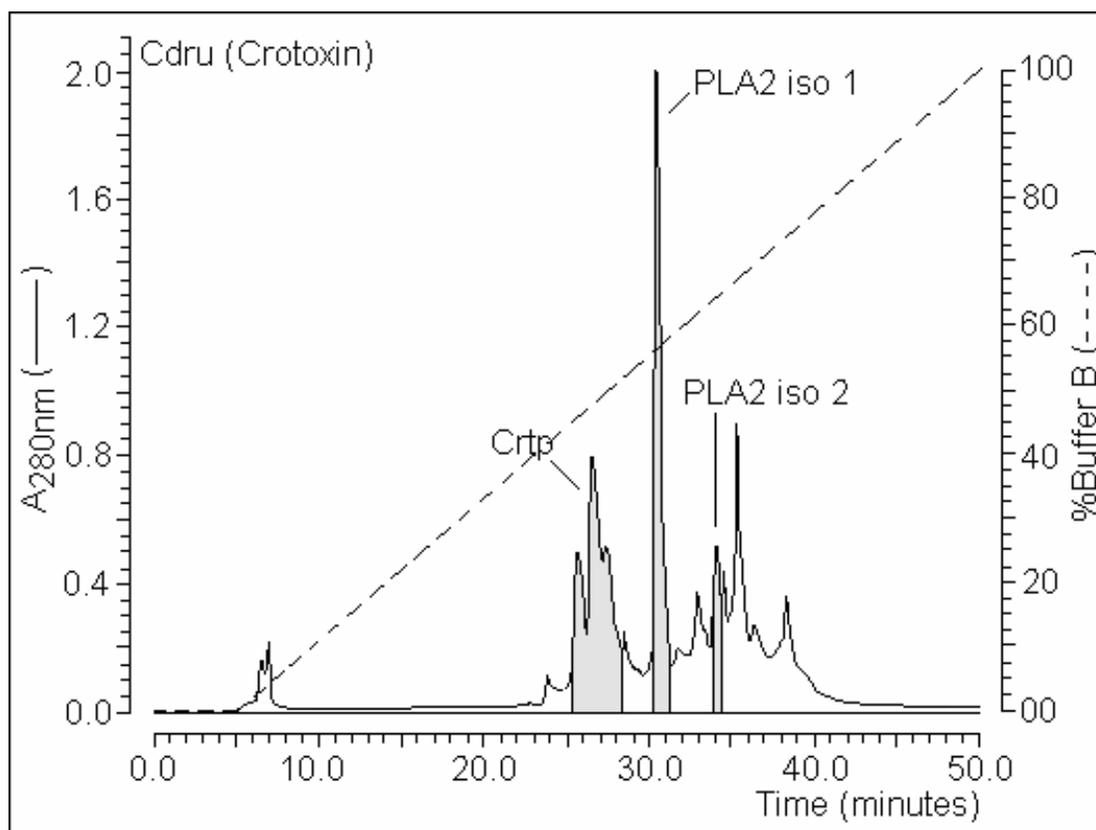


Figura 5. Fracionamento da crotoxina isolada de *C. d. ruruima*, através de cromatografia em sistema de HPLC, utilizando coluna de Fase Reversa (C-18 u-Bondapack 0,78 x 30 cm - Waters), evidenciando os picos de Crotopotina e PLA2.

O fracionamento da crotoxina do veneno total de *Crotalus durissus cumanensis* (Cd cu) em cromatografia de fase reversa mostrou a presença de uma forma majoritária de crotopotina e duas isoformas de PLA2, uma mais hidrofílica (PLA2 iso 1) e uma mais hidrofóbica (PLA2 iso 2) (Figura 6). A análise comparativa das duas crotoxinas em HPLC de fase reversa mostra que quantitativamente a crotoxina de *C. d. ruruima* apresenta uma concentração menor de PLA2 ou crotopotinas em comparação com as *C. d. cumanensis*.

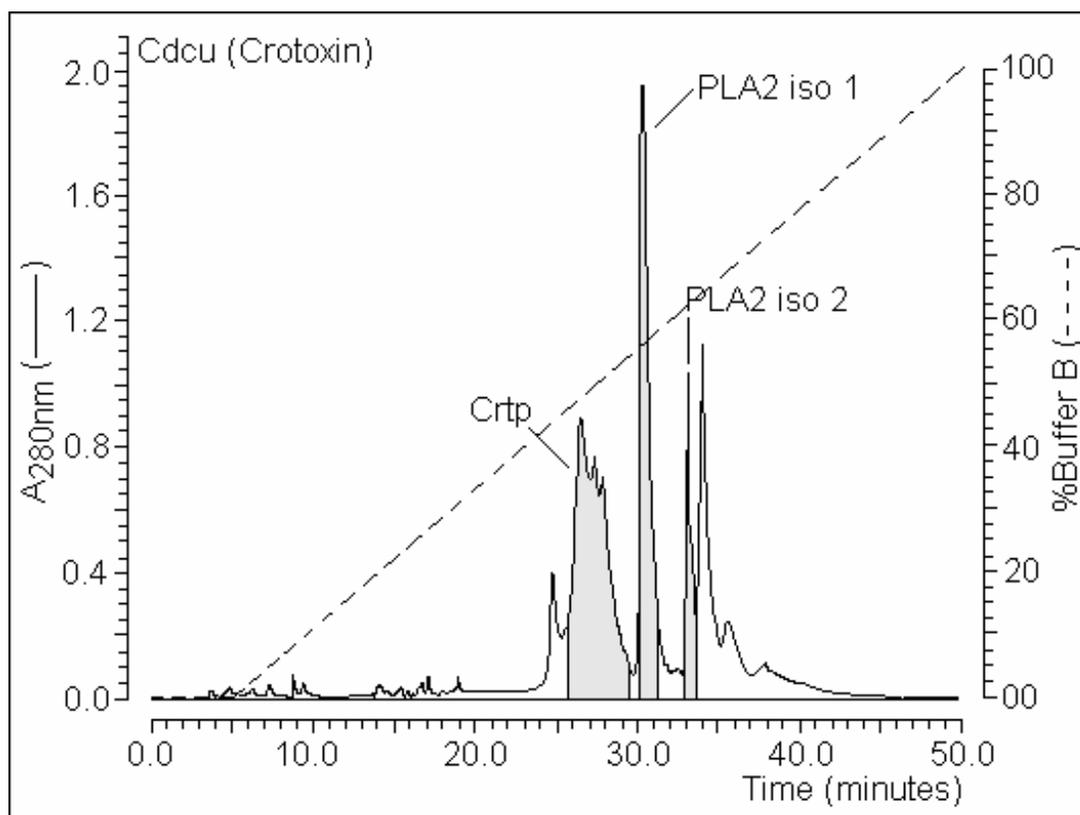


Figura 6. Fracionamento da crotoxina isolada de *C. d. cumanensis* através de cromatografia em sistema de HPLC, utilizando coluna de Fase Reversa (C-18 u-Bondapack 0,78 x 30 cm - Waters), evidenciando os picos de Crotopotina e PLA2.

#### 4.4 Eletroforese em PAGE-SDS

O veneno total e suas frações Crotoxina e PLA2 foram submetidos à análise em PAGE-SDS com e sem DTT. Os marcadores de massa molecular utilizados foram: fosforilase b (94 KDa), BSA (67 KDa), ovoalbumina (43 KDa), anidrase carbônica (30 KDa), inibidor de tripsina de soja (20,1 KDa) e  $\alpha$ -lactoalbumina (14,4 KDa). Na figura 7 são mostrados os perfis de massa molecular em PAGE-SDS a 12,5% do veneno de *C. d. ruruima* e suas frações Crotoxina, PLA2 em presença de DTT 1M e Crotapotina. A análise eletroforética do veneno mostra a presença de várias bandas eletroforéticas algumas com uma massa molecular próximas aos descritos para convulxina, também foi detectada a presença de uma banda eletroforética com uma massa molecular de 5kDa, que está próximo à massa molecular da crotamina. Além disso, a análise eletroforética da crotoxina mostra a presença de quatro bandas eletroforética principais, duas ao redor de 30 kDa, uma ao redor de 25 kDa e uma outra com uma massa molecular de 14kDa. As PLA2 e Crotapotinas, mostraram neste estudo eletroforético em PAGE-SDS a presença de uma única banca eletroforética ao redor de 15 KDa e 9 KDa, respectivamente. A presença de uma única banda eletroforética para as fosfolipases A2 e crotapotinas sugere um alto grau de homologia molecular (Fig. 7).

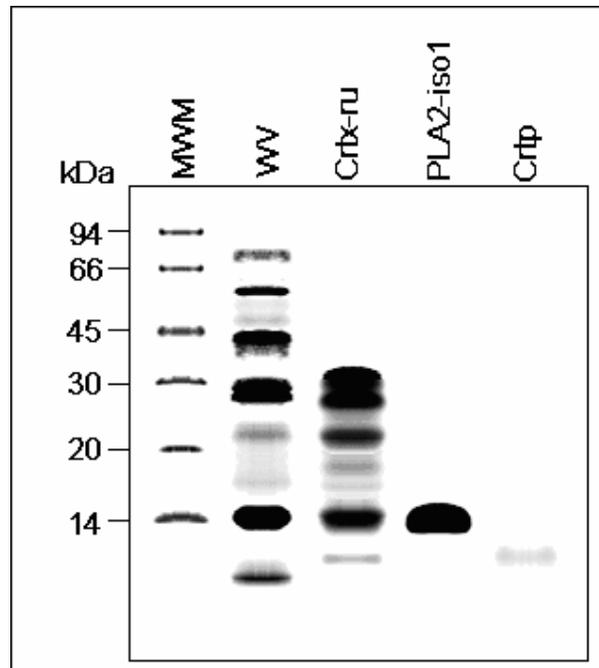


Figura 7. Perfil eletroforético do veneno de *C. d. ruruima* (WV), crotoxina (Crtx-ru), Fosfolipases A2 (PLA2-iso 1) e crotapotina (crtp) em PAGE-SDS 12.5%. A corrida eletroforética foi realizado usando-se voltagem constante de 70V para a corrida eletroforética.

A análise eletroforética das amostras provenientes do veneno total de *Crotalus durissus cumanensis* (WV), crotoxina (Ctx), fosfolipase A2 (PLA2) ou Crotapotina (Crtp) são mostrados na figura 8. De acordo com este perfil cromatográfico não se observa no veneno total a presença de Convulxina, que estaria na faixa de 70kDa, mas a análise também mostrou que o veneno total de *C.d. cumanensis* possui uma concentração acentuada de crotamina, maiores do que o observado no veneno total de *Crotalus durissus ruruima*. O perfil eletroforético da crotoxina mostra três bandas predominantes, uma ao redor de 30 KDa, uma ao redor de 25 KDa e a outra ao redor de 14 KDa várias bandas com menor concentração. Já a homogeneidade molecular da PLA2 e crotapotina está evidenciada na eletroforese, onde as PLA2 mostram uma massa molecular de 15 kDa aproximadamente e a Crtp uma banda de 9 kDa.

As massas moleculares para as PLA2 de *C. d. Ruruima* e *C. d. cumanensis* foram estimadas em aproximadamente 15 KDa para as PLA2 de ambos os venenos. A Crotoxina de ambos os venenos aparece com uma banda principal de aproximadamente 30, 25 e uma banda menor de 14 kDa. Provavelmente a banda de 14 kDa correspondam a PLA2, as banda aos redor de 30 kDa, são decorrentes da dimerização da PLA2 e a banda de 25kDa corresponderia ao heterodímero de PLA2+Crpt.

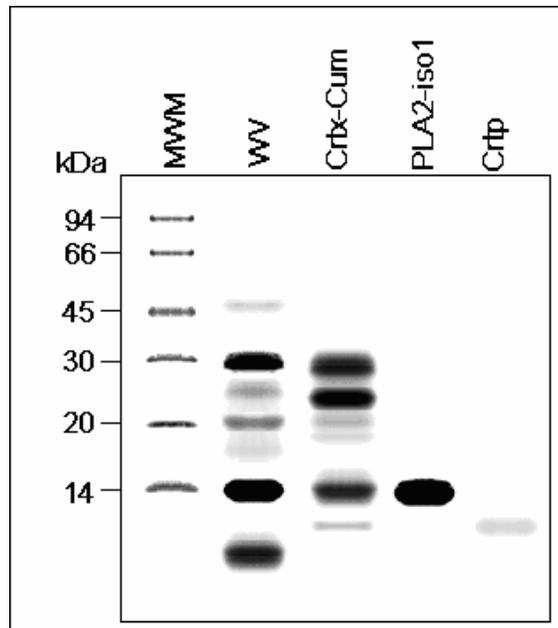


Figura 8. Perfil eletroforético do veneno de *C. d. cumanensis* (WV), crotoxina (Crtx-cum), Fosfolipases A2 (PLA2-iso 1) e crotopotina (crtp) em PAGE-SDS 12.5%. A corrida eletroforética foi realizado usando-se voltagem constante de 70V para a corrida eletroforética.

#### **4.5 *Espectrometria de massa.***

A análise por espectrometria de massa mostra que as amostras de PLA2 de *Crotalus durissus ruruima* e *Crotalus durissus cumanensis* mostram massas moleculares de 14599,5 Da e 13.989.14 Da, respectivamente. A análise também revela o grau de pureza da amostra que se apresentou como um único pico detectado (Fig 9a e 9b).

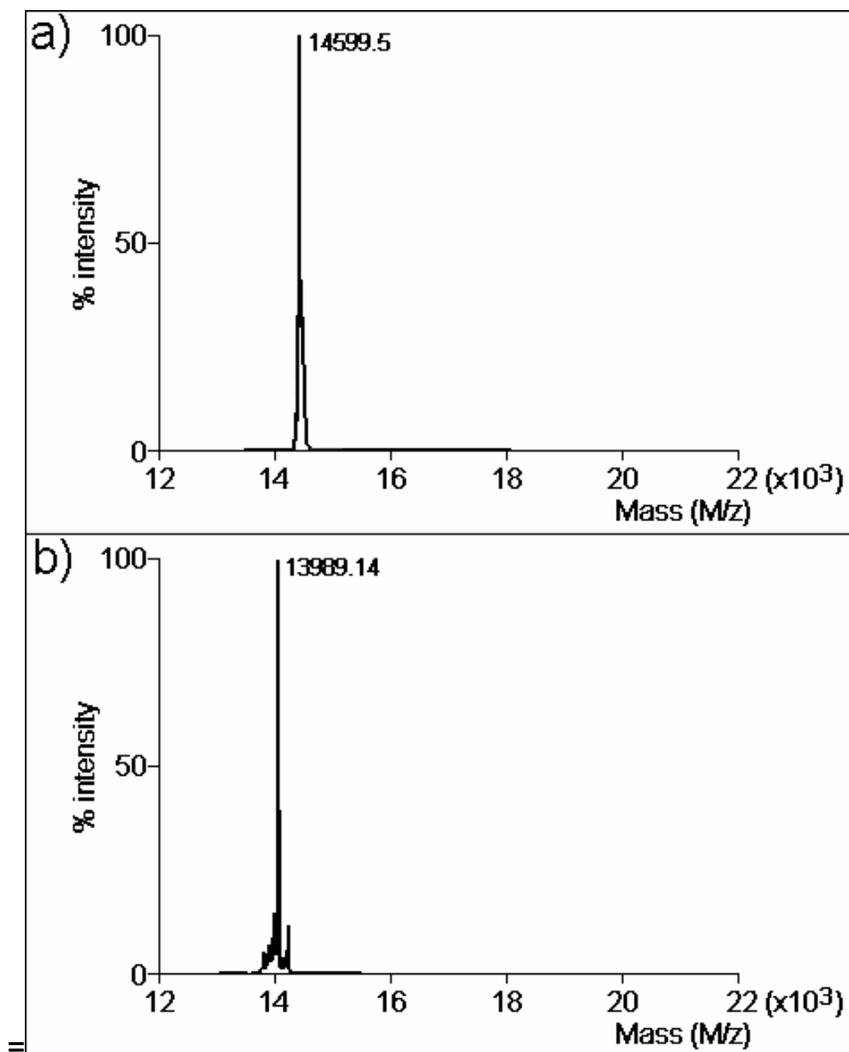


Figura 9. Determinação das massas moleculares das duas PLA2 iso1 de *Crotalus durissus ruruima* (a) e *Crotalus durissus cumanensis* (b). As massas no eixo X representam as massas moleculares x 1000. As amostras foram previamente passadas em um HPLC de fase reversa usando uma coluna C-18 capilar.

Nesta tese realizamos experimentos de incubação da PLA2 com a crotapotina para reconstituir o complexo crotoxínico, nestas condições as PLA2 e crotapotina foram incubadas usando uma razão equimolar de PLA2 e crotapotina. Nesta condições alíquotas do meio de incubação (tampão fosfato 0.05M, pH 7.5) foram recolhidas e aplicadas ao sistema de espectrometria de massa. A análise do perfil espectral do produto da incubação em espectrometria de massa mostrou a presença de três picos principais, um de crotapotina com uma massa molecular ao redor de 9 – 10 kDa, um de PLA2 com uma massa molecular ao redor de 14.5 kDa e um correspondendo a crotoxina com uma massa molecular estimada em 25 kDa aproximadamente (Figura 10).

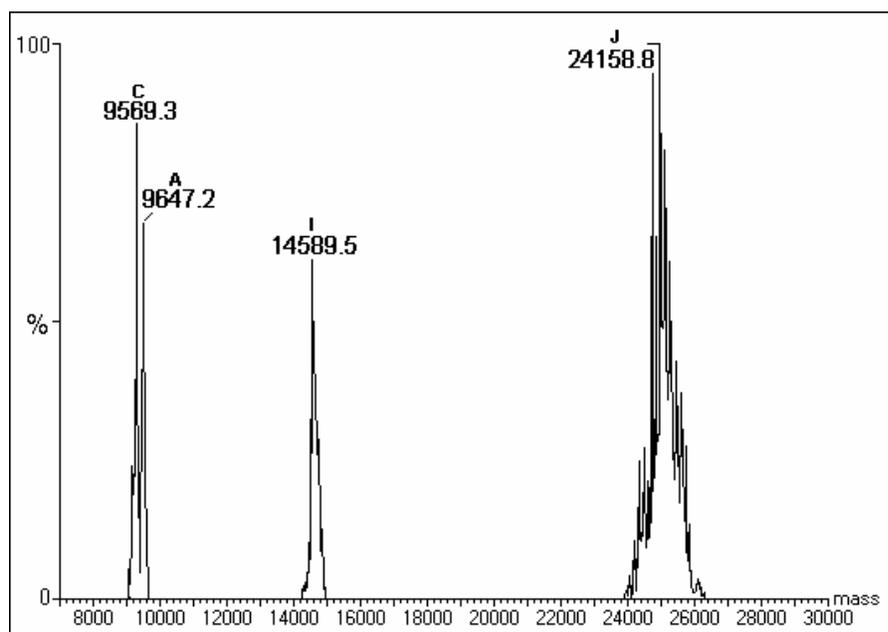


Figura 10. Espectrometria de massa do produto da incubação da PLA2 com a crotapotina. A incubação foi realizada a temperatura ambiente em presença do tampão fosfato (pH 7.5, 0.05M).

#### **4.6 Análise comparativa da atividade fosfolipásica A2 nos venenos de *C.d.r* e *C.d.c.***

As quantidades relativas de Crotoxina e PLA2 presentes nos dois venenos foram estimadas através do cálculo das áreas dos picos isolados em cromatografia é demonstrada na figura 11. As frações que contém Crotoxina parecem representar aproximadamente 60% do total de proteínas no veneno de *C. d. ruruima* e 50% do total de proteínas no veneno de *C. d. cumanensis*, calculados a partir da cromatografia de exclusão molecular. As frações que contém PLA2 parecem representar 46% e 27 % do total de proteínas dos venenos de *C. d. ruruima* e *C. d. cumanensis*, respectivamente.

Durante o processo de purificação do veneno total de *Crotalus durissus ruruima*, em cromatografia de exclusão molecular, e fase reversa foram realizados ensaios enzimáticos específicos para medição da atividade fosfolipásica A2 (Holzer e Mackessey 1996), cada experimento foi realizado com n=5. Os resultados apresentados na figura 12, mostramos que durante a exclusão molecular a fração que significativamente apresentou atividade PLA2 foi à fração III. Observamos também que as PLA2 iso1 (PLA2-1) e iso 2 (PLA2-2) mostraram uma significativa atividade PLA2, duas vezes maior do que a crotoxinas nativas. A adição de uma concentração equimolar de crotapotina (pico majoritário) coma as PLA2-1 e PLA2-2, reduziu em três vezes a atividade enzimática da PLA2-1 e PLA2-2 (Fig. 11).

Procedimento semelhante foi adotado para o veneno total de *C. d. cumanensis*, onde foram medidas as atividades enzimáticas PLA2 das frações II, III e IV, onde

somente a fração III, que representa a crotoxina mostrou uma atividade enzimática significativa (Fig. 12). Os resultados da análise PLA2 das frações provenientes do HPLC de fase reversa mostram que a PLA2 iso1 de *C. d. cumanensis* mostrou uma atividade comparativamente maior do que a PLA2 de *C.d. ruruima*, já em presença equimolar de crotopotina a atividade enzimática da PLA2 diminuiu cerca de três vezes em relação a PLA2 isolada (Fig. 13). Estes resultados sugerem que a crotopotina de *C.d. cumanensis* teria uma capacidade inibitória maior do que a crotopotina de *C. d. ruruima*.

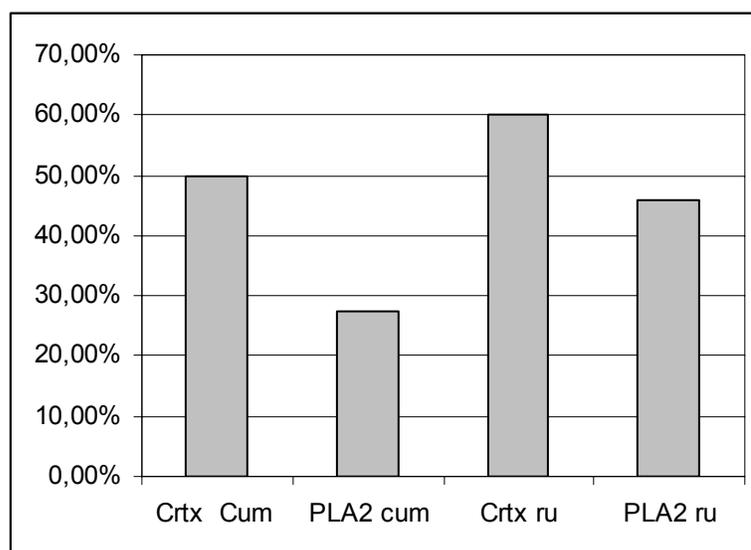


Figura 11. Comparativo das quantidades especifica dos constituintes dos venenos

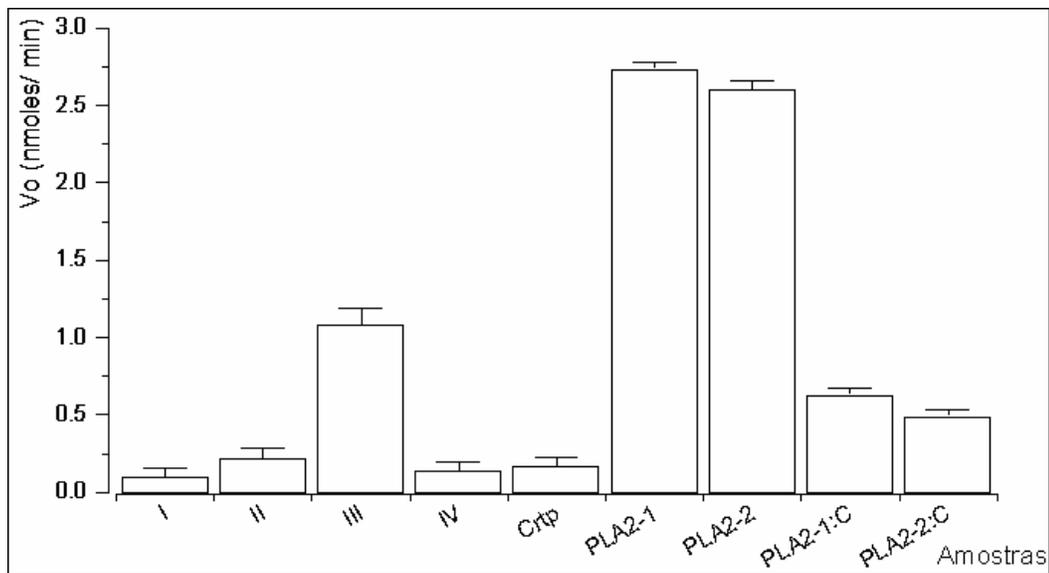


Figura 12: Comparativo da atividade específica para a fosfolipase apresentada pelos picos provenientes da purificação de *C. d. ruruima* através de exclusão molecular ( Picos I, II, III e IV), demais picos provenientes da purificação da Crotoxina de *C. d. ruruima* através de Fase reversa ( Crtp, PLA 2-1 e PLA2-2) e PLA 2 encubadas com Crtp (PLA 2-1C e PLA2-2C).

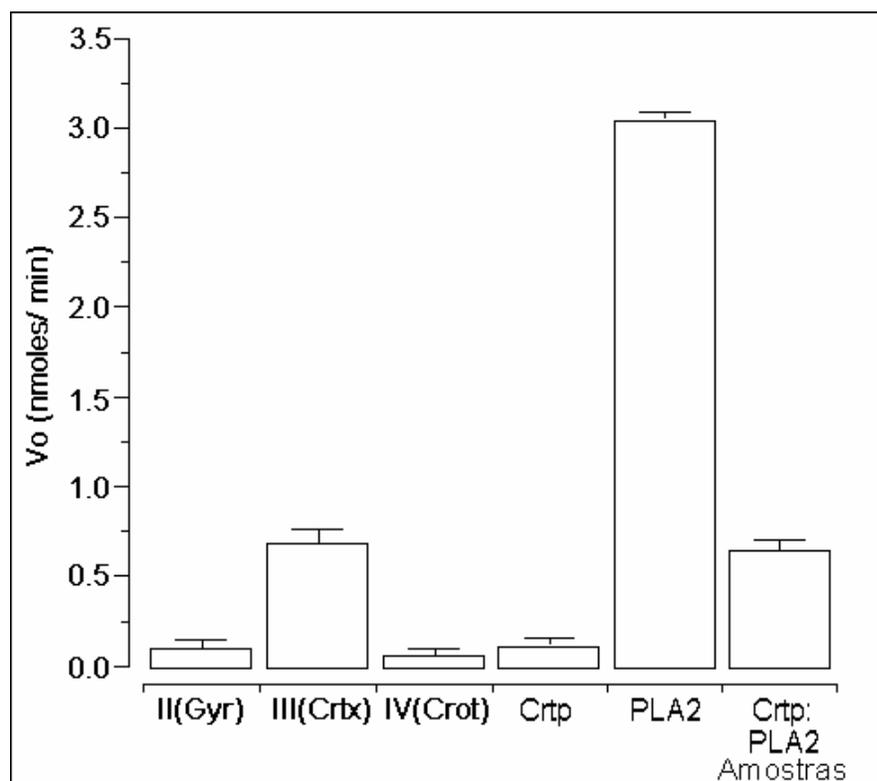


Figura 12: Comparativo da atividade específica para a fosfolipase apresentada pela Crotoxina provenientes da purificação de *C. d. cumanensis* através de exclusão molecular ( Pico III), demais picos provenientes da purificação da Crotoxina de *C. d. ruruima* através de Fase reversa ( Crtp, e PLA 2) e PLA 2 incubadas com Crtp (PLA 2-C).

**4.7 Análise da composição de aminoácidos das PLA2 dos venenos de *C.d.r* e *C.d.c.***

A análise de aminoácidos (tabela 2) mostra que as PLA2 de *C. d. ruruima* e de *C. d. cumanensis* possuem alto conteúdo de aminoácidos básicos (Lys, Arg) e a presença de 7 resíduos de ½ cisteína para a PLA2 de *C. d. ruruima* e 8 resíduos de ½ cisteína para a PLA2 de *C. d. cumanensis*.

Aminoácidos	PLA2-cum iso1	Aminoácidos	PLA2-ru iso1
Asp	13	Asp	11
Glu	09	Glu	10
Ser	06	Ser	05
Gly	14	Gly	16
His	02	His	04
Arg	07	Arg	10
Thr	06	Thr	05
Ala	07	Ala	05
Pro	06	Pro	05
Tyr	09	Tyr	10
Val	02	Val	05
Met	01	Met	01
Cys	07	Cys	08
Ile	05	Ile	05
Leu	08	Leu	07
Phe	04	Phe	02
Lys	13	Lys	12
Trp	01	Trp	01
Total	122	Total	122

Tabela 2. Composição de aminoácidos em determinada por PITC derivação de aminoácidos.

#### 4.8 Alinhamento da seqüência de Aminoácidos das PLA2 dos venenos de *C.d.r* e *C.d.c.* com outras PLA2.

A seqüência N-terminal dos resíduos de aminoácidos de *C. d. ruruima* e *C. d. cumanensis* pode ser observada na tabela 3, em alinhamento com outras seqüências de diferentes PLA2 de diferentes subespécies e demonstrou possuir alto grau de homogeneidade com as demais PLA2 dos venenos de serpentes do gênero *Crotalus*.

	10										20										30										
	H	L	L	Q	F	N	K	M	I	K	F	E	T	K	R	N	A	I	P	F	Y										
<i>Crotalus durissus cumanensis</i>	H	L	L	Q	F	N	K	M	I	K	F	E	T	K	R	N	A	I	P	F	Y										
<i>Crotalus duissus ruruima</i>	S	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	R	K	.	.	.	.	.	.	A	F	Y	G	C	Y	C	G	W	
<i>Crotalus durissus cascavella</i>	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	R	.	.	.	.	.	.	.	A	F	Y	G	C	Y	C	G	W	
<i>Crotalus durissus collilineatus</i>	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	R	.	.	.	.	.	.	.	A	F	Y	G	C	Y	C	G	W	
<i>Crotalus scutellatus</i>	.	.	.	.	.	.	.	.	.	E	.	.	G	K	.	.	.	.	.	.	.	A	F	Y	G	C	Y	C	G	W	
<i>Crotalus durissus terrificus</i> -F 17	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	R	K	.	V	.	.	.	.	A	F	Y	G	C	Y	C	G	W	
<i>Crotalus durissus terrificus</i> -F 15	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	R	K	.	V	.	.	.	.	A	F	Y	G	C	Y	C	G	W	
<i>Protobothrops mucrosquamatus</i>	N	.	.	.	.	.	.	.	.	I	M	.	.	K	.	.	.	.	.	.	.	S	S	Y	G	C	Y	C	G	W	
<i>Crotalus durissus terrificus</i> -F 16	S	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	R	K	.	V	.	.	.	.	A	F	Y	G	C	Y	C	G	W	
<i>Crotalus viridis viridis</i>	N	.	.	.	.	.	.	.	.	M	M	.	.	K	.	F	.	.	.	.	.	T	S	Y	G	C	Y	C	G	W	
<i>Trimeresurus flavoviridis</i>	N	.	.	.	.	.	.	.	.	I	M	.	.	K	.	G	F	.	.	.	.	T	S	Y	G	C	Y	C	G	W	
<i>Daboia russelli Pulchella</i>	S	.	E	.	G	.	.	.	L	E	.	.	G	.	L	.	.	S	.	S	S	Y	G	C	Y	C	G	W			
<i>Daboia russelli Pulchella 2</i>	S	.	E	.	G	.	.	.	L	E	.	.	G	K	L	.	.	S	.	S	S	Y	G	C	Y	C	G	W			
<i>Trimeresurus gramineus</i>	.	M	.	E	N	.	.	.	K	V	.	G	.	S	G	.	W	W	.	G	S	Y	G	C	Y	C	G	K			
<i>Gloydis blomhoffi</i>	.	.	.	R	.	.	.	.	K	M	.	G	K	E	P	V	I	S	.	A	F	Y	G	C	Y	C	G	S			
<i>Agkistrodon Halys Pallas</i>	.	.	.	R	.	.	.	.	K	M	.	G	K	E	P	V	V	S	.	A	F	Y	G	C	Y	C	G	S			
<i>Bothrops asper</i>	S	.	I	E	.	A	.	.	L	E	.	.	.	L	P	F	.	Y	.	T	T	Y	G	C	Y	C	G	W			
<i>Gloydis Halys</i>	S	.	.	R	.	.	.	.	K	M	.	G	K	E	P	V	V	S	.	A	F	Y	G	C	Y	C	G	S			
<i>Calloselasma rhodostoma</i>	.	.	.	E	T	.	.	I	K	M	.	.	Q	T	G	L	F	S	.	S	F	Y	G	C	Y	C	G	W			
<i>Echis coloratus</i>	.	Y	.	E	N	.	.	Y	O	K	.	G	K	F	.	.	I	A	.	S	N	Y	G	C	Y	C	G	W			
<i>Vipera ammodytes ammodytes</i>	S	.	E	.	G	M	.	.	L	G	.	.	G	K	.	P	L	T	S	.	S	F	Y	G	C	Y	C	G	V		
<i>Bothrops jararacussu</i>	D	.	W	.	G	Q	.	.	L	K	.	.	G	K	L	P	F	.	Y	.	T	T	Y	G	C	Y	C	G	W		
<i>Echis ocellatus</i>	S	V	I	E	.	G	T	.	.	I	E	.	G	.	S	P	F	.	.	.	T	S	Y	G	C	Y	C	G	L		
<i>Trimeresurus jerdonii</i>	.	W	.	R	E	.	.	.	E	A	.	G	K	E	P	L	T	T	.	L	F	Y	A	C	Y	C	G	W			
<i>Daboia russellii</i>	N	.	F	.	G	E	.	.	L	E	K	.	G	K	E	V	V	H	S	.	A	I	Y	G	C	Y	C	G	W		
<i>Vipera aspis aspis</i>	N	.	F	.	A	.	.	.	N	G	K	L	G	A	F	S	V	W	N	.	I	S	Y	G	C	Y	C	G	W		
<i>Bothrops insularis</i>	N	.	W	.	G	.	.	M	N	Y	V	M	G	Q	S	V	V	Y	K	.	F	Y	Y	G	C	Y	C	G	W		
<i>Crotalus atrox</i>	S	.	V	.	E	T	L	.	M	K	I	A	G	.	S	G	L	L	W	.	S	A	Y	G	C	Y	C	G	W		

Tabela 3. Comparação da seqüência N-terminal dos resíduos de aminoácidos das fosfolipases provenientes dos venenos de *C. d. ruruima*, *C. d. cumanensis* (PLA2 ru e PLA2 cu, respectivamente) e outras provenientes de venenos diferentes.

#### **4.9 Análise filogenética das PLA2 dos venenos de *C.d.r* e *C.d.c.*, em comparação com outra PLA2.**

O cladograma da figura 14 mostra as distâncias filogenéticas entre as PLA2 de *C. d. ruruima*, *C. d. cumanensis* e outras PLA2 do veneno de serpentes do gênero *Crotalus* e de outros gêneros. Sendo que, filogeneticamente a PLA2 de *C. d. ruruima* é mais próxima das PLA2 de *C. d. terrificus* e a PLA2 de *C. d. cumanensis* é mais próxima da Pla2 de *C. d. collilineatus*.

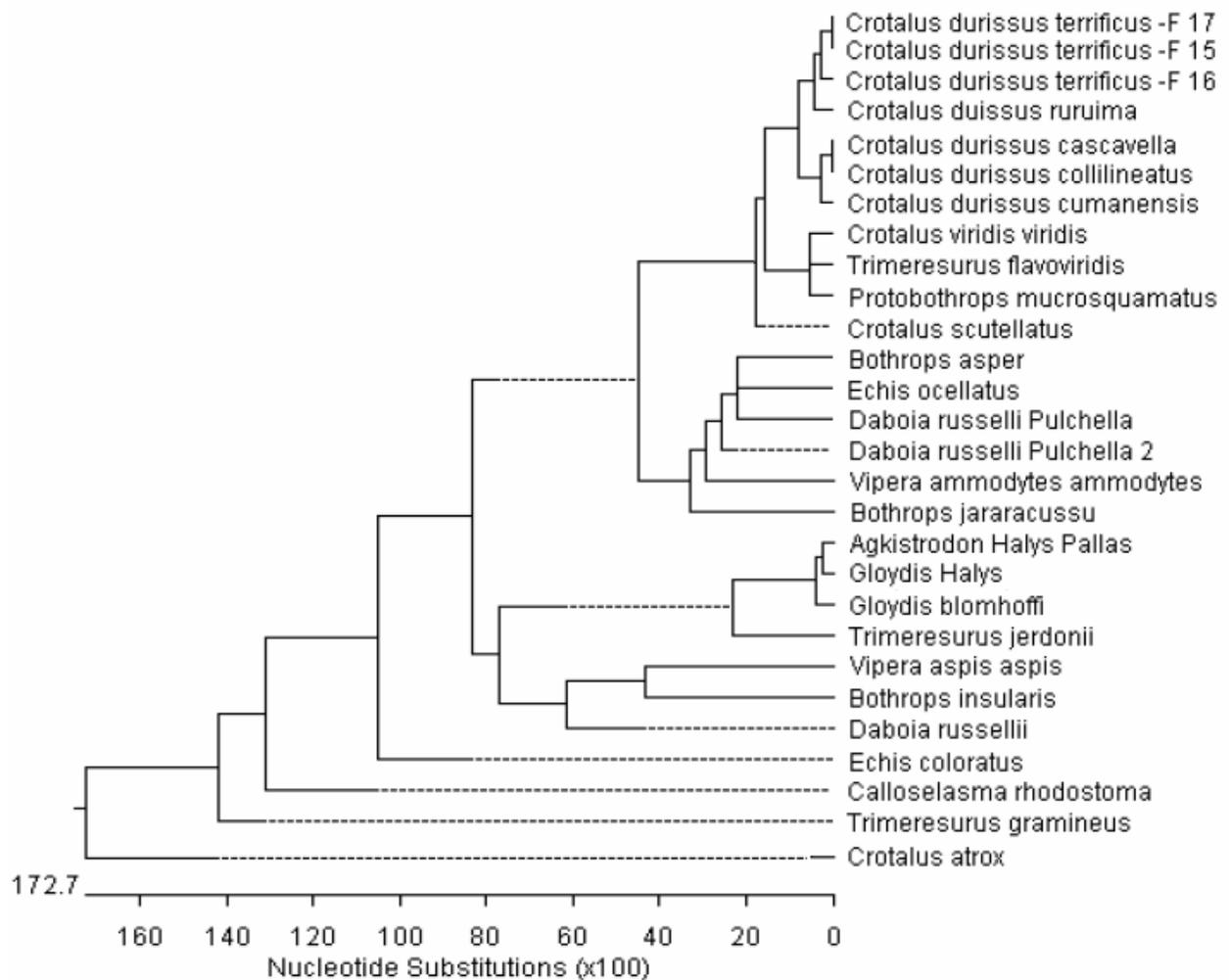


Figura 14. Cladograma das relações entre as PLA2 de *C. d. ruruima*, *C. d. cumanensis* e outras PLA2 provenientes de outros venenos.

#### **4.10 Análise por dicroísmo circular**

A análise das frações constituintes da crotoxina por dicroísmo circular mostra que as PLA2 iso1 e iso2 de *C. d. ruruima* mostram a presença de grande concentração de alfa hélice, seguida pela presença de folhas beta e uma significativa presença de random coils (Fig 15a). A análise da crotapotina (Crpt) contudo mostrou a presença discreta de estrutura em folha beta e predomínio de estruturas em random coil (Fig 15b).

A análise das frações constituintes da crotoxina por dicroísmo circular mostra que a PLA2 iso 1 apresentou grande concentração de alfa hélice, seguida pela presença de folhas beta e uma significativa presença de “random coils” (Fig 16a). A análise da crotapotina (Crpt) contudo mostrou a presença discreta de estrutura em folha beta e predomínio de estruturas em random coil (Fig 16b). Os resultados mostram que as PLA2 de *Crotalus durissus cumanensis* e *Crotalus durissus ruruima* apesar de apresentarem uma homologia seqüencial alta, mostram em solução estruturas secundárias discretamente distintas. Já as crotapotinas mostram umas estruturas secundárias muito próximas.

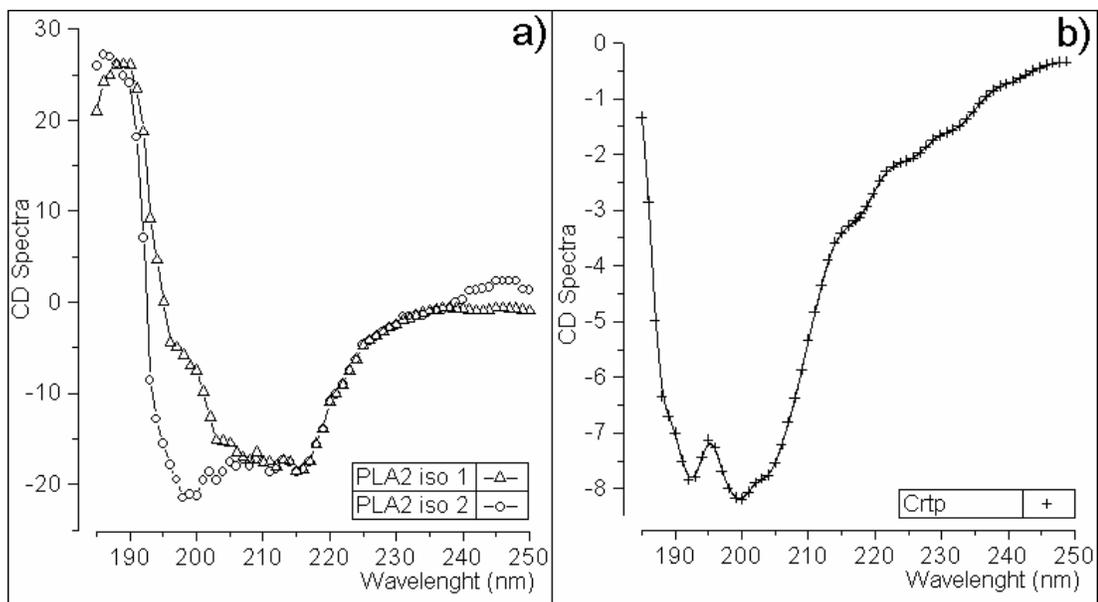


Figura 14. Em 15a, observamos os perfis espectrais das PLA2 e crotapotinas (15b) isoladas do complexo crotaxínico da *Crotalus durissus ruruima*. Os dados foram coletados em intervalos de 3nm entre os 185nm a 250nm.

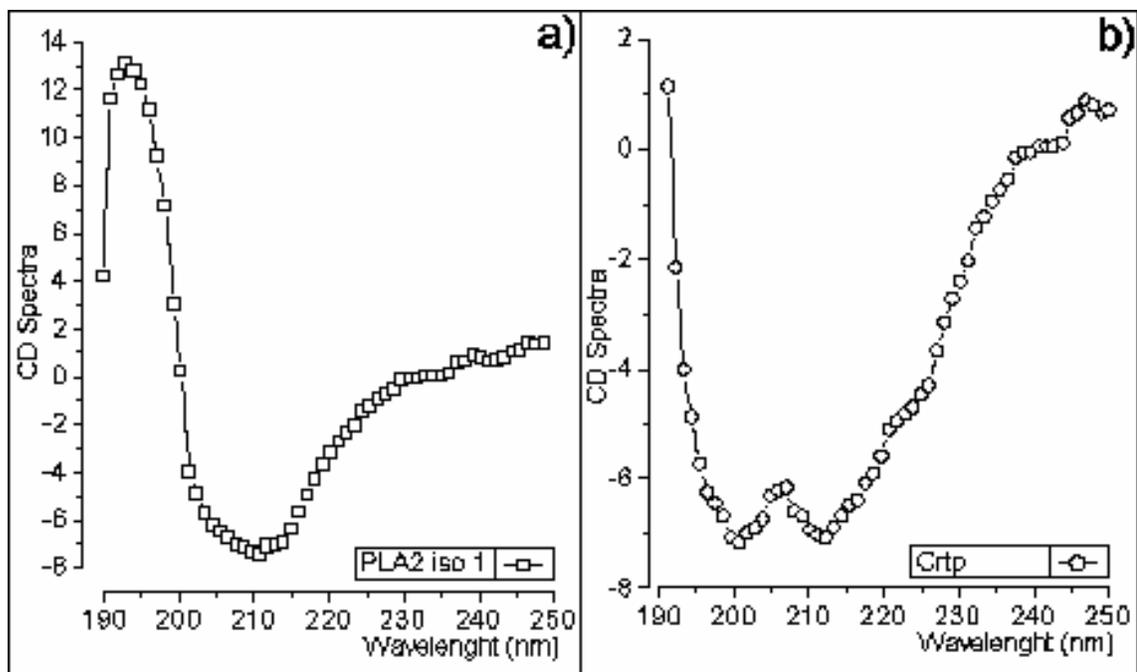


Figura 16. Em 16a, observamos os perfis espectrais das PLA2 e crotapotinas (16b) isoladas do complexo crotoxinico da *Crotalus durissus cumanensis*. Os dados foram coletados em intervalos de 3nm entre os 185nm a 250nm.

#### **4.11 Atividade neurotóxica dos venenos e Crotoxinas de *C.d.r* e *C.d.c*.**

As amostras dos venenos de *C. d. ruruima* e *C. d. cumanensis*, assim como as frações crotoxina de cada veneno, foram analisadas através de ensaios sobre preparações músculo diafragma e nervo frênico músculo diafragma de camundongos, para demonstrar os efeitos da estimulação direta e indireta. As figuras 17 e 18 mostram o efeito do veneno total de *C. d. ruruima* e *C. d. cumanensis* quando o músculo foi estimulado de maneira indireta e direta, respectivamente; em ambas as figuras podem observar que o veneno de *C. d. cumanensis* provoca um efeito facilitador da contração muscular, com um posterior bloqueio. Já a figura 19 mostra o efeito neurotóxico da Crotoxina de *C. d. ruruima* e *C. d. cumanensis* quando o músculo foi estimulado de maneira indireta, nesta figura não é possível ver o mesmo efeito facilitador provocado pelo veneno de *C. d. cumanensis*. A estimulação direta foi controlada com a utilização de Brometo de Pancurônio, um bloqueador que se liga aos receptores na placa motora impedindo a transmissão de sinal nervoso por frações do nervo, que por ventura não tenham sido retirados. Em todos os casos pode-se observar que existe um bloqueio dose dependente irreversível das contrações musculares e que o material utilizado para os testes, tanto o veneno como a crotoxina, são mais neurotóxicos na *C. d. cumanensis* do que na *C. d. ruruima*.

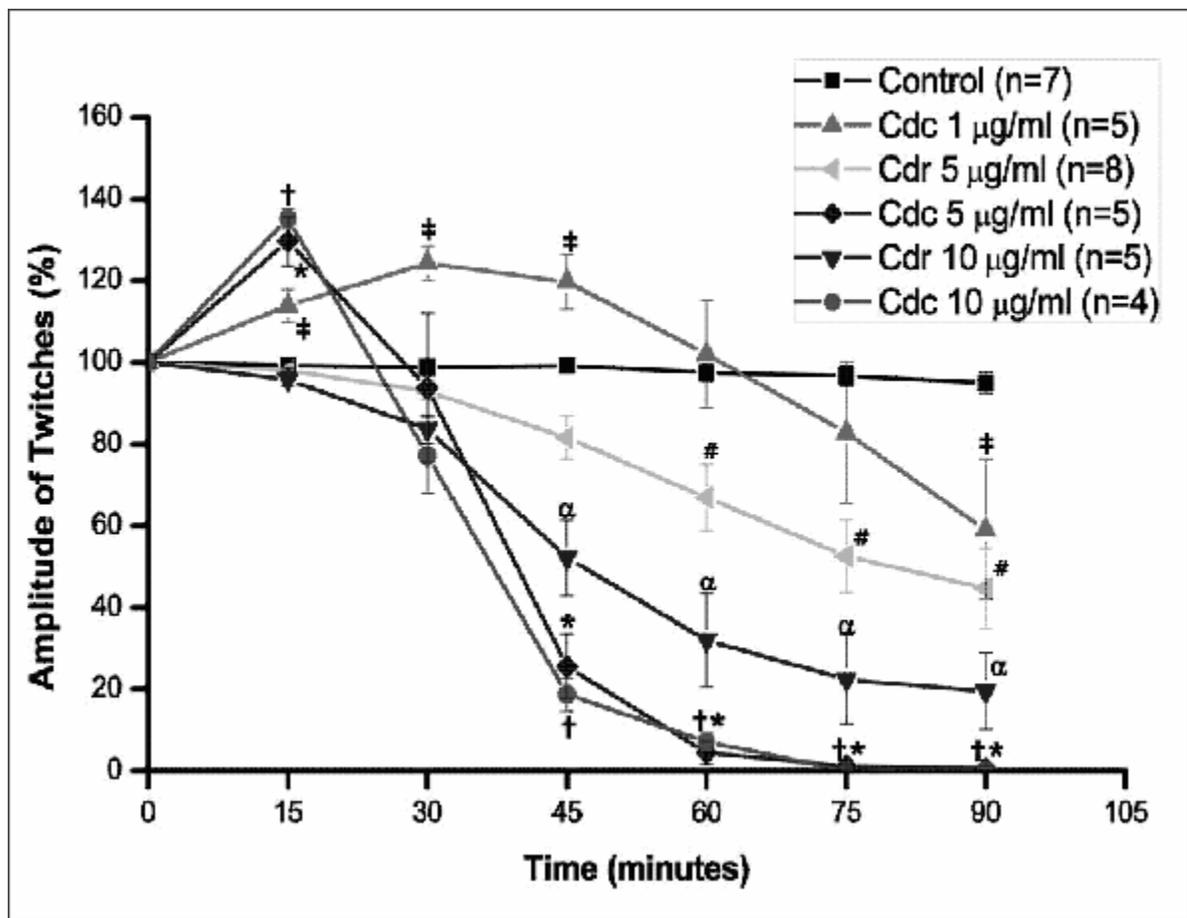


Figura 17. Efeito dos venenos de *C. d. ruruima* e *C. d. cumanensis* na estimulação indireta de contração através de preparação do nervo frênico do diafragma de camundongo. O eixo das ordenadas representam a % de amplitude das contrações em relação à amplitude da contração inicial. O eixo das abscissas indica o tempo (min) após a adição de cada veneno ao banho. Os pontos do gráfico são representados por suas médias e desvio padrão para n= 4 – 8 experimentos. ‡, #, \*,  $\alpha$  e † indicam, respectivamente o ponto no qual as diferenças para cada veneno e dose (Cdc 1 µg/ml, Cdr 5 µg/ml, Cdc 5 µg/ml, Cdr 10 µg/ml and Cdc 10 µg/ml) tornam-se significantes em relação ao controle ( $P < 0.05$ ).

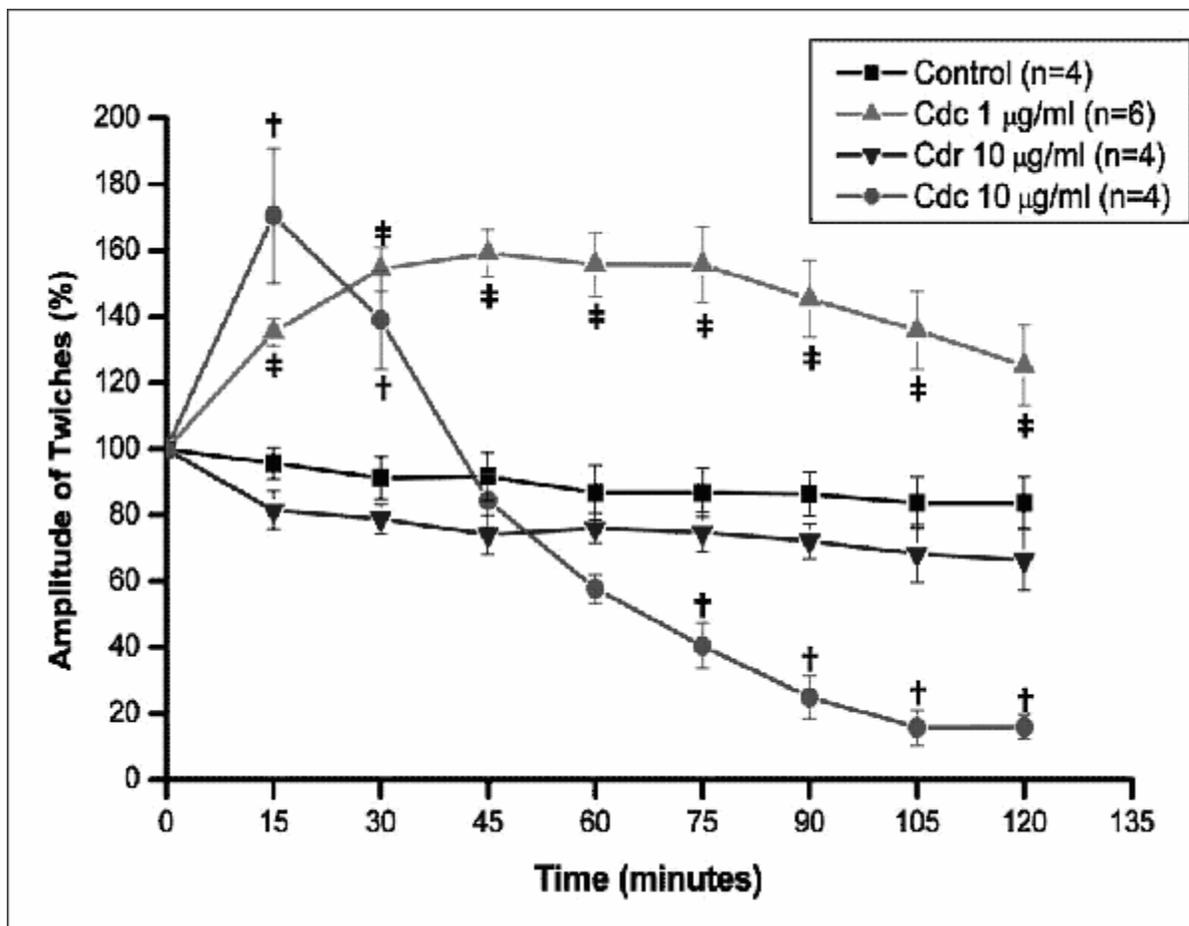


Figura 18. O efeito do veneno de *Crotalus durissus ruruima* and *Crotalus durissus cumanensis* na estimulação direta de contração através de preparação do nervo frênico do diafragma de camundongo. O eixo das ordenadas representam a % de amplitude das contrações em relação à amplitude da contração inicial. O eixo das abscissas indica o tempo (min) após a adição de cada veneno ao banho. Os pontos do gráfico são representados por suas medias e desvio padrão para n= 4 – 6 experimentos. ‡ e † indicam, respectivamente o ponto no qual as diferenças para cada veneno tornam-se significantes em relação ao controle ( $P < 0.05$ ).

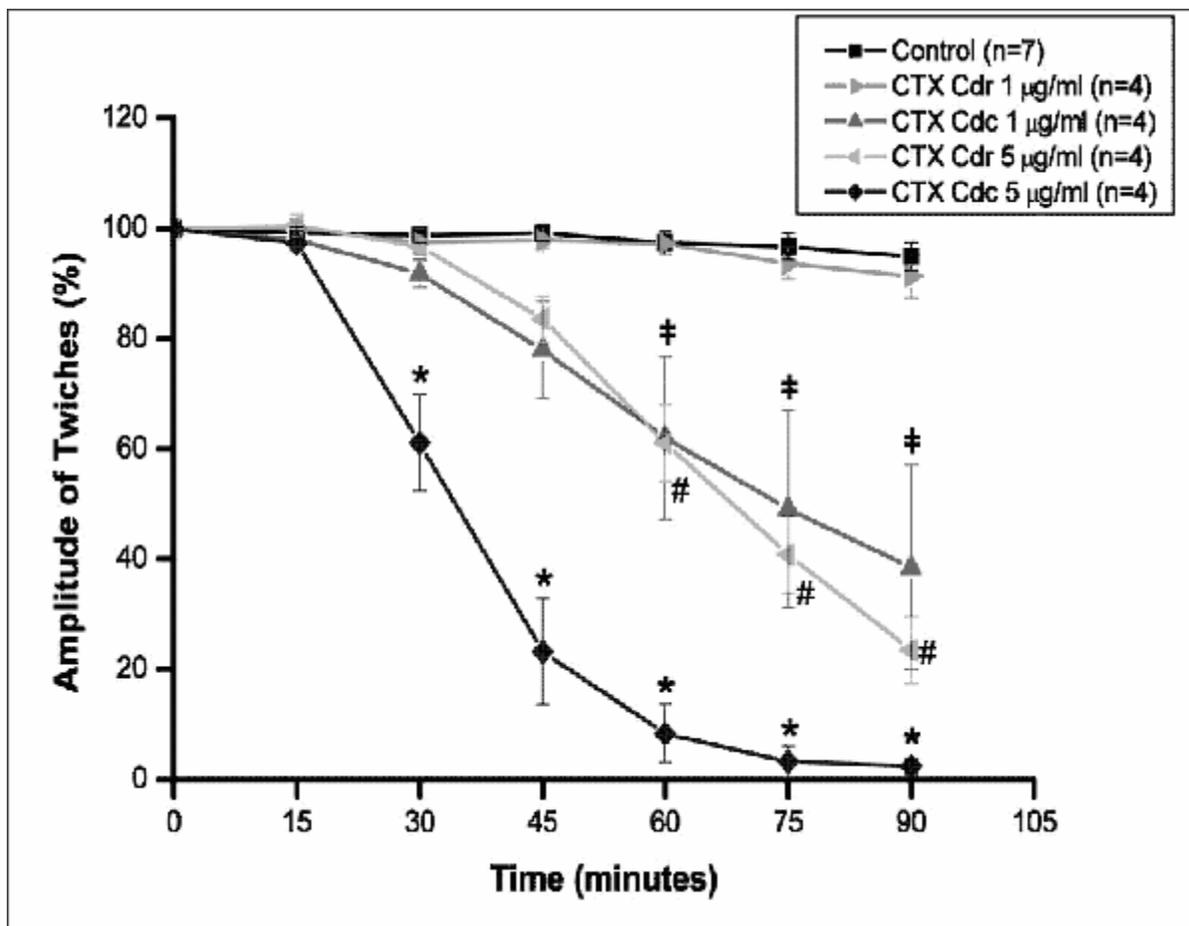


Figura 19. Efeito das crotoxinas de *C. d. ruruima* e *C. d. cumanensis* na estimulação indireta de contração através de preparação do nervo frênico do diafragma de camundongo. O eixo das ordenadas representam a % de amplitude das contrações em relação à amplitude da contração inicial. O eixo das abscissas indica o tempo (min) após a adição de cada veneno ao banho. Os pontos do gráfico são representados por suas médias e desvio padrão para n= 4 – 7 experimentos. ‡, # e \* indicam, respectivamente o ponto no qual as diferenças para cada crotoxina e dose (CTX Cdc 1 µg/ml, CTX Cdr 5 µg/ml, CTX Cdc 5 µg/ml) tornam-se significantes em relação ao controle (P < 0.05).

## 5. DISCUSSÃO

A atividade tóxica promovida em um acidente ofídico e suas alterações bioquímicas, toxicológicas, fisiológicas e farmacológicas é resultado do sinergismo de várias proteínas que irão atuar nos diferentes sistemas do organismo. Até mesmo em uma única espécie, os componentes do veneno são encontrados de forma diversificada, de acordo com fatores ontogenéticos, sazonais, interpopulacional, intrapopulacional e até mesmo fatores individuais (Chippaux et al., 1991). A existência em um mesmo veneno de diversas isoformas de proteínas de uma mesma família, diferindo umas das outras em seu efeito farmacológico, refletem a duplicação de genes e a aceleração da evolução Darwiana (Calvete, J. J., et al., 2003; Tani, A., et al., 2002; Moura-Da-Silva, A. M., et al., 1996 and Deshimaru, M., et al., 1996). Neste sentido, desenvolvemos o trabalho com estes dois venenos de *C. d. ruruima* e *C.d cumanensis* para caracterizar as diferenças entre o veneno destas serpentes com de outras serpentes crotálicas de regiões tropicais. O nosso objetivo foi centrado na crotoxina, uma vez que é a principal fração presente no veneno. A cromatografia de exclusão molecular em HPLC mostra que tanto o veneno total de *Crotalus durissus ruruima* como o veneno de *Crotalus durissus cumanensis* mostram diferenças significativas com o veneno total de *Crotalus durissus terrificus* (Oliveira DG et, al. 2002), um aspecto comum nestes venenos foi à pequena quantidade ou ausência de convulxina e uma concentração elevada de crotamina, mesmo assim ambos os venenos possuem como fração predominante a crotoxina. As frações que contêm crotoxina aparecem em ambos os casos como um pico majoritário (pico III), com aproximadamente 60 % do total de proteínas para o

veneno da *C. d. ruruima* e um único e majoritário pico (pico III) que contabiliza para aproximadamente 50% do total de proteínas do veneno da *C. d. cumanensis*. Desta forma é possível atribuir a estes venenos um forte caráter neurotóxico e mionecrótico, mas praticamente desprovido de atividade proteolítica.

A análise do perfil cromatográfico em HPLC de fase reversa mostrou também diferenças em relação aos constituintes básicos do complexo crotoxinico (PLA2 e Crtp), tanto de um veneno em relação ao outro ou destes em relação ao veneno total de *Crotalus durissus terrificus* (Hernandez- Oliveira et, al. 2005).

Observa-se, contudo que a crotoxina do veneno total de *Crotalus durissus cumanensis* possui uma concentração significativamente maior de crotopotina em relação aos venenos de *C.d. terrificus* e *C.d. ruruima*. Uma outra diferença significativa entre as crotoxinas de *C.d. ruruima* e *C.d. cumanensis* é a presença de duas isoformas distintas de PLA2, uma de caráter mais hidrofílico semelhante as PLA2 de *C.d. terrificus*. Além disso, em ambos os venenos têm a presença de um grupo relativamente homogêneo de crotopotinas, já no caso da *C.d. terrificus* observamos a presença de duas ou mais isoformas nitidamente separadas.

A homogeneidade e massa molecular de ambas as fosfolipases foram confirmadas por cromatografia de fase reversa (Sistema de HPLC), eletroforese em PAGE-SDS e espectrometria de massas, ambas as PLA2 podem ser observadas em nova cromatografia de fase reversa como um único pico e em gel de eletroforese como uma única banda de aproximadamente 14KDa (fig 7 e 8) . Os resultados de

espectrometria de massa (Hernandez- Oliveira et, al. 2005) demonstraram uma massa molecular aparente de 14599,5 Da para PLA2 ru e 13989,14 para PLA2 cum. A crotoxina nativa, de *C. d. r.* submetida à eletroforese em SDS-PAGE (Fig 7), resultou em três bandas distintas, com massa molecular estimada em aproximadamente 30 KDa, 28 KDa e uma mais forte e evidente com aproximadamente 15 Kda. A mesma crotoxina do veneno de *C. d. ruruima* submetida à espectrometria de massa em MALDI-TOF (Fig 10) pode ser observada como três sinais distintos, é observado um sinal para uma isoforma de crotapotina de 9569,3 Da; um sinal para PLA2 ru de 14589,5 Da e um sinal para o complexo crotoxina de 24,158,8 Da. Isso, portanto sugere que a interação da crotapotina com a PLA2 não é muito estável e depende principalmente de forças de interação muito fracas, que são facilmente quebradas. Estes resultados sugerem que uma solução contendo crotoxina é composta pelo complexo crotoxina e por suas subunidades livres.

A análise comparativa da atividade enzimática das crotoxinas mostra que existem diferenças significativas entre a atividade PLA2 da crotoxina isolada do veneno total de *C.d. ruruima* e *C.d. cumanensis*. Observamos que a crotoxina de *C. d. ruruima* é mais ativa que a crotoxina de *C. d. cumanensis*. Este quadro é invertido ao observarmos a atividade enzimática medida para as PLA2 isoladas (fig 12 e 13). Avaliamos também a atividade inibitória da crotapotina destes dois venenos e podemos observar que a crotapotina de *C. d. cumanensis* possui maior atividade inibitória que a crotapotina de *C. d. ruruima*. Como a PLA2 é a principal toxina do veneno, e o componente tóxico da crotoxina, esta diferença relativa nas quantidades de crotoxina e

de PLA2 destes dois venenos pode ser entendida como uma compensação pela baixa atividade enzimática demonstrada pela PLA2, e pela Crotoxina do Veneno de *C. d. ruruima*.

A composição de aminoácidos (tabela 2) demonstra que a PLA2 ru e PLA2 cu são ricas em resíduos de aminoácidos com caráter básico e hidrofílico e que PLA2 ru possui 7 resíduos de cisteína e a PLA2 cu possui 8 resíduos de cisteína. O resíduo N-terminal da PLA2 ru é S e sua seqüência para os primeiros 24 aminoácidos, determinados por sequenciamento automático de Edman é SLLQFNKMIKFETRKNAIPFYAFYGCYCG e o resíduo N-terminal da PLA2 cu é H e sua seqüência N-terminal para os primeiros 20 resíduos de aminoácidos é HLLQFNKMIKFETKRNAIPFY (tabela 3). As seqüências N-terminais das PLA2s de *C. d. ruruima* e *C. d. cumanensis* demonstraram uma alta homologia quando alinhada com outras seqüências N-terminais de PLA2 de outros venenos crotálicos. A pequena diferença observada na composição das seqüências N-terminais pode ser entendida como sendo responsável pela diferença na atividade das PLA2s e conseqüentemente, por representar a principal toxina do veneno, na atividade das crotoxinas e dos venenos, de *C. d. ruruima* e *C. d. cumanensis*.

A análise comparativa das seqüências foi conduzida através da comparação das seqüências N-terminais de *C. d. ruruima* e *C. d. cumanensis* com outras seqüências N-terminais de PLA2s dos venenos de serpentes de diferentes espécies. A filogenia resultante (Fig 13) indica que estas PLA2 são membros da família IIA de fosfolipases. A

análise estrutural revela que resíduos altamente conservados em PLA2 crotálicas, pertencentes ao grupo IIA, são também conservados para as PLA2 de C.d.r. e C.d.c..

Baseado na análise filogenética *C.d.r.* parece ter um relacionamento mais próximo com a *C. d. terrificus* do que com a *C.d.cumanensis* que por outro lado parece ser mais relacionada com a *C. d. cascavella* e com a *C. d. collilineatus*. Interessantemente a *C. d. cumanensis* já foi uma vez classificada erroneamente como *C. d. terrificus*. A análise filogenética de fosfolipases vem sendo extensamente utilizada para examinar relações evolutivas entre PLA2 de várias espécies animais (Dutton and Hider, 1983; Tamiya and Yagi, 1985; Kostetsky et al., 1991; Slowinski et al., 1997; Tsai, 1997). Slowinski et al. (1997) comparou a seqüência de aminoácidos das PLA2 de 25 espécies de elapidos em 14 gêneros e seus resultados suportam a divisão das elapidos examinadas em grupos irmãs entre as espécies marinhas e australianas e as espécies asiáticas e africanas, seus resultados também foram confirmados por seqüência de DNA (Keogh, 1998). Entretanto até o presente estágio da análise das PLA2 ru iso 1 e PLA2 cum iso 1, esta comparação filogenética tem o propósito de classificar a enzima. Uma relação mais detalhada entre estas PLA2s e outras PLA2s de outras serpentes será obtida quando a seqüência completa se tornar disponível.

Os resultados da análise da estruturação secundária das PLA2 (fig 15 e 16) mostram alguns aspectos comuns como a presença de alta concentração de alfa-hélice e random coils e seguida por estrutura em folhas beta, mas a análise também mostra discreta diferença, entre as PLA2 de *C. d. ruruima*, já as crotapotinas possuem uma

estruturaco secundária semelhante, com alta concentrao de estruturas randômicas, poucas estruturas em folha Beta e quase ausência de estrutura em alfa hélice.

A despeito da diversidade de origens, três regiões nas PLA2s das classe I e II retm significativamente um alto grau de homologia na seqncia de aminoácidos. Estas regiões contribuem para a formao de elementos estruturais secundários e terciários, altamente conservados, incluindo a hélice N-terminal (resíduos 1 - 12) o sítio de ligao para o cálcio (resíduos 25 - 33) e a região do sítio ativo junto com os aminoácidos que do forma ao canal hidrofóbico que se liga às cadeias de ácido graxo do fosfolipídio(Damico et al. 2005).

A análise estrutural das enzimas fosfolipsicas de origem pancreática, ou de venenos demonstraram que o N-terminal e outras estruturas alfa-hélice são importantes para a formao do canal hidrofóbico, que  responsável pela atividade enzimática catalítica(Scott et al., 1991 and Arni and Ward, 1996).

Para as classes I e II de PLA2, próximo ao canal hidrofóbico existe um loop de ligao para o cálcio, que  estritamente responsável pela ligao do cálcio (Rigden et al., 2002). A estrita dependência de cálcio para a atividade catalítica da PLA2 de veneno foi bem caracterizada (Pieterse et al., 1974, Toyama et al., 2003) e conseqüentemente a substituio do ion cálcio ( $Ca^{2+}$ ) por outros cátions divalentes contribuem muito pouco para atividade desta enzima.

O grupo de ligao para o cálcio  definido pelo átomo de cálcio e por cinco aminoácidos na proteína (Tyr28, Gly 30, Gly 32, Asp 49 e Asp 99), a correta orientao

molecular do íon cálcio ( $Ca^{2+}$ ) no loop de ligação para o cálcio e no sítio catalítico é crucial para a atividade enzimática destas enzimas. A ligação efetiva dos fosfolipídios, com este sítio depende da correta coordenação do grupo de cálcio, com alguns resíduos de aminoácidos e com o grupo do fósforo do fosfolipídio (Ridgen et al., 2002). Assim a substituição do cálcio por outros cátions divalentes induz uma pequena modificação na estrutura secundária desta enzima e conseqüentemente um decaimento na atividade enzimática (Chu et al., 2005).

As atividades farmacológicas dos venenos totais e de suas crotoxinas são avaliadas neste estudo através da comparação de seus efeitos na contração muscular, utilizando preparação músculo-nervo frênico diafragma “in vitro” (Gallacci et al., 2006).

Ambos os venenos e suas crotoxinas induzem efeitos dependentes da concentração de bloqueio irreversível na contração por estímulo indireto, impedindo a transmissão sináptica na placa motora. Entretanto apenas o veneno de *C. d. cumanensis* promove efeito dependente da concentração de bloqueio irreversível da contração por estímulo direto, provavelmente por causar destruição celular, e este efeito é sempre precedido por uma facilitação na contração muscular, tanto para a contração por estímulo direto quanto para a contração por estímulo indireto. O tempo necessário para que o veneno de *C. d. cumanensis*, produza bloqueio de 50% ( $t_{1/2}$ ) na amplitude da contração muscular por estímulo indireto (Fig 17), varia de acordo com a concentração aplicada e é de 87.11 min  $\pm$  8.8 (1 $\mu$ g/ml) e 36.47 min  $\pm$  1.76 (10 $\mu$ g/ml), para a contração por estímulo direto (Fig 18) é de 70.5 min  $\pm$  6.8 (10  $\mu$ g/ml) e superior a 120 min (1 $\mu$ g/ml). Para o veneno de *C. d. ruruima*,  $t_{1/2}$  é de 90 min  $\pm$  4.3 (5 $\mu$ g/ml), e é

de 53.79 min  $\pm$  8.58 (10 $\mu$ g/ml) para a contração por estímulo indireto (Fig 17) e para a contração por estímulo direto (Fig 18) não é capaz de apresentar bloqueio significativo, sendo superior a 120 min (10 $\mu$ g/ml).

O efeito das crotoxinas (Fig 19) foi testado para a contração por estímulo direto e apresenta padrão dose-resposta parecido ao padrão apresentado pelos venenos totais. A crotoxina do veneno de *C. d. cumanensis* mostra-se mais ativa e  $t_{1/2}$  é de 68,3 min  $\pm$  7.8 % (1 $\mu$ g/ml) e 33.8 min  $\pm$  4.9 % (5 $\mu$ g/ml), a resposta para a crotoxina de *C. d. ruruima* ocorre, em 64,7min  $\pm$  6.3 (5 $\mu$ g/ml), próxima à resposta para  $t_{1/2}$  da Crotoxina de *C. d. cumanensis* (1 $\mu$ g/ml) a crotoxina de *C. d. ruruima* não apresenta resposta significativa quando em concentração de 1 $\mu$ g/ml.

## 5 CONCLUSÃO

- Os dois métodos de purificação apresentados, um ou dois passos cromatográficos, mostraram-se igualmente eficientes quanto ao rendimento da purificação. Embora o método de purificação por um único passo cromatográfico não seja capaz de isolar o complexo crotoxinico, pode ser utilizado quando deseja-se purificar a PLA2, sem interesse nas demais proteínas do veneno.

- A purificação do veneno de *C. d. ruruima* revelou a presença de três isoformas de crotapotina e duas isoformas de PLA2, diferentemente da purificação de *C. d. cumanensis* que resultou em uma crotapotina e duas isoformas de PLA2. Já que a toxicidade do veneno destas duas subespécies depende principalmente da crotoxina, formada pela combinação de diferentes isoformas de crotapotina e PLA2, a variedade de crotoxina poderia contribuir para a diferença na toxicidade dos dois venenos. Isso é apoiado pela ausência de algumas frações.

- A PLA2 iso 1 de *C. d. cumanensis* e as PLA 2 iso 2 de *C. d. ruruima* possuem propriedades químicas semelhantes, entretanto as PLA 2 divergem quanto à sua atividade. A análise da atividade enzimática específica para PLA2 demonstra claramente que a PLA2 iso 1 de *C. d. cumanensis* é mais potente que as PLA2 iso1 de *C. d. ruruima*.

- O resultado da espectrometria de massa da crotoxina de *C. d. ruruima*, demonstra que o complexo crotoxinico não é estável e que se dissocia facilmente. Juntamente a esse resultado os dados apresentado pela eletroforese das crotoxinas de *C. d. cumanensis* e *C. d. ruruima* pode-se observar a presença de mais de uma

banda, o que comprova a natureza instável do complexo e a possibilidade da formação de estruturas diméricas, triméricas e até tetraméricas.

- O alinhamento das seqüências n-terminais das PLA2 de *C. d. ruruima* e *C. d. cumanensis* sugerem que a *C. d. ruruima* está filogeneticamente mais próxima da *C. d. terrificus* do que da *C. d. cumanensis*, que por sua vez está mais próxima da *C. d. cascavella* e *C. d. collilineatus*.

- Os resultados apresentados por difrção circular ressaltam a presença de alta concentração de estruturas rígidas, folhas B e as Hélices nas estruturas das PLA2 de *C. d. ruruima* e *C. d. cumanensis*, o que sugere a importância da conservação destas estruturas para a manutenção da atividade da PLA2, por estarem estas estruturas ligadas à formação e manutenção do canal hidrofóbico de cálcio, que é responsável pela atividade enzimática da PLA2.

- Os dados farmacológicos obtidos até o momento demonstram que em preparação nervo frênico-diafragma de camundongo, ambos os venenos apresentaram atividade neurotóxica e que seus efeitos podem ser atribuídos a crotoxina. Os resultados apresentados indicam também que o veneno e a crotoxina de *C. d. cumanensis* apresentaram, pela ação bloqueadora neuromuscular, atividade neurotóxica mais intensa que a atividade apresentada pelo veneno e pela crotoxina de *C. d. ruruima*.

- O efeito facilitador que o veneno de *C. d. cumanensis* apresenta para as contrações por estímulo direto e indireto não pode ser observado para a crotoxina do mesmo veneno, sendo este efeito, provocado pela crotamina que é capaz de reduzir o potencial de membrana, por ativação dos canais de sódio, que em músculo estriado

de mamíferos provoca o aumento da permeabilidade dos íons Na e K (Chemymol et al 1971).

- A maior concentração de crotoxina e PLA2 apresentada pelo veneno de *C. d. ruruima* em relação ao veneno da *C. d. cumanensis* pode ser visto como um efeito compensatório pela baixa atividade, enzimática e neurotóxica, apresentadas por seu veneno e suas subunidades, Crotoxina e PLA2.

## 6 BIBLIOGRAFIA

Aird SD, Kaiser II. (1985) Comparative studies on three rattlesnake toxins. *Toxicon*. 23(3):361-74.

Alexander, A., Grothusen, J., Zepeda, H. And Schwartzman, R.J. (1988) Gyroxin a toxin from the venom of *Crotalus durissus terrificus*, is a trombin-like enzyme. *Toxicon* 26(6):953-960.

Arni, R.K. and Ward, R.J. (1996) Phospholipase A2 - A structural review. *Toxicon* 34(8): 827- 841.

Arni, R.K.; Ward, R.J.; Cintra, A. C. O. And Giglio, J.R. (1985) Crystallization and preliminary diffraction data of BthTX-I isolated from the venom of *Bothrops jararacussu* snake bite. *Toxicon* 23: 877-885.

Azevedo-Marques, M.M., Cupo, P., Coimbra, T.M., Hering, S. E., Rossi, M. A., and Laure, C. J. (1982). Myonecrosis, myoglobinuria and acute renal failure induced by south american rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*) envenomation in Brazil. *Toxicon* 23 631-636.

Barraviera, B. & Pereira, P.C.M. (1994). Acidentes por serpentes do gênero *Bothrops*. In: Barraviera, B. *Venenos Animais*. (1. ed.) EPUC, Rio de Janeiro, Brasil.

Beghini DG, Toyama MH, Hyslop S, Sodek LC, Novello, Marangoni S. Enzymatic characterization of a novel phospholipase A2 from *Crotalus durissus cascavella*

rattlesnake (Maracamboia) venom. J Protein Chem. 2000 Nov;19(8):679-84.

BON, C. - Multicomponent neurotoxic phospholipases A2. In: Venom Phospholipase A2: Structure, Function and Mechanism, ed by R. M. Kini, pp. 269-285, John Wiley & Sons, New York, 1997.

Bon, C., Changeux, J.P., Jeng, T. W. And Fraenkel-Conrat, H. (1979). Postsynaptic Effects of Crotoxin and of its isolated subunits. Eur. J. Biochem., 99: 471-481.

Bouchier, C., Boulain, J.C.; Bon, C. and Menez, A. (1991) Analysis of cDNAs encoding the two subunits of crotoxin, a phospholipase A2 neurotoxin from rattlesnake venom: the acidic non enzymatic subunit derives from a phospholipase A2-like precursor. Biochim. Biophys. Acta. 1088(3):401-408

Breithaupt, H. (1976) Enzymatic characteristics of crotalus phospholipase A2 and the crotoxin complex. Toxicon 14(3):221-233

Camara PR, Esquisatto LC, Camargo EA, Ribela MT, Toyama MH, Marangoni S, De Nucci G, Antunes E. (2003) Inflammatory oedema induced by phospholipases A2 isolated from *Crotalus durissus* sp. in the rat dorsal skin: a role for mast cells and sensory C-fibers. Toxicon. Jun;41(7):823-9.

Cecchini AL, Soares AM, Cecchini R, de Oliveira AH, Ward RJ, Giglio JR, Arantes EC. (2004) Effect of crotoxin on the biological activity of Asp49 and Lys49

phospholipases A(2) from Bothrops snake venoms. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.* Aug;138(4):429-36.

Chang, C.C. and Lee, J.D. (1977) Crotoxin, The Neurotoxin of South American Rattlesnake Venom, is a Presynaptic Toxin Acting Like  $\beta$ -Bungarotoxin. *Naunyn-Schmiedeberg. Arch.Pharmacol.* 296, 159-168.

Cintra, A. C. O.; Marangoni, S.; Oliveira, B.; Giglio, J.R. (1993) Bothropstoxin-I: amino acid sequence and function *Jurnal of Protein Chemistry* 12: 57-64

Cupo, P., Azevedo-Marques, M.M., and Hering, S.E. (1988). Clinical and laboratory features of South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*) envenomation in children. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 82, 924-929.

Daltry, J.C., Wüster, W., Thorpe R.S. (1996). Diet and snake venom evolution. *Nature*, 379: 537 – 540.

Damico DC, Bueno LG, Rodrigues-Simioni L, Marangoni S, da Cruz-Hofling MA, Novello JC. Neurotoxic and myotoxic actions from *Lachesis muta muta* (surucucu) whole venom on the mouse and chick nerve-muscle preparations. *Toxicon.* 2005 Aug;46(2):222-9.

DELOT, E.; BON, C. - Model for the interaction of crotoxin, a phospholipase A2 neurotoxin, with presynaptic membranes. *Biochemistry* 32, 10708-10713, 1993.

Dennis, E.A. (1994). Diversity of groups types, regulation and function of phospholipase A2. *J. biol. Chem.* 269, 13057 – 13060.

Dos Santos MC, Ferreira LC, Da Silva WD, Furtado MF. Characterization of the biological activities of the 'yellow' and 'white' venoms from *Crotalus durissus ruruima* compared with the *Crotalus durissus terrificus* venom. Neutralizing activity of *Crotalus durissus ruruima* antivenins. *Toxicon*. 1993 Nov;31(11):1459-69.

Dufton, M.C., Hider, R.C., 1983b. Classification of phospholipases A2 according to sequence. Evolutionary and pharmacological implications. *Eur. J. Biochem.* 137, 545–551.

Faure, G. Choumet, V.; Bouchier, C.; Camoin, L.; Guillaume, J.L.; Monegier, B.; Vuilhorgne, M. And Boon, C. (1994). The origine of the diversity crotoxin isoforms In The venom of *Crotalus durissus terrificus*. *Eur.J.Biochem.*, 223: 161-164.

Faure, G., and Bon, C. (1988). Crotoxin, A Phospholipase A2 neurotoxin from the south america rattlesnake *Crotalus durissus terrificus*. Purification of several isoforms and a Comparation of their molecular structure and of their biological activites. *Biochemistry*, 27 (2): 730-738.

Faure, G., Guillaume, J.L., Camoin, L., Saliou, B. and Bon, C. (1991). Multiplicity of acidic subunit isoforms of crotoxin, the phospholipase A2 neurotoxin from *Crotalus durissus terrificus* venom, results from posttranslational modifications. *Biochemistry* 30(32):8074-8083

Fonseca FV, Antunes E, Morganti RP, Monteiro HS, Martins AM, Toyama DO, Marangoni S, Toyama MH. Characterization of a new platelet aggregating factor from crotoxin *Crotalus durissus cascavella* venom. *Protein J.* 2006 Apr;25(3):183-92.

Garcia F, Toyama MH, Castro FR, Proenca PL, Marangoni S, Santos LM. (2003) Crotopotin induced modification of T lymphocyte proliferative response through interference with PGE2 synthesis. *Toxicon.* 42(4):433-7.

Gonçalves, J.M. and Vieira, L.G. (1950) Estudos sobre venenos de serpentes brasileiras I. Análise eletroforética. *Ana.Acad.Brás.Cien.* 22: 141, 1950.

Gopalakrishnakone, P., Dempster, D.W., Hawgood, B.J., Elder, H.Y., 1984. Cellular and mitochondrial changes induced in the structure of murine skeletal muscle by crotoxin, a neurotoxic phospholipase A2 complex. *Toxicon* 22, 85–98.

GOPALAKRISHNAKONE, P., HAWGOOD, B.J., THEAKSTON, R.D. - Specificity of antibodies to the reconstituted crotoxin complex, from the venom of South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*), using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and double immunodiffusion. *Toxicon* 19, 131-139, 1981.

GOPALAKRISHNAKONE, P.; HAWGOOD, B.J. - Morphological changes induced by crotoxin in murine nerve and neuromuscular junction. *Toxicon* 22, 791-804, 1984.

Grillo Rodriguez O, Scannone H.R. and Parra N.D. Enzymatic activities and other characteristics of *Crotalus durissus cumanensis* venom. *Toxicon.* 1974 May;12(3):297-

302.

Gutierrez JM, Lomonte B. (1995) Phospholipase A2 myotoxins from Bothrops snake venoms. *Toxicon*;33(11):1405-24.

Gutierrez, J.M. e Lomonte, B. (2003) Cap. 32 Efectos Locales en el Envenenamiento Ofídico en America Latina - ANIMAIS PEÇONHENTOS NO BRASIL: Biologia, Clínica e Terapêutica dos Acidentes Ed. Sarvier, São Paulo pp 310-323.

Harvey, A.L.; Barfaraz, A.; Thompson, E.; Faiz, A.; Preston, S. & Harris, J.B. (1994) Screening of snake venoms for neurotoxic and myotoxic effects using simple in vitro preparations from rodents and chicks. *Toxicon* 32: 257-265.

Harvey, A.L.; Bradley, K.N.; Cochran, S.A.; Rowan, E.G.; Pratt, J.A.; Quillfeldt, J.A.; Jerusalinsky, D.A. (1998) What can toxins tell us for drug discovery? *Toxicon* 36(11):1635-1640

Hawgood, B. J. and Santana de Sá, S. (1979) Changes spontaneous and evoked release of transmitters induced by Crotoxin and its Complex component Phospholipase A2 at the frog neuromuscular junction. *Neuroscience (Oxford)* 4, 293-303.

Hawgood, B.J. (1989). How similar are the actions of crotoxin and beta-bungarotoxin? *Acta Physiol Pharmacol Latinoam.*;39(4):397-406.

HAWGOOD, B.J.; BON, C. - In: Handbook of Natural Toxins: Reptile and Amphibian Venoms ( A. T. Tu, ed.), Marcel Dekker, New York, 3-52, 1990.

Heinrikson, R. L. & Meredith, S. C. (1984). Amino acid analysis by reverse phase high-performance liquid chromatography: precolumn derivatization with phenylthiocyanate. *Analytical Biochemistry* 13: p.65-72.

HENDON, R.A.; BIEBER, A.L. - Presynaptic toxins from rattlesnake venoms. In: *Rattlesnake Venoms: Their Actions and Treatment*, p. 211 (Tu, A. T. Ed.) New York, Marcel Dekker, 1982.

Hernandez-Oliveira S, Toyama MH, Toyama DO, Marangoni S, Hyslop S, Rodrigues-Simioni L. Biochemical, pharmacological and structural characterization of a new PLA2 from *Crotalus durissus terrificus* (South American rattlesnake) venom. *Protein J.* 2005 May;24(4):233-42.

Hodgson Wayne C. and Wickramaratna Janith (2002) In vitro neuromuscular activity of snake venoms *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*. 29, 807-814.

Hodgson WC, Wickramaratna JC. (2002). In vitro neuromuscular activity of snake venoms. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. Sep;29(9):807-14. Review.

Holzer, M., Mackessy, S.P. (1996). An aqueous endpoint assay of snake venom phospholipase A2. *Toxicon*. 34(10):1149-55.

Iwanaga, S.; Ohshima, G. and Suzuki, I. (1976) Proteinase from the venom of *Agkistrodon halys blomhoffii*. In: Lorand, L. (Ed). *Methods in Enzymology* vol XLVB. Academic Press.

Janzen Daniel, H. (1991). *Historia Natural Costa Rica*. P. 331-332.

Jia, L. G.; Shimokawa, K. I.; Bjarnson, J. B. and Fox, J. W. (1996) Snake venom metalloproteinases: Structure, function and relationship to the ADAMs family of proteins. *Toxicon* 34(11 - 12): 1269 - 1276.

Karlsson, E. (1979) Chemistry of protein toxic in snake venom. In Lee, C.Y. (Ed): *Handbook of Experimental Pharmacology*, 52 pp 159-212. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.

Kini, R. M. and Evans, H. J. (1987) Structure Function relationships of phospholipases. The anticoagulant region of phospholipase A<sub>2</sub>. *J. Biol. Chem.* 262(30): 14402 - 14407.

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

Kini, R. M. and Iwanaga, S. (1986) Structure function relationship of phospholipase II charge density distribution and the myotoxicity of presynaptically neurotoxic phospholipase. *Toxicon*.

Kini, R.M. (Ed.), 1997. *Venom Phospholipase A2 Enzymes: Structure, Function and Mechanism*, Wiley, Chichester, England, pp. 1–511.

Kini, R.M., 2003. Excitement ahead: structure, function and mechanism of snake venom phospholipase A2 enzymes. *Toxicon* 42, 827–840.

Kini, R.M., Evans, H.J., 1989. A common cytolytic region in myotoxins, hemolysins, cardiotoxins and antibacterial peptides. *Int. J. Peptide Protein Res.* 34, 277–286.

Kini, R.M., Evans, H.J., 1989. Role of cationic amino acid residues in cytolytic activity. Modifications of lysine residues in the cardiotoxin from *Naja nigricollis* venom and correlation between cytolytic and antiplatelet activities. *Biochemistry* 28, 9209–9215.

Laemmli U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227, 680 – 685.

Landucci E. C. T.; Antunes. E.; Donato J. L.; Faro. R.; Hyslop S.; Marangoni S.; Oliveira B.; Cirino G. e Nucci De G. (1995). Inhibition of Carregeenin-Induced rat paw o edema by crotapotin, a polypeptide complexed with phopolipase A2. *Brithish J. Pharmacol* 114: 578-583.

Landucci, E.C.T., Condino-Neto, A., Perez, A.C., Hyslop, S., Corrado, A.P., Novello, J.C., Marangoni, S., Oliveira, B., Antunes, E., and de Nucci,G. (1994). Crotoxin induces aggregation of human washed platelets. *Toxicon* 32 217-226.

Laskowsky, M. (1971). Venoms exonuclease. in boyer, P.D. (Ed) Enzimes, Vol 4  
New York-London: Academic Press.

Laure, C.J. (1990) *Crotalus durissus terrificus* Venom: Crotoxin and Inter-Cro  
Mem.Inst.Butantan Vol.52 (Supl.) p.17-19.

Maraganore JM, Merutka G, Cho W, Welches W, Kezdy FJ, Heinrikson  
RL.(1984). A new class of phospholipases A2 with lysine in place of aspartate 49.  
Functional consequences for calcium and substrate binding. J Biol Chem. Nov 25;  
259(22):13839-43.

Markland, F (1998) Snake venoms and the hemostatic system. *Toxicon* 36:1749-  
1800.

Matsui, T.; Fujimura, Y.; Titani, K. (2000). Snake venom proteases affecting  
hemostasis and thrombosis. *Biochim. Biophys. Acta*, 1477: 146 – 156.

Mclean, R. L.; Massaro, E. J. and Elliot, W. B. (1971) A comparative study of the  
homology of certain enzymes in ellapide venoms.*Comp. Biochem. Physiol.* 39B: 1023 -  
1037.

Mebs, D. (1970). A Comparative study of enzyme activities in snake venoms, *Int.*  
*J. Biochem.* 1:335-342.

Meier J, Stocker K. Modification of the toxicity of *Bothrops atrox* poison by  
interventions in the coagulation and kallikrein system of prey. *Folia Haematol Int Mag*

Klin Morphol Blutforsch. 1984;111(6):877-82.

Meister, A (1965) Biochemistry of amino acid. New York - London Academic Press.

Meyer, K., Kiffman, P., Linker, A. (1960). Hyaluronidases. In : Boyer, P.D., Lardy, H., Myrback, K. (ed). The Enzymes, vol.4 Academic Press.

Ministério da Saúde Fundação Nacional de Saúde FUNASA (2001) Manual de diagnostico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos. 2 °Ed. Brasília 120:1

Monterrey, F. (2001) Trabajo de Grado. Facultad de Ciencias, UCV, Caracas, Venezuela.

Narahashi, T.; Hass, H.G. and Therrien, E.F. (1967) Saxitoxin and tetrodotoxin: comparison of nervo blocking mechanism. Science, 22; 157 (795); 1441-2.

Pederson, de Arcuri, B.F., Morero, R.D., Rufini, S., 1994. Phospholipase-like myotoxins induce rapid membrane leakage of non-hydrolyzable ether-lipid liposomes. Biochim. Biophys. Acta 1190, 177–180.

Prado-Franceschi, J. and Vital, B. O (1981) Convulxin, a new toxin from the venom of the South American Rattlesnake *Crotalus durissus terrificus*, Toxicon, Vol. 19, N°4,: 658-665.

Prado-Franceschi, J.; Hyslop, S.; Cogo, J.C.; Andrade, A.L.; Assakura, M.T.; Reichl, A.P.; Cruz-Hofling, M.A.; Rodrigues-Simioni, L. (1998) Characterization of a myotoxin from the Duvernoy's gland secretion of the xenodontine colubrid *Philodryas olfersii* (green snake): effects on striated muscle and the neuromuscular junction. *Toxicon* 36(10):1407-1421

Radis-Baptista G, Moreno FB, de Lima Nogueira L, Martins AM, de Oliveira Toyama D, Toyama MH, Cavada BS, de Azevedo WF Jr, Yamane T. Crotacetin, a novel snake venom C-type lectin homolog of convulxin, exhibits an unpredictable antimicrobial activity. *Cell Biochem Biophys*. 2006;44(3):412-23.

Rangel-Santos, A. C. and Mota I. (2000) Effect of heating on the toxic, immunogenic and immunosuppressive activities of *Crotalus durissus terrificus* venom, *Toxicon*, 38 (10):1451-7.

Rigden DJ, Hwa LW, Marangoni S, Toyama MH, Polikarpov I (2003). The structure of the D49 phospholipase A2 piratoxin III from *Bothrops pirajai* reveals unprecedented structural displacement of the calcium-binding loop: possible relationship to cooperative substrate binding. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*. 59(Pt 2):255-62.

Rochat, H.; Rochat, C.; Miranda, F.; Lissitzky, S. and Edman, P. (1970) The amino acid sequence of neurotoxin I of *Androctonus australis* Hector. *Eur. J. Biochem*. 17: 262.

Rodrigues-Simioni, L.; Prado-Franceschi, J.; Cintra, A..C.O.; Giglio, J.R.; Jiang, M.S.; Fletcher, J.E.. (1995) No role for enzymatic activity or dantrolene-sensitive Ca<sup>2+</sup> stores in the muscular effects of bothropstoxin, a Lys49 phospholipase A2 myotoxin. *Toxico*, 33: 1479-1489.

Rodriguez O.G. and Scannone H.R. Fractionation of *Crotalus durissus cumanensis* venom by gel filtration. *Toxicon*. 1976 Aug;14(5):400-3.

Rodriguez-Acosta, A., Strauss, M., Pulido-Mendez, M., Gonzalez, L., Rodriguez, C., Blanco, M. (2001). An intent of correlating clinical manifestations and ultrastructural lung changes in mice inoculated with *Tityus discrepans* (Buthidae) venom. *J Submicrosc Cytol Pathol*.33(3):343-8.

Rodriguez-Acosta, Alexis (2001)  
<http://caibo.ucv.ve/vitaenueve/articulos/medicinatropical/archivosPDF>

Rodriguez-Acosta,  
<http://caibo.ucv.ve/vitaeNueve/articulos/medicinetropical/archivosPDF/medicinetropical.PDF>

Rosenberg, P., 1986. The relationship between enzymatic activity and pharmacological properties of phospholipases. In: Harris, J.B., (Ed.), *Natural Toxins*, Oxford University Press, Oxford, pp. 129–174.

ROSENFELD, G. - Symptomatology, pathology and treatment of snake bites in South America. In: Venomous animals and their venoms, Vol 2, 395-362 (Bücherl, W. And Buckley, E. E., Eds.): Academic Press, New York, 1971.

Rosenfeld, G. (1971) Symptomatology, pathology, and treatment of snake bites in South America. In: (Bucherl, W. and Buckley, E.E., ed). Venomous Animals and their Venoms, New York, Academic Press, pp. 345-384, Vol 2.

Sasaki, T. (1960) Chemical studies on the venom of Formosan habu (*Trimeresurus mucrosquamatus cantor*). III. On the dialyzable substances. In the venom, *Yakugaku Zasshi*, 80, 844.

Schagger, H. A.; Von Jagow, G. (1987). Comassie blue-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for direct visualization of polypeptides during electrophoresis. *Anal. Biochem.* 166, 368-379.

Selistre de Araujo HS, White SP, Ownby CL. (1996) cDNA cloning and sequence analysis of a lysine-49 phospholipase A2 myotoxin from *Agkistrodon contortrix laticinctus* snake venom. *Arch Biochem Biophys.* Feb 1;326(1):21-30.

Selistre, H. S.; White, S. P. and Ownby, C. L. (1996). Sequence analysis of Lys 49 phospholipase A2 myotoxins: a highly conserved class pf protein. *Toxicon* 34(11\12): 1237 - 1242.

Shipolini, R., Iwanov, C.P., Dimitrov, G., & Alexier, B.V. (1965). Composition of the low molecular fraction of the Bulgarian Viper venom, *Biochem. Biophys. Acta*, 104: 292.

Six DA, Dennis EA. (2000). The expanding superfamily of phospholipase A(2) enzymes: classification and characterization. *Biochim Biophys Acta*. 1488(1-2):1-19.

Slotta, K. H. and Fraenkel-Corat, H. (1938) Schlangengifte, III: Mitteilung Reinigung and Krystallization des Klapperschlangengiffes. *Ber. Dtch. Chem. Ges.* 71: 1076-1081.

Strichartz, G.R. and Wang, G.K. (1986) Rapid voltage-dependent dissociation of scorpion  $\alpha$ -toxis coupled to Na channel inactivation in myelinated nerve. *J. Gen. Physiol* 88: 413 - 435.

Toyama MH, de Oliveira DG, Beriam LO, Novello JC, Rodrigues-Simioni L, Marangoni S. (2003) Structural, enzymatic and biological properties of new PLA2 isoform from *Crotalus durissus terrificus* venom. *Toxicon*. Jun;41(8):1033-8.

Toyama, M. H., Mancuso, L. C., Giglio, J. R., Novello, J. C., Oliveira, B., and Marangoni, S. (1995). *Biochem. Mol. Biol. Int.* 37, 1047– 1055.

Toyama, M. H., Soares, A. M., Vieira, C. A., Novello, J. C., Oliveira, B., Giglio, J. R and Marangoni, S. (1998). Amino acid sequence of piratoxin-I, a myotoxin from

Bothrops pirajai snake venom, and its biological activity after alkylation with p-bromophenacyl bromide. *J. Protein. Chem.* 17, 713 – 718.

Toyama, M. H.; Carneiro, E. M.; Marangoni, S.; Barbosa, R. L.; Corso, G. and Bochero, A. C. (2000) Biochemical characterization of two crotamine isoforms isolated by a single step RP-HPLC from *Crotalus durissus terrificus* (South American Rattlesnake) venom and their action on insulin secretion by pancreatic islets, *Bioch. Biophys. Acta.* 1474: 56-60.

Tsai, I.H. (1997). Phospholipase A2 of Asian snake venoms. *J. Toxicol. Toxin Rev.* 16, 79–114.

Tu, A. T. (1977b). Blood coagulation. In: *Venoms. Chemistry and Molecular Biology*, New York - John Wiley.

Tu, A. T. (1991) *Reptile Venoms and Toxins: Handbook of Natural Toxins. Vol. 5.* New York. Macel Dekker. Inc.

Tu, A. T. (1991). Chemistry of rattlesnake venoms. in rattlesnake venoms, their actions and treatment. New York, Marcel Dekker.

Tu, A.T. (1977). *Venoms. Chemistry and Molecular Biology*, New York – London – Sydney – Toronto. John Willey.

Tu, A.T. (1982). Chemistry of rattlesnake venoms. in rattlesnake venoms, their actions and treatment. New York, Marcel Dekker.

Tzeng, M.C., Hseu, M.J., Yang, J.H., Guillory, R.J., 1986. Specific binding of three neurotoxins with phospholipase A2 activity to synaptosomal membrane preparations from the guinea pig brain. *J. Protein Chem.* 5, 221–228.

Tzeng, M.C., Yen, C.H., Hseu, M.J., Tseng, C.C., Tsai, M.D., Dupureur, C.M. (1995). Binding proteins on synaptic membranes for crotoxin and taipoxin, two phospholipases A2 with neurotoxicity. *Toxicon.* 33(4):451-7.

Valentin E, Lambeau G. What can venom phospholipases A(2) tell us about the functional diversity of mammalian secreted phospholipases A(2)? *Biochimie.* 2000 Sep-Oct;82(9-10):815-31.

Valentin, E., Ghomashchi, F., Gelb, M.H., Lazdunski, M., Lambeau, G. (1999). On the diversity of secreted phospholipases A(2). Cloning, tissue distribution, and functional expression of two novel mouse group II enzymes. *J Biol Chem.* 274(44):31195-202. Erratum in: *J Biol Chem* 2000 275(3):2246.

Varanda, E.A. & Giannini, M.J.S. (1994). *Bioquímica dos venenos de serpentes.* In: Barraviera, B. *Venenos Animais.* (1. ed.) EPUC, Rio de Janeiro, Brasil.

Verheij, H. M.; Vowerk, J. J.; Jasen, E. H. J. M.; Puyk, W. C.; Dýkstra, B. W.; Drenth, J. and de Hass, G. H. (1980) Methylation of Histidine - 48 in pancreatic phospholipase A2, role of histidine and calcium ion in the catalytic mechanism. *Biochemistry* 19: 743 - 748.

Verheij, H.M., Slotboom, A.J., De Haas, G.H., 1981. Structure and function of phospholipase A2. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 91, 92–203.

Yang, C.C. (1994). Structure-function relationship of phospholipase A2 from snake venoms. *J.Toxicol.*, 13 (2): 125-177.

Zlotkin, E.; Fraenkel, F.; Miranda, F. and Lissitzky, S. (1971) The effect of scorpion venom on blowfly larvae-a new method for the evaluation of scorpion venoms potency. *Toxicon* 9: 1-8.