

Universidade Estadual de Campinas.

Vera Lúcia Bonfim

**Caracterização bioquímica e biológica de duas isoformas
de BthTX-II: Bj-IV e Bj-V (PLA₂) isoladas do veneno de
Bothrops jararacussu.**

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

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Marangoni

Campinas/ 2004

Campinas, 01 de Março de 2004

Banca Examinadora

Prof. Dr. Sérgio Marangoni (Orientador)

Prof^a. Dr^a. Lea Rodrigues Simioni

Prof^a. Dr^a Maria das Graças Machado Freire

Prof Dr. José Camillo Novello

A Deus pelo dom da vida.

Aos meus pais, Vicente e Maria, pelo
constante incentivo e pelo apoio incansável
em todos os momentos, obrigada.

Nada melhor do que um sonho
para criar o futuro.
Victor Hugo.

Agradecimentos.

À Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) pela formação dada, baseada no desenvolvimento pessoal e acadêmico.

A Capes, pelo apoio financeiro.

Ao laboratório de Química de Proteínas (Laquip) pelo acolhimento, ajuda e colaboração para a realização deste trabalho.

A meu orientador prof Dr Sérgio Marangoni por ter me recebido no seu grupo de trabalho e acreditado que eu seria capaz, obrigada pelos conselhos e estímulo.

Ao amigo de todos os momentos Luis Alberto Ponce Soto pelo estímulo e confiança, também por todos os ensinamentos e atenção, sua colaboração jamais será esquecida.

Aos professores prof Dr José Camilo Novello e prof Dr^a Maria das Graças Machado Freire pelas sugestões dadas à revisão final da tese e pela valorização do meu trabalho.

A prof^a Dr^a Lea Rodrigues Simioni, ao prof Dr José Camillo Novello e a prof^a Dr^a Nilce Meirelles pela participação no exame de qualificação onde apresentaram importantes observações para a revisão deste trabalho.

Ao Departamento de Bioquímica do Instituto de Biologia/Unicamp e também ao Departamento de Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas/Unicamp envolvidos no desenvolvimento deste trabalho.

Ao técnico Paulo Baldasso e ao Biólogo Gildo Bernardo Leite pela pronta ajuda na parte experimental, pela paciência e amizade.

A prof^a Dr^a Lea Rodrigues Simioni por ter cedido espaço no laboratório sob sua responsabilidade, assim colaborando para a realização deste trabalho, seja com seus conhecimentos, seja com seu incentivo.

Aos colegas do Laboratório de Química de Proteínas (Laquip) pelo convívio e amizade. Em especial ao amigo Fábio pela presença, me ouvindo sempre.

A todos os meus amigos, estejam vocês longe ou perto sempre estarão na minha memória e coração.

E finalmente, mas jamais em último lugar, aos meus irmãos por participarem da minha vida, me fazendo sempre acreditar que é possível vencer, a presença de vocês torna a vida mais agradável e feliz.

Índice:

Lista de abreviações	Pag. X
Resumo	XI
Abstract	XIII
1 Introdução	1
1.1 Epidemiologia dos acidentes ofídicos no Brasil	1
1.1.1 Coeficiente de incidência	1
1.1.2 Gênero da Serpente	2
1.2 Aspectos Gerais do Veneno das Serpentes	2
1.3 O Veneno Botrópico	4
1.4 <i>Bothrops jararacussu</i>	6
1.4.1 Bothropstoxina-I (BthTX-I) e Bothropstoxina-II (BthTX-II)	7
1.5 Fosfolipase A ₂ (PLA ₂)	7
1.5.1 Ação biológica das PLA ₂	12
1.6 Miotoxina PLA ₂ “like”	15
1.7 Atividade Neurotóxica	17
1.7.1 Toxinas Pré-Sinápticas	18
1.7.2 Toxinas Pós-Sinápticas	19
2 Objetivos	20
3 Materiais e Métodos	21
3.1 Venenos e Reagentes	21
3.2 Animais	21
3.3 Purificação das isoformas de BthTX-II (Bj-IV e Bj-V) a partir do veneno total de <i>Bothrops jararacussu</i>	21
3.3.1 HPLC de Troca Iônica	21
3.3.2 HPLC de Fase Reversa	21
3.4 Caracterização bioquímica das isoformas de BthTX-II (Bj-IV e Bj-V) a partir do veneno total de <i>Bothrops jararacussu</i>	22
3.4.1 Eletroforese em SDS-PAGE	22
3.4.2 Medida da atividade PLA ₂	22
3.4.3 Estudos cinéticos das isoformas de BthTX-II, Bj-IV e Bj-V (PLA ₂)	23
3.4.3.1 Efeito da concentração de substrato na atividade PLA ₂ das isoformas de BthTX-II, Bj-IV e Bj-V	23
3.4.3.2 Efeito do pH na atividade das isoformas de BthTX-II, Bj-IV e Bj-V (PLA ₂)	23
3.4.3.3 Efeito da temperatura na atividade das isoformas de BthTX-II, Bj-IV e Bj-V (PLA ₂)	23
3.4.3.4 Efeito dos íons divalentes na atividade PLA ₂ das isoformas de BthTX-II, Bj-IV e Bj-V (PLA ₂)	24

3.4.4	Medida da atividade inibitória de crotapotinas crotálicas sobre a atividade PLA ₂ das isoformas de BthTX-II, Bj-IV e Bj-V	24
3.4.5	Análise da composição de aminoácidos	24
3.4.6	Estudo da seqüência N-terminal e estudos de homologia	25
3.5	Caracterização neurotóxica das isoformas de BthTX-II (Bj-IV e Bj-V) a partir do veneno total de <i>Bothrops jararacussu</i> .	25
3.5.1	Estudo da atividade neurotóxica na preparação nervo frênico-diafragma isolado de camundongo (NF-DIC).	25
3.5.2	Medida da atividade neurotóxica em músculo biventer cervicis de pintainho	26
3.6	Análise estatística.	26
4	Resultados	
4.1	Purificação das isoformas de BthTX-II, Bj-IV e Bj-V, PLA ₂ (D49) do veneno de <i>Bothrops jararacussu</i> através de cromatografia de troca iônica, em Sp4 PW (Waters) LC	27
4.2	Repurificação das isoformas de BthTX-II, Bj-IV e Bj-V PLA ₂ (D49) de <i>Bothrops jararacussu</i> em HPLC de fase reversa	28
4.3	Eletroforese em SDS-PAGE das isoformas de BthTX-II, Bj-IV e Bj-V PLA ₂ (D49) de <i>Bothrops jararacussu</i>	29
4.4	Medida da atividade PLA ₂ do veneno total, isoformas de BthTX-II, Bj-IV e Bj-V PLA ₂ (D49) e da BthTX-I, Bj-VII PLA ₂ (K49)	30
4.5	Estudos cinéticos das isoformas de BthTX-II, Bj-IV e Bj-V (PLA ₂)	31
4.5.1	Efeito da concentração de substrato na atividade PLA ₂ das isoformas de BthTX-II, Bj-IV e Bj-V	31
4.5.2	Efeito do pH na atividade das isoformas de BthTX-II, Bj-IV e Bj-V (PLA ₂)	32
4.5.3	Efeito da temperatura na atividade das isoformas de BthTX-II, Bj-IV e Bj-V (PLA ₂)	33
4.5.4	Efeito de íons divalentes na atividade PLA ₂ das isoformas de BthTX-II, Bj-IV e Bj-V	34
4.5.5	Medida da atividade inibitória da crotapotina sobre a atividade fosfolipásica das isoformas de BthTX-II, Bj-IV e Bj-V	35
4.6	Análise da composição de aminoácidos	36
4.7	Estudo da seqüência N-terminal e estudo de homologia	37
4.8	Estudo da atividade neurotóxica do veneno total de <i>Bothrops jararacussu</i> , isoformas de BthTX-II (Bj-IV e Bj-V), BthTX-I (Bj-VII) na preparação nervo frênico-diafragma isolado de camundongo (NF-DIC), doses de 50 e 100 ug/ml	38
4.8.1	Registro gráfico e miográfico do veneno total de <i>Bothrops jararacussu</i> , das isoformas de BthTX-II (Bj-IV e Bj-V), BthTX-I (Bj-VII)	38
4.8.2	Tempo para a obtenção de 50% de bloqueio da resposta contrátil em NF-DIC	40

4.9	Medida da atividade neurotóxica do veneno total de <i>Bothrops jararacussu</i> , das isoformas de BthTX-II, Bj-IV e Bj-V e da BThTX-I, Bj-VII na preparação biventer cervicis de pintainho, doses de 50 e 100 ug/ml	42
4.9.1	Registro gráfico e miográfico do efeito do veneno total de <i>Bothrops jararacussu</i> , das isoformas de BthTX-II, Bj-IV e Bj-V (PLA ₂) e da BthTX-I, Bj-VII	42
4.9.2	Resposta contraturante à adição de Ach e K ⁺	45
5	Discussão	46
6	Conclusão	55
7	Bibliografia	56

Lista de Abreviações.

Lista de Abreviações - Purificação, Cromatografias.

Protein Pack SP 5 PW	Coluna de troca iônica catiônica, com grupo funcional sulfopropil (SO_3^+) e matriz composta de polimetacrilato. (Waters).
PDA 991	Photodiode Array Detector
LC	High (Pressure/Performance) Liquid Chromatography
RP HPLC	Reverse Phase HPLC
C 18	18 High Carbon Load, High activity silica
u-Bondapak C18	Coluna de HPLC com n-octadecyl como base da fase estacionária

Lista de Abreviações - Reagentes, Sais, Tampões.

TFA	Ácido trifluoracético
Tampão A	TFA 0,1% utilizado para cromatografia de HPLC-FR
Tampão B	Acetonitrila 66% utilizado em cromatografia de HPLC-FR
PAGE	Eletroforese em Gel de poliacrilamida
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio, Lauril Sulfato de Sódio
Tris	Tris [Hidroximetil] aminometano
KCl	Cloreto de potássio
Ach	Acetilcolina

Lista de Abreviações – Serpentes, frações, isoformas.

Bj	<i>Bothrops jararacussu</i>
BthTX-I	Bothropstoxina I
BthTX-II	Bothropstoxina II
Bj-IV	Isoforma de PLA_2 proveniente da BthTX-II
Bj-V	Isoforma de PLA_2 proveniente da BthTX-II
Cdcoll F3 e F4	Crotapotinas provenientes da serpente <i>Crotalus durissus collilineatus</i>
Cdt F7	Crotapotina proveniente da serpente <i>Crotalus durissus terrificus</i>
Cdcasca F3 e F4	Crotapotinas provenientes da serpente <i>Crotalus durissus cascavella</i>

Lista de Abreviações – aminoácidos.

Ácido Aspártico	Asp	D
Ácido Glutâmico	Glu	E
Alanina	Ala	A
Arginina	Arg	R
Asparagina	Asn	N
Aspartato/Asparagina	Asx	
Cisteína	Cys	C
Fenilalanina	Phe	F
Glicina	Gly	G
Glutamato/Glutamina	Glx	
Histidina	His	H
Isoleucina	Ile	I
Leucina	Leu	L
Lisina	Lys	K
Metionina	Met	M
Prolina	Pro	P
Serina	Ser	S
Tirosina	Tyr	Y
Treonina	Thr	T
Triptofano	Trp	W
Valina	Val	V

Resumo

Bothrops jararacussu é uma espécie de grande importância epidemiológica no estado do Rio de Janeiro. No entanto a sua distribuição é ampla, pois pode ser encontrada nos estados de Santa Catarina, Paraná, Mato Grosso, São Paulo, Minas Gerais, Espírito Santo, Sul da Bahia e também na Argentina, Paraguai e Bolívia.

De um modo geral, os venenos botrópicos das espécies brasileiras foram pouco estudados tanto em relação aos seus componentes isolados como quanto ao veneno total, devido à falta de otimização das técnicas de purificação capazes de revelar a presença de novos componentes ou de suas isoformas. Desta forma justifica-se o interesse no isolamento e caracterização de duas novas isoformas de BthTX-II PLA₂ (D49), lembrando que esta última citada é uma fração importante no veneno de *Bothrops jararacussu*.

As isoformas foram isoladas em uma coluna de troca iônica catiônica (Protein Pack SP 5PW Waters) acoplada a um sistema LC 650 (Waters), sendo caracterizadas como isoformas de BthTX-II e denominadas como Bj-IV e Bj-V. O alto grau de pureza foi revelado ao serem re-purificadas em uma coluna de hidrofobicidade μ -Bondapack C18 acoplada a um sistema de HPLC de fase reversa, sendo eluídas em tempos de retenção muito próximos (Bj-IV 31,25 $\pm$ 0,31 minuto e para Bj-V 31,31 $\pm$ 0,28 minuto). A caracterização físico-química revelou o fato de serem isoformas, pois apresentaram vários fatores similares como, a tendência para a formação de dímeros na eletroforese com ausência de redutores, sendo que o valor de massa molecular relativa encontrada para isoformas foi de ~14 kDa, através da eletroforese em SDS-PAGE Tricina (16,5%) também, a basicidade semelhante e o alto grau de hidrofobicidade, confirmados pela composição de aminoácidos.

A caracterização cinética das isoformas de BthTX-II PLA₂ (D49) mostrou que tais isoformas são altamente estáveis e apresentam um pH ótimo ao redor de 8,0 e temperatura próxima a 37°C. Frente a diferentes concentrações de substrato as isoformas mostraram um comportamento tipo alostérico, em nossas condições experimentais. Na ausência de Ca⁺² (1Mm) e na presença de alguns íons divalentes tais como Mn⁺², Mg⁺², Zn⁺², Cu⁺² (na concentração de 10 mM) as isoformas Bj-IV e V foram inibidas, já na presença de Ca⁺² (1mM) e com os mesmos íons divalentes citados elas mostraram uma discreta atividade. Também foi demonstrado o efeito inibitório de crotapotinas crotálicas

sobre a atividade PLA₂ das isoformas, fato que sugere a possível presença de crotapotinas “like” no veneno botrópico.

A análise da composição de aminoácidos confirmou o comportamento estável de sua atividade cinética, ao mostrar um alto conteúdo de aminoácidos hidrofóbicos, assim como a presença de 14 cisteínas envolvidas em possíveis sete pontes dissulfeto. A presença de um alto conteúdo de aminoácidos básicos como Lys, His e Arg, também confirmaram o caráter básico das isoformas, característica própria do veneno deste tipo de víperide sul americano. O estudo de homologia seqüencial da região N-terminal entre ambas isoformas e também com outras PLA₂ (D49) revelou um alto grau de homologia, no entanto, foram encontradas algumas substituições que não contribuíram com diferenças significativas, tanto com relação à atividade catalítica quanto neurotóxica.

O efeito neurotóxico das isoformas de BthTX-II PLA₂ (D49) Bj-IV e V, foi avaliado usando-se duas preparações farmacológicas: nervo frênico-diafragma isolado de camundongo e biventer cervicis de pintainho. Foram encontradas diferenças em ambas preparações, pois o efeito de bloqueio da resposta contrátil evidenciou-se de maneira significativa na preparação nervo frênico-diafragma isolado de camundongo, nas concentrações empregadas (50 e 100 µg/mL), enquanto que na preparação biventer não houve efeito notório. No entanto, para a dosagem de 100 µg/mL, no caso do veneno total na preparação biventer cervicis de pintainho evidenciou-se um efeito miotóxico indireto pois, foi observada uma diminuição nas respostas contraturante dadas pela diminuição das curvas de KCl e Acetilcolina (ACh).

A importância do isolamento das isoformas de BthTX-II, Bj-IV e V, está apoiada no fato de ter sido possível a obtenção destas duas novas isoformas, usando-se métodos que garantiram a manutenção da sua atividade biológica, sendo assim possível correlacionar a estrutura e a função desta família de proteínas.

Abstract.

Bothrops jararacussu is a species of great importance in the state of Rio de Janeiro, but it has a wide distribution: from Argentina, state of Santa Catarina, Paraná, Mato Grosso, São Paulo, Minas Gerais, Espírito Santo, south of Bahia, Paraguay and Bolivia.

In a general the venom botropics of the Brazilian species, were probably rarely studied in relation to their isolated components as the total venom, due to a lack in the optimization of technologies to isolate the presence of new components or isoforms. In this way it justified to isolate and to characterize two new isoforms of these of BthTX-II PLA₂ (D49) is a important fraction in the venom of *Bothrops jararacussu*, which were isolated through a column of exchange cationic (Protein Pack SP 5 PW Waters) coupled to a system LC 650 (Waters), being characterized as isoforms of BthTX-II and denominated Bj-IV and Bj-V.

The high degree of purity was revealed and was eliminated in very close times of retention (Bj-IV 31.25 ± 0.31 minutes and Bj-V 31.31 ± 0.28). The physical-chemistry characterization revealed the reason of being isoforms, because they present several similar factors, such as the tendency of forming aggregates through the electrophoreses PAGE in the absence of SDS, as well as the mass is around 14 kDa characterized in the electrophoreses SDS-PAGE Tricina (16%).

The kinetic characterization of the isoforms of BthTX-II PLA₂ (D49) showed that isoforms are highly stable and they present good pH around 8,0 and a good temperature around 37 °C. Different concentration substrates showed a behavior type allosteric under our experimental conditions. In the presence of some ions such divalents as Mn⁺², Mg⁺², Zn⁺², Cu⁺² (in the concentration of 10 Mm) and in the absence of Ca⁺² the isoforms Bj-IV and Bj-V, were inhibited. But in the presence of Ca⁺² (1mM) the isoforms showed a discreet activity. The effect of the inhibition of crotopotins crotalics were also demonstrated in the activity PLA₂, it is suggested that there is probably a presence crotopotin in these PLA₂.

The analysis composition of amino acids confirmed the stable behavior of its enzymatic kinetics when showing a high content of amino acids hidrophobics, as well as the presence of 14 cysteine involved in 14 bridges disulfide. The presence of a high content of basic amino acids as Lys, His and Arg confirmed the basic character of the isoforms. The study of the N-terminal region of both isoforms in relation to other PLA₂ reveals a high homology degree, nevertheless some substitutions observed didn't show significant differences in the catalytic and neurotoxic activity.

The neurotoxic effect of the isoforms of BthTX-II PLA₂ (D49): Bj-IV and Bj-V were evaluated using two pharmacological preparations: nerve isolated frenic-diaphragm a mouse and a chick biventer cervicis muscle. There were differences in both preparations, because the blockade effect of the concentration was more significant in the preparation of the mouse. It observed in the 100 ug/ml dose to total venom a indirect effect miotoxic in the preparation chick biventer cervicis.

The importance of the isolation of the isoforms of BthTX-II Bj-IV and Bj-V are not restricted to the fact of having used optimized methodologies that guaranteed the biological function of these, being able to correlate the structure and function in this proteins family of great importance in the study of venom of snakes.

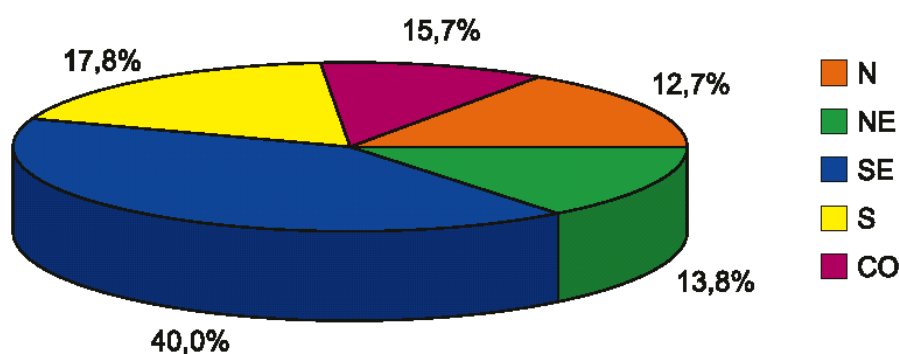
1. INTRODUÇÃO

1.1 Epidemiologia dos acidentes ofídicos no Brasil

Foram notificados a FUNASA (Ministério da Saúde Fundação Nacional de Saúde - 2001) no período de janeiro de 1990 a dezembro de 1993, 81.611 acidentes, o que representa uma média de 20.000 casos/ano para o país.

A maioria das notificações procedeu das regiões Sudeste e Sul, como mostra a Figura 1, as mais populosas do país e que contam com melhor organização de serviços de saúde e sistema de informação para a obtenção estatística dos dados coletados.

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



1.1.1 Coeficiente de incidência

Nos 81.611 casos notificados no período, o coeficiente de incidência para o Brasil foi de aproximadamente 13,5 acidentes/100.000 habitantes. Nas diferentes regiões do país, o maior índice foi no Centro-Oeste, como se observa na tabela 1. Ainda que apresente um alto coeficiente, é possível que ocorra subnotificação na região Norte, tendo em vista as dificuldades de acesso aos serviços de saúde, o mesmo ocorrendo para o Nordeste.

Tabela 1

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

Região	Coef.90	Coef.91	Coef.92	Coef.93
Brasil	13,78	13,30	14,08	13,94
Norte	24,44	23,23	23,77	25,89
Nordeste	6,77	6,71	6,23	7,65
Centro-Oeste	34,75	28,36	37,98	32,13
Sudeste	13,15	13,24	12,92	12,34
Sul	15,35	15,11	17,52	16,83

1.1.2 Gênero da serpente

Em 84% das 81.611 notificações analisadas o gênero da serpente é conhecido e em 16,34% o gênero da serpente envolvida não foi informado (tabela 2). Nos 65.911 casos de acidentes por serpente peçonhenta, quando esta variável foi referida, a distribuição dos acidentes, de acordo com o gênero da serpente envolvida, pode ser observada na tabela 2.

Tabela 2

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

Distribuição	nº acidentes	%
<i>Bothrops</i>	59.619	73,1
<i>Crotalus</i>	5.072	6,2
<i>Lachesis</i>	939	1,1
<i>Micrurus</i>	281	0,3
Não informados	13.339	16,3
Não peçonhentos	2.361	3,0

1.2 Aspectos gerais do veneno das serpentes.

Em torno de 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, açúcares, íons, lipídios e outros. (Tu, 1977).

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. Por tal motivo, alguns venenos são considerados principalmente neurotóxicos, como são os casos da cobra-coral, outros são principalmente vasculatórios, como a *Bothrops jararaca*, ou miotóxicos, citando como exemplo a *Bothrops jararacussu*.

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:

Oxirredutases: basicamente são encontrados dois tipos destas enzimas no veneno total das serpentes, as 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).

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).

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).

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).

Lipases: o veneno também possui várias enzimas lipolíticas, tais como as fosfolipases e as acetilcolinesterases. As fosfolipases A₂ são as lipases mais estudadas devido a sua importância biológica. (Tu, 1977).

Componentes não protéicos: a porção não protéica do veneno de serpentes é constituída por compostos orgânicos e inorgânicos.

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

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 A₂ (dependentes do Ca⁺²) e as proteínas trombina-like (dependentes de Mg⁺²) (Tu, 1977; Jia *et al.*, 1996).

No caso da *Naja naja*, por exemplo, os seus constituintes são: 14,5% Zn; 3,37% Ca⁺²; 6,49% Mg⁺²; 20,1% K⁺¹; 10,16% Na⁺¹; 27,94% SO₄⁻²; 11,90% Cl₋₁; 6,69% P₂O₄ e 0,028% de Fe⁺². (Ueda *et al.*, 1951).

1.3 O veneno Botrópico.

Aproximadamente 15% das 2500-3000 espécies de serpentes conhecidas são venenosas e podem ser divididas em cinco famílias: Viperidae, Crotalidae, Elapidae, Hydrophidae e Colubridae (Mengden, 1983; Mehrtens, 1987)

Dentro da família Viperidae há a subfamília das Crotalinae que compreende os gêneros: *Crotalus*, *Agkistrodon*, *Bothrops*, *Lachesis*, *Sistrurus* e *Trimeresurus*. A *Bothrops jararacussu* é uma serpente pertencente a esta subfamília Crotalinae, sendo amplamente disseminada na América do Sul.

No Brasil esta serpente é encontrada nos estados de Mato Grosso, São Paulo, Santa Catarina, Paraná, Rio de Janeiro, Espírito Santo, Minas Gerais e sul da Bahia e compreende vinte espécies (Rosenfeld, 1971).

Estas serpentes habitam ambientes úmidos (como matas e áreas cultivadas), locais de proliferação de roedores, zonas rurais e periferia de grandes cidades. Possuem hábitos noturnos e são consideradas muito importantes do ponto de vista epidemiológico, pelo número de acidentes registrados.

Os venenos das serpentes botrópicas causam, quando injetados na vítima, intensa dor local, às vezes com hemorragia e necrose tecidual tão graves que requer a amputação do membro atingido. (Brazil, 1911; Jiménez - Porras, 1973). Os venenos destas serpentes também são responsáveis por diversos outros efeitos tais como: coagulação sanguínea, parada cardiovascular, hemorragias, mioglobulúria e liberação de compostos

farmacologicamente ativos, semelhantes à histamina e bradicinina (Rothchild and Rothchild, 1979).

Costa., *et al* (1999) mostraram que o veneno de *Bothrops pirajai* possui um efeito miotóxico e neurotóxico, capaz de bloquear a resposta contrátil na preparação extensor digitorum longus (EDL) de camundongo.

Cogo., *et al* (1993) mostraram que o veneno de *Bothrops insularis* exibe um efeito neurotóxico na preparação *biventer cervicis* de pintainho (evidenciando ser dose dependente), e também quantificaram níveis elevados de CK, revelando também o efeito miotóxico desse veneno. Posteriormente, foi demonstrado que a responsável pelo efeito neurotóxico era uma fosfolipase A₂ cataliticamente ativa. (Cogo., *et al.*, 1998).

Soares, *et al.*, (2000) caracterizaram uma neurotoxina miotóxica, BnSP-7, uma Lys49 fosfolipasase A₂ de *Bothrops neuwiedi pauloensis*.

Lobo, *et al.*, (2002) também tem evidenciado que tanto o veneno como uma fração caseinolítica de *Bothrops lanceolatus* possui um efeito neurotóxico sobre a preparação *biventer cervicis* de pintainho, assim como os estudos eletrofisiológico mostram que o veneno total é capaz de aumentar ligeiramente a amplitude e frequência dos potenciais de placa em miniatura (PPM). No entanto, este efeito não foi observado na fração purificada. Estes resultados sugerem que esta neurotoxina purificada atua exclusivamente de forma pós-sináptica e se trata de uma proteína de 27,5 kDa com estrutura não fosfolipásica e uma única cadeia polipeptídica.

As serpentes do gênero *Bothrops* possuem venenos com ação coagulante, proteolítica e vasculatória:

Ação Coagulante: O veneno das serpentes botrópicas tem a propriedade de transformar diretamente o fibrinogênio em fibrina, além de ativar a protrombina da cascata de coagulação sanguínea. A fração do veneno que possui esta ação coagulante, atua de maneira diferente da trombina fisiológica pois, não é neutralizada pela heparina.

Ação Proteolítica ou Necrosante: Decorre da ação citotóxica direta nos tecidos por frações proteolíticas do veneno. Essa ação está relacionada com a quantidade de veneno inoculado, podendo haver liponecrose, mionecrose e lise das paredes vasculares.

Ação Vasculatória: Esta ação quando sistêmica é causada por fatores hemorrágicos denominados hemorraginas. Estas agem sobre vasos capilares, destruindo inicialmente a membrana basal e causando sua posterior ruptura. A ação das hemorraginas explica

casos de hemorragias sistêmicas, às vezes fatais, que ocorrem no cérebro, afetando o funcionamento do sistema nervoso central.

As neurotoxinas de origem botrópica têm sido isoladas e caracterizadas em preparações biológicas e não parecem desempenhar papel relevante no envenenamento botrópico. Os venenos botrópicos das espécies brasileiras, de forma geral, foram pouco estudados com relação as suas frações isoladas devido à falta de uma otimização na metodologia que permita a pronta recuperação da fração responsável do efeito neurotóxico sem perda da atividade biológica, com isso fica difícil afirmar que estas neurotoxinas botrópicas são mesmo pouco neurotóxicas ou se os estudos até hoje discutidos ainda são poucos para tal afirmação, já que existem fatores ainda desconhecidos que podem estar atuando de forma desapercibida e que merecem ser abordados desde uma ênfase bioquímica até uma biológica.

Os estudos sobre fatores neurotóxicos no veneno botrópico tem sido feitos em algumas espécies, como *Bothrops jararacussu* (Rodrigues-Simioni, *et al.*, 1983; Queiroz, *et al.*, 1984) e tem revelado valiosas informações a respeito de sua ação neurotóxica em preparação nervo-músculo e nervo ciático de rã, através de estudos miográficos e eletrofisiológicos.

1.4 *Bothrops jararacussu*.

Brazil e Rangel Pestana em 1909 iniciaram o estudo do veneno de *Bothrops jararacussu*. O veneno demonstrava intensa atividade coagulante e discreta ação proteolítica, quando comparado a outras espécies do gênero *Bothrops*.

Gonçalves em 1956 descreveu que o veneno de *Bothrops jararacussu* continha um peptídeo crotamine-like, enquanto Vital Brazil em 1966, verificou que essa peçonha apresentava à semelhança da crotoxina crotálica, a propriedade de inibir a contração causada pela ACh no diafragma desenergizado de rato.

De um modo geral, os venenos botrópicos das espécies brasileiras foram pouco estudados em seus componentes isolados e o veneno de *Bothrops jararacussu*, em particular, foi fracionado pela primeira vez por Vidal Stoppani em 1971, que dele isolaram duas PLA₂.

Queiroz *et al.* 1984 estudaram os efeitos locais do veneno de *Bothrops jararacussu*, após injeção em músculo tibial anterior de camundongo. Os autores constataram que o

veneno produzia necrose da fibra muscular, seguida de alterações vasculares e trombose e a recuperação da fibra muscular era muito deficiente, podendo resultar em seqüela permanente.

1.4.1 Bothropstoxina-I (BthTX-I) e Bothropstoxina-II (BthTX-II).

Rodrigues-Simioni, *et al.*, (1983), purificaram a partir do veneno total de *Bothrops jararacussu*, uma fração com atividade neurotóxica, denominada pool IV. Homs-Brandeburgo, *et al.*, (1988), combinando cromatografia de gel filtração em Sephadex G-75 com troca iônica em SP-Sephadex C-25, purificou uma fração com atividade neurotóxica e miotóxica denominada BthTX ($S_{III}SP_V$), conhecida como BthTX-I (Lys 49) e seqüenciada por Cintra, *et al.* (1993). A seqüência completa de aminoácidos da BthTX-I (fração $S_{III}SP_{IV}$) corresponde a 15% das proteínas do veneno total e trata-se de uma proteína Lys-49 de estrutura fosfolipásica A_2 , constituída por uma única cadeia polipeptídica com 121 resíduos de aminoácidos e massa molecular de 13 kDa.

Em 1992 Heluany., *et al* (1992) descreveram os efeitos induzidos pela BthTX-I sobre preparações musculares de camundongos e aves, avaliando a contratura e bloqueio da ação do músculo. Observaram ainda que a atividade bloqueadora da junção neuromuscular (JNM) não envolvia a participação do receptor nicotínico, nem a ativação do canal de Na^+ ; os autores sugeriram uma atuação da toxina sobre os sítios de ligação de Ca^{2+} na membrana.

Pereira, *et al* (1998) descreveram a seqüência completa de aminoácidos da BthTX-II de *Bothrops jararacussu*, uma miotoxina PLA_2 Asp-49, constituída por uma cadeia simples de 120 resíduos de aminoácidos e massa molecular em torno de 14 kDa ($Mr=13,976$), contendo uma metionina e 14 meias cistinas. Esta fração corresponderia à fração $S_{III}SP_{IV}$ purificada anteriormente por Homs-Brandeburgo, *et al.*, (1988).

1.5 Fosfolipase A_2 (PLA_2).

As fosfolipases A_2 (EC 3.1.1.4) são enzimas que catalisam especificamente a hidrólise da ligação acil-éster na posição sn-2 do 1,2 - diacil-3-sn fosfoglicerídeo em uma reação dependente de cálcio. (Arni e Ward, 1996) Fig. 2.

As fosfolipases A₂ são enzimas amplamente espalhadas na natureza, podendo ser encontradas em bactérias, plantas, tecidos de mamíferos (pulmão, fígado, baço, coração), eritrócitos, plaquetas e leucócitos polimorfonucleares (Van den Bosh, 1980).

No entanto, as mais conhecidas e amplamente estudadas são aquelas encontradas nos tecidos pancreáticos de mamíferos e nos venenos de répteis e insetos (Verheij *et al.*, 1981).

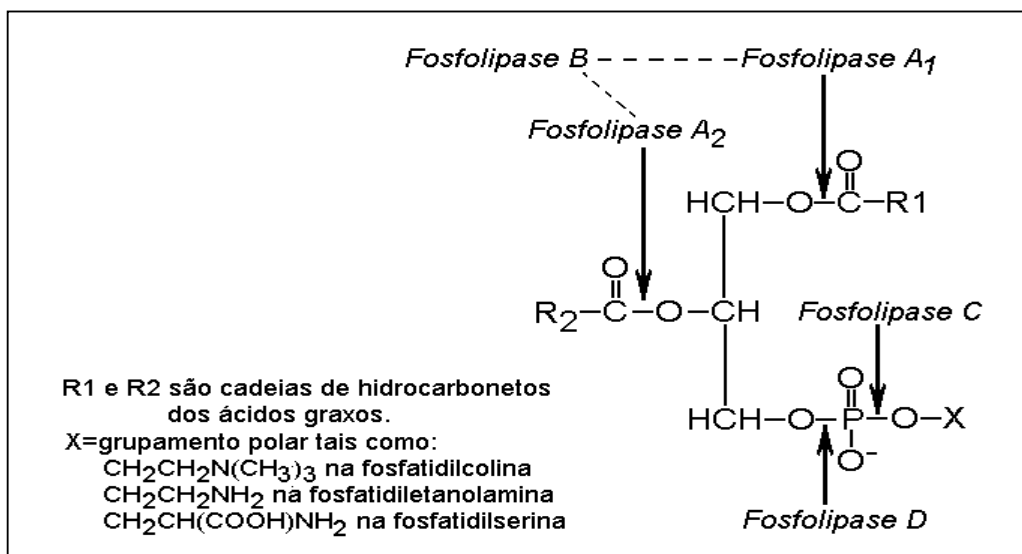


Figura. 2. Local de hidrólise de diferentes fosfolipases (Kini, 1997).

Estas fosfolipases A₂ foram as primeiras fosfolipases a serem conhecidas. Sua descoberta foi baseada na observação da ação do suco pancreático e do veneno da serpente na hidrólise de fosfatidilcolina (Wittcoff, 1951).

As PLA₂ têm papel fundamental no metabolismo de lipídeos e estão intimamente relacionadas com a liberação de ácido araquidônico, 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, inflamação, proliferação celular e vasoconstrição (Chang *et al.*, 1977; Bomalaski e Clark, 1993; Mukherjee *et al.*, 1994; Hanada *et al.*, 1995). Fig. 3.

Durante muitos anos, as PLA₂s conhecidas foram aquelas secretadas por pâncreas de mamífero e provenientes do veneno de serpentes. Estas PLA₂ são solúveis, extracelulares e possuem alto conteúdo de pontes dissulfeto, com uma massa molecular baixa de 14 kDa e requerem níveis de Ca²⁺ na ordem de mM para que ocorra a catálise.

Estas enzimas foram o assunto de numerosos estudos, incluindo a cristalografia e tem-se hoje um grande conhecimento de como estas enzimas secretadas atuam entre as interfaces das membranas lipídicas.

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.

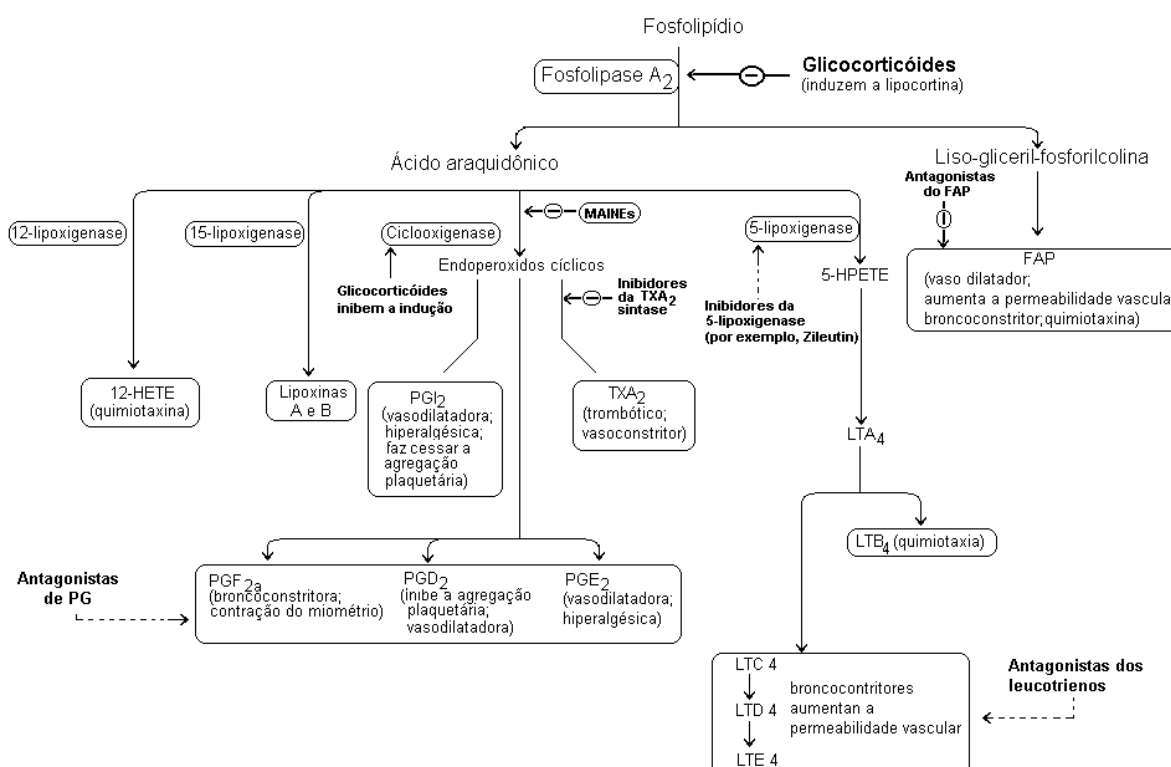


Figura 3. Visão geral da biossíntese de algumas prostaglandinas importantes, leucotrienos e um troboxano a partir do ácido araquidônico (Mayatepek & Hoffmann, 1995).

A evidência destas novas enzimas secretadas pode ser encontrada na recente reavaliação feita por Six e Dennis (2000). Até então a classificação das PLA₂ se baseava na descrição feita por Dennis (1994), ou seja, em quatro grandes classes: I, II, III e IV, sendo que as PLA₂ das classes I, II, e III foram classificadas como enzimas extracelulares, caracterizadas por um número alto de pontes dissulfeto, em torno de 5 a 7 e por

possuírem baixo peso molecular, em torno de 12 a 15 kDa. As PLA₂ da classe IV são constituídas pelas PLA₂ de alto peso molecular, de origem intracelular, que tem como substrato específico o ácido araquidônico.

As PLA₂ do grupo I são obtidas do veneno de serpentes da família Elapidae e de pâncreas de mamífero e possuem uma ponte dissulfeto entre os resíduos 11 e 77. As do grupo II são as primeiras PLA₂ que foram isoladas das serpentes da família Viperidae e não possuem a ponte dissulfeto entre os aminoácidos 11 e 77, mas estas possuem um adicional de seis resíduos de aminoácidos no extremo C-terminal, que acaba com uma ponte dissulfeto entre o último aminoácido e o resíduo 50. O grupo III é obtido do veneno de abelha e sua estrutura difere-se consideravelmente dos grupos I e II.

As PLA₂ do grupo IV podem ser consideradas as mais recentes dentro da família das PLA₂, do ponto de vista estrutural, estas são obtidas a partir de coração de cão. Estas PLA₂ têm duas cadeias polipeptídicas: uma longa com 77 resíduos de aminoácidos e uma curta com 42 resíduos de aminoácidos, ligados por pontes dissulfeto intercadeias. Estas enzimas mostram dependência de cálcio para sua atividade (McIntosh, 1995).

As fosfolipases A₂ foram também divididas em dois grandes grupos quanto à dependência de cofatores, principalmente do cálcio, são elas: PLA₂ cálcio dependente e PLA₂ cálcio independente.

Atualmente as PLA₂ tem sido classificadas segundo a Tabela 3, (Six e Dennis, 2000), sendo o grupo IB as melhores caracterizadas, correspondentes as PLA₂ de pâncreas de mamífero e as do grupo IIA originalmente isoladas do fluido sinovial de pacientes com artrite reumatóide.

No grupo II, da classificação recente, também se tem encontrado PLA₂ de diferentes tipos celulares, incluindo mitocôndria de rato.

Tem-se isolado vários outros tipos de PLA₂ que possuem características diferentes e claramente não se encaixam na classificação antiga. Por exemplo, o grupo IV (anteriormente classificada como PLA₂ citosólica humana) possui PLA₂s que têm sido identificadas em uma variedade de células com massa molecular de 85 kDa e com uma clara preferência pelo araquidonato, contido nos fosfolipídios das membranas e translocados ao citosol em presença de níveis sub-micromolares de Ca²⁺.

Os estudos de especificidade das PLA₂ do grupo IV recentemente descrito, incluem sua atividade de lisofosfolipase e um novo cátion ativador, como o bifosfato do fosfatidilinositol (PIP₂).

Duas novas PLA₂s de baixa massa molecular que tem sido clonadas e caracterizadas são as únicas contendo de 6 a 8 pontes dissulfeto. Estas PLA₂ originalmente foram identificadas a partir do cDNA do grupo II e IB, sendo que a posterior análise da seqüência de aminoácidos deduzida destas PLA₂ revelam um alto grau de homologia com as PLA₂ conhecidas e retém muito dos domínios conservados do sítio ativo de união ao Ca²⁺. As 12 cisteínas presentes e a falta de uma ponte dissulfeto unem as características do grupo I com o grupo II. Estas enzimas têm sido classificadas como grupo V e são liberadas por macrófagos ativados. (Six e Dennis, 2000).

Nessa nova classificação verifica-se a clonagem e expressão de uma nova PLA₂ humana, esta apresenta 16 cisteínas, sugerindo as características do grupo II e do grupo I, mas devido ao fato de possuírem uma ponte dissulfeto adicional, considera-se tais enzimas como pertencentes ao grupo IIC, totalmente oposto ao grupo das PLA₂ procedentes da linha celular do fluido sinovial do grupo IIA P388D₁ que é intracelular, citosólica e não dependente de Ca²⁺, seqüenciada e clonada com massa molecular de 80 kDa, aproximadamente, que parece ser estável na presença de ATP.

O fator de ativação plaquetária (PAF) acetilhidrolases e as PLA₂ secretadas adicionalmente também se encaixam na recente classificação das PLA₂.

Existe outro grupo de PLA₂ intracelulares tanto Ca²⁺ dependentes quanto Ca²⁺ independentes já descritas na literatura, no entanto, estas PLA₂ não apresentam características suficientes para permitir sua incorporação a um grupo suficientemente particular. Assim, estas PLA₂ podem ser de fato uma família muito mais diversa de enzimas do que se tenha considerado previamente.

No caso do veneno botrópico, como de outras espécies de serpentes, tem-se mostrado a presença de isoformas, que aparecem em um mesmo indivíduo ou em diferentes indivíduos da mesma espécie. Conhece-se que as serpentes possuem vários genes que codificam várias isoformas, no entanto a expressão e síntese dessas diferentes isoformas não é bem conhecida ainda e segundo Toyama (2000), a separação dessas isoformas só tem sido possível a partir da utilização de sistemas de HPLC de fase reversa.

Tabela 3: Características de um grupo maior de Fosfolipases A₂

<i>Grupo</i>	<i>Origem</i>	<i>Localização</i>	<i>Tamanho (kDa)</i>	<i>Requerimento de Ca²⁺</i>	<i>Nº de Pontes dissulfeto</i>	<i>Características moleculares</i>
I						
A	Elapídico e Hidrofilídico	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 Gaboon	Secretada	13-15	mM	6	Par His-Asp, C-terminal.
C	Testículo de rato	Secretada	15	mM	8	Par His-Asp, C-terminal.
III	Abelha e lagartos	Secretada	16-18	mM	5	Par His-Asp, C-terminal.
IV	Rim de rato novo 264.7 Plaquetas humanas U937	Citosólica	85	<µM		Ser-228 na sequência consenso GLSGS. Arg-200, Asp-549. Ser-505 fosforilação do sitio; Domino do sitio CaL B
V	Humano/rato/coração de camundongo, pulmão e macrófagos P388D1	Secretada	14	mM	6	Par His-Asp alça não elapídica e não C-terminal.
VI	Macrófagos da linhagem celular P338D1	Citosólica	80-85	-		Sequência consenso repetida GX SXG Complexos de 340 kDa
VII	Plasma humano	Secretada	45	-		Sequência consenso, GX SXG Ser-273, Asp-296, His-351
VIII	Cérebro bovino	Citosólica	29	-		Ser-47
IX	Caracol marinho	Secretada	14	<mM	6	Par His-Asp

CaL B = Ca²⁺-lipídio o C-2.

(Six DA, e Dennis E.A, 2000)

1.5.1 Ação biológica das PLA₂.

As PLA₂ de serpentes incluem vários efeitos farmacológicos tais como: neurotoxicidade pré e pós sináptica, miotoxicidade, atividade anticoagulante, convulsionante, hipotensiva, hemolítica, hemorrágica e edematológica (Kini e Iwanaga, 1986; Kini e Evans, 1987).

Além das PLA₂ cataliticamente ativas (Asp49) existem outras que são definidas conforme a sua natureza molecular como proteínas com estrutura molecular similar aos das PLA₂ (Asp49). São proteínas desprovidas de atividade catalítica, portanto para

desencadear suas atividades biológicas dependem de outros mecanismos, 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.(Figura 4).

Um outro motivo que reforçaria a desorganização gerada pela PLA₂, poderia ser a própria fluidez da membrana, sendo que alguns autores sugerem uma ligação ao próprio lipídio da membrana. (Gutierrez e Lomonte, 1995)

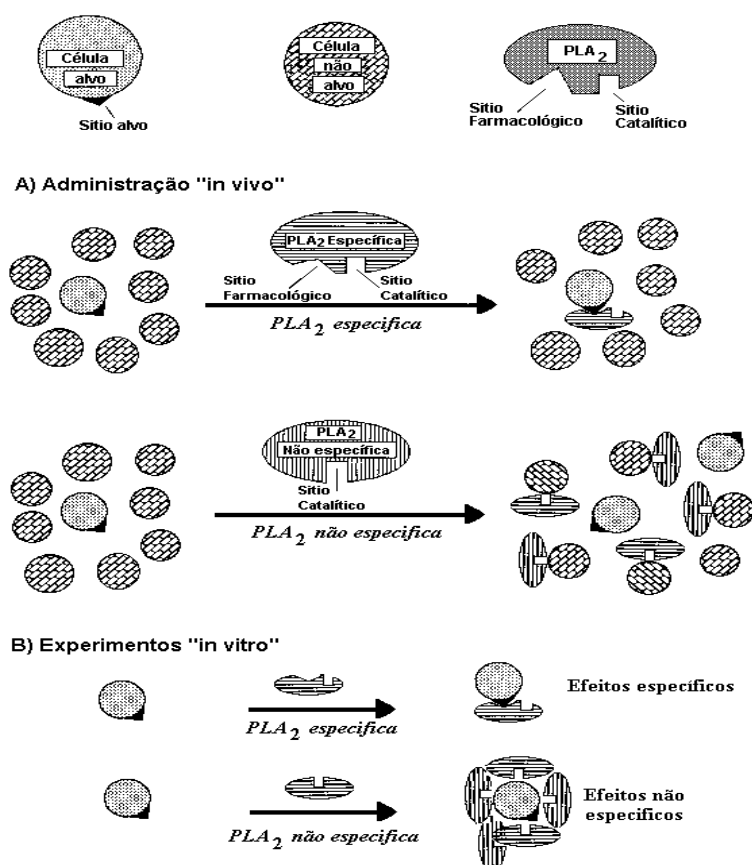


Figura 4. Interação das PLA₂ com as células alvos desencadeando efeitos farmacológicos.

O fundamento segundo o esquema da figura 4 está na capacidade de certas PLA₂ interagirem especificamente com determinadas células, através de “sítios alvos”. As PLA₂ não específicas podem interagir ao acaso com todos os tipos de células incluindo as “células alvos”. Assim o efeito farmacológico produzido pela interação da PLA₂ não específica é menos potente do que numa interação específica (Kini, 1997).

Todas essas atividades farmacológicas associadas a um tipo de macromolécula como as PLA₂, não dependem do mecanismo clássico de quebra do fosfolipídio. São, portanto, mecanismos independentes da atividade catalítica (Gutiérrez e Lomonte, 1995).

No modelo de ação das PLA₂ a unidade catalítica compreende os resíduos de aminoácidos Hist 48 (posição 48 da cadeia polipeptídica), Asp 99 e uma molécula de água (Figura 5). No mecanismo de catálise proposto, o próton na posição 3 do anel imidazólico da Hist 48 está envolvido em uma forte interação com o grupo carboxilato do Asp 99, impedindo que ocorra rotação do anel imidazólico, deixando o nitrogênio da posição 1 deste anel (que está envolvido na catálise) em posição espacial apropriada.

Uma molécula de água promove então o ataque nucleofílico ao carbono do grupo éster do substrato, e nesse momento o anel imidazólico da Hist 48 recebe um próton da molécula de água, facilitando a reação. Subseqüentemente à hidrólise da ligação acil-éster na posição sn-2 do fosfoglicerídeo (substrato), este próton é doado pelo anel imidazólico para o oxigênio que forma então o grupo álcool do lisofosfolipídeo a ser liberado. (Verheij *et al.*, 1980).

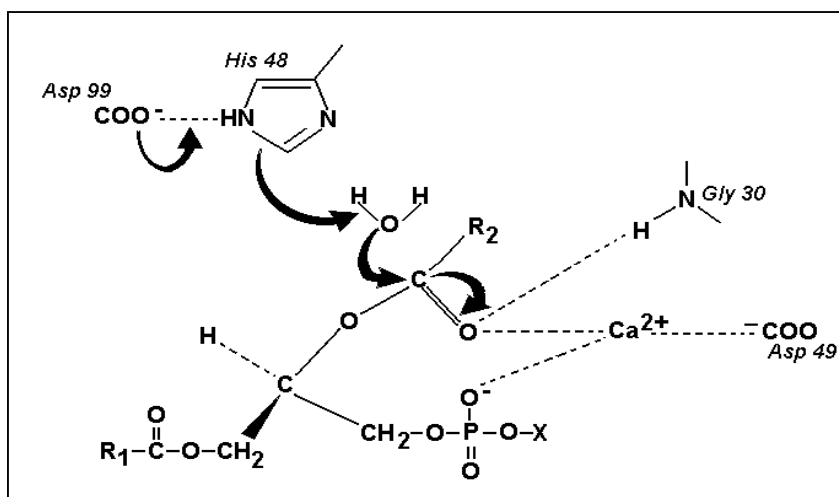


Figura 5. Representação esquemática do mecanismo catalítico proposto para as PLA₂. (Verheij *et al.*, 1980).

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 geral 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).

1.6 Miotoxinas PLA₂ “like”.

O modo de ação das PLA₂ miotóxicas Lys-49 e as Asp-49 no músculo ocorrem por vias diferentes, mas no geral podem causar lise rápida do sarcolema (membrana plasmática) e um rápido estado de mionecrose (Fletcher, *et al.*, 1996).

Várias miotoxinas isoladas nestes últimos anos têm sido caracterizadas como proteínas básicas de massa molecular em torno de 13 kDa. Estas miotoxinas PLA₂ “like” também se caracterizam pelo seu forte caráter associativo em dímeros, que é a forma mais comum de polimerização encontrada para as PLA₂ miotóxicas e eventualmente, em tetrâmeros. Estas associações são principalmente dependentes de resíduos de tirosina (Y). (Arni e Ward, 1996).

As miotoxinas isoladas até o presente momento são moléculas compactas, estáveis às variações de temperatura, pH, concentração salina alta e na presença de solventes orgânicos. Devido a estas características, as PLA₂ miotóxicas não se desnaturam em condições usuais de trabalho, durante os processos de purificação e testes biológicos (Gutierrez, *et al.*, 1995 e Toyama, *et al.*, 1995). Estas características são acentuadas principalmente quando as PLA₂ se encontram associadas, por exemplo, em dímeros.

As PLA₂ miotóxicas têm sido objeto de muitos estudos, pois corresponde à cerca de 20 a 30% do veneno total, sendo as toxinas mais abundantes existentes no veneno das serpentes. Muitas PLA₂ com atividade miotóxica ou farmacologicamente ativas, já foram estudadas do ponto de vista bioquímico e farmacológico.

Apesar da homologia, as PLA₂ de venenos possuem diferenças de ação biológica, desde sua atividade tóxica ao evento farmacológico que as diferentes PLA₂ desencadeiam nos sistemas biológicos. Dentre todas as atividades, a miotoxidade é a menos conhecida de todas (Selistre, *et al.*, 1996).

As atividades miotóxica e neurotóxica não são dependentes por completo da atividade fosfolipásica A₂, uma vez que miotoxinas isoladas e descritas apresentam em sua estrutura a substituição do ácido aspártico D(49) por uma lisina K(49) (Homs-Brandeburgo, 1988; Francis *et al.*, 1991; Toyama, *et al.*, 1995; Gutierrez e Lomonte, 1995 e Nakai *et al.*, 1995). As PLA₂, tanto D(49) como K(49) podem estar ou não na forma agregada, mais comumente na forma dimérica (Arni e Ward, 1996).

Estudos recentes de Ward, *et al.*, (2002), sobre mutagênese sítio-dirigida do sítio catalítico de fosfolipases Lys49 (K49) e sua atividade biológica da Bothropstoxina-I (BthTX-I), proveniente da serpente *Bothrops jararacussu*, evidenciam valiosas contribuições a respeito da atividade miotóxica e da ruptura de membranas artificiais por um mecanismo totalmente independente da atividade catalítica.

Estes estudos mostram a atividade comparativa entre BthTX-I nativa e algumas mutantes Lys49 por Asp, His48 por Gln e Lys122 por Ala, clonados e expressados em *E.coli* BL21(DE3), observando-se que ambas atividades, tanto na BthTX-I nativa como nas mutantes His48Gln e Lys49Asp, mostram uma atividade similar, no entanto a mutante Lys122Ala revelou uma diminuição de ambas atividades. A baixa atividade hidrolítica frente a um substrato misto de fosfolipídios, foi observada na BthTX-I nativa e nenhuma hidrólise foi detectada nas PLA₂ mutantes. No caso da mutante Lys49Asp, esta não mostrou atividade catalítica, evidenciando que a ausência desta atividade nas PLA₂ Lys49 não é uma consequência só da troca de Asp49 por Lys.

Também foram evidenciados que ambas atividades são Ca²⁺ independentes na ausência da hidrólise e a mutante Lys122Ala juncionalmente é importante, mostrando diretamente a evidencia estrutural de que o domínio C-terminal da BthTX-I é o responsável pela atividade biológica ao interagir com o alvo do tipo celular (Ward, *et.al.*, 2002).

No entanto, ainda permanece não muito claro a discussão a respeito do domínio responsável pela atividade neurotóxica, sendo que os estudos através dos índices hidropáticos das PLA₂ têm revelado algumas informações a respeito do conhecimento da região responsável pelo efeito neurotóxico, mas este precisa ser mais bem compreendido.

A atividade catalítica também é dependente da presença de certas regiões moleculares conservadas, como a região do short N-terminal, que é parte do canal hidrofóbico onde os lipídios entrariam para ser digeridos; modificações de alguns resíduos desta região parecem estar associadas também com perda das atividades biológicas,

como a agregação plaquetária. (Arni e Ward, 1996). Além desta região, uma outra, a N-terminal, parece estar associada a eventos de citotoxicidade. Não se sabe com certeza se a catálise também é importante para a expressão da atividade biológica das PLA₂, desta forma o estudo dessas regiões conservadas e dos resíduos que as constituem podem auxiliar em tal entendimento.

Assim, o isolamento e a caracterização de PLA_{2s} cataliticamente ativas é importante para poder ser utilizado como uma ferramenta molecular e modelo para ilustrar aspectos importantes que possam ajudar a definir mais claramente a diferença entre os eventos farmacológicos dos catalíticos.

1.7 Atividade neurotóxica.

Os venenos de serpentes são considerados um cocktail de toxinas e enzimas que estão envolvidos na mobilização da presa para facilitar a captura e digestão das presas, assim como para a defesa contra predadores.

Um dos maiores alvos dos venenos de serpentes é o sistema nervoso somático, em particular a junção neuromuscular. A inibição dos neurotransmissores neste sítio resulta na paralisia dos músculos bulbares e oculares, assim como paralisia dos músculos respiratórios (Campbell, 1966; Laloo, 1996), resultando em morte.

As neurotoxinas de veneno de serpentes que alteram a transmissão no nervo motor terminal tem sido de considerável importância clínica e de pesquisas durante as últimas três décadas. Sua estrutura e modo de ação têm sido estudados de forma muito extensa. Devido aos maiores avanços nas técnicas da química de proteínas, as neurotoxinas são continuamente isoladas do veneno de diversas espécies de serpentes (Tu, 1991).

Estudo dos detalhes da estrutura química tem revelado uma inesperada inter-relação entre estrutura e função. O bloqueio do processo fisiológico é uma situação vital a ser abordada assim como o conhecimento do sítio responsável e o mecanismo de ação a nível molecular. A ação neurotóxica não só se confina no nervo motor terminal; as pesquisas recentes têm mostrado esta ação em diferentes preparações nervosas (Tu, 1991).

1.7.1 Toxinas Pré-sinápticas.

Denominadas como β neurotoxinas, estas toxinas inibem o processo de liberação da acetilcolina e sua liberação é em geral maior do que a das toxinas pós-sinápticas, como exemplo, pode-se citar a toxina β -bungarotoxina, que é uma toxina composta por duas subunidades de 8800 e 12400 daltons, que estão interligadas por pontes dissulfeto (Chang *et al.*, 1973).

Interessantemente, suas atividades neurotóxicas não aparentam estar diretamente correlacionadas a sua atividade fosfolipásica e a subsequente hidrólise de fosfolipídios de membrana. (Rosenberg, 1989).

A neurotoxina pré-sináptica pode ser um polipeptídeo de cadeia simples (e.g notexina) ou toxinas que consistem de múltiplas subunidades. Por exemplo, crotoxina, taipoxina e textiloxina consistem de duas, três e cinco subunidades, respectivamente.

Dois tipos de neurotoxinas pré-sináptica provenientes de veneno de serpentes já são conhecidas: as β -neurotoxinas que são caracterizadas pela presença da atividade catalítica PLA₂ e tem sido estabelecidas nos venenos de serpentes das famílias *Elapidae*, *Crotalidae* e *Viperidae* e as neurotoxinas pré-sinápticas facilitadoras, incluindo a *dendrotoxina* com bloqueio do canal de potássio voltagem-dependente, e a toxina *antiacetilcolinesterase*, o fasciculins. As toxinas do segundo grupo são próprias de veneno de *Dendroaspis*. São polipeptídios com seqüências homólogas aos inibidores de proteinases tipo Kunitz e com as curare-like pós-sinápticas que são α -neurotoxinas e cardiotoxinas respectivamente (Harvey, *et al.*, 1994).

A maioria dos venenos contém múltiplas isoformas de uma neurotoxina que diferem em suas seqüências de aminoácido (Harris, 1991). Por enquanto não parece existir uma correlação direta entre cadeia estrutural e potência, mas tem sido postulado que há uma relação entre cadeia estrutural e ligação. Algumas das neurotoxinas pré-sinápticas têm sido bem caracterizadas, enquanto outras (e.g paradoxina) requerem mais investigações. Em geral, estas toxinas produzem bloqueio neuromuscular por inibição da liberação de acetilcolina do nervo terminal. A ação neurotóxica caracterizada pelo bloqueio neuromuscular (como consequência da inibição da liberação da acetilcolina, no terminal nervoso) não altera significativamente a sensibilidade da placa motora para a acetilcolina, ou seja, quando age uma neurotoxina pré-sináptica, não necessariamente há destruição do músculo da fibra muscular.

1.7.2 Toxinas Pós-sinápticas:

São toxinas que se ligam aos receptores colinérgicos nicotínicos da região sub-sináptica da placa motora. Denominadas como α -neurotoxinas, atuam semelhantemente ao curare, mas sua combinação com os receptores se faz de forma não covalente. As neurotoxinas pós-sinápticas são de baixo peso molecular (7 a 8 kDa) e são desprovidas de atividade enzimática (Karlsson, *et al.*, 1979).

2. OBJETIVOS

2.1 Purificação de isoformas de BthTX-II (PLA₂): Bj-IV e Bj-V, a partir do veneno bruto de *Bothrops jararacussu*.

2.2 Caracterização bioquímica das isoformas de BthTX-II (PLA₂): Bj-IV e Bj-V, provenientes da purificação do veneno bruto de *Bothrops jararacussu* através de:

2.2.1 Eletroforese SDS PAGE

2.2.2 Composição de aminoácidos (Sistema Pico Tag) (Waters).

2.2.3 Seqüência N-terminal

2.2.4 Estudo da cinética enzimática, incluindo efeito da concentração de substrato, pH, temperatura, íons divalentes e medida da atividade inibitória de crotapotinas.

2.3 Caracterização biológica das isoformas de BthTX-II (PLA₂): Bj-IV e Bj-V, provenientes da purificação do veneno bruto de *Bothrops jararacussu* através de:

2.3.1 Junção neuromuscular em nervo-frênico diafragma interno de camundongo.

2.3.2 Atividade neurotóxica em músculo *biventer cervicis* de pintainho.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Venenos e Reagentes

O veneno total de *Bothrops jararacussu* é adquirido da Bio-Agents Serpentário Proteínas Bioativas Ltda (Fazenda Boa Esperança, Batatais, São Paulo).

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

3.2 Animais

São utilizados para os ensaios biológicos e farmacológicos pintainhos e camundongos Swiss (18-20 g) obtidos no biotério central da UNICAMP. Segundo o Protocolo nº 606-2 o projeto está de acordo com a COBEA, tendo sido aprovado pela (CEEa)-IB-Unicamp.

3.3 Purificação das isoformas de BthTX-II (Bj-IV e Bj-V) a partir do veneno total de *Bothrops jararacussu*.

3.3.1 HPLC Troca Iônica.

Para a purificação do veneno total de *Bothrops jararacussu*, é utilizada uma coluna Protein-Pack SP 5PW (0,78 x 8 cm) (Waters). O sistema cromatográfico utilizado é o APPS LC 650E (Waters), equipado com uma bomba para quatro canais de solventes.

A coluna e o sistema cromatográfico é previamente equilibrado com tampão inicial (Bicarbonato de Amônio 0,2M, pH 7,9). A eluição das amostras é realizada usando-se um gradiente linear de concentração de Bicarbonato de Amônio (0.05M - 1,0M, pH 7,9).

A corrida cromatográfica é monitorada em 280nm e as frações são coletados em um coletor automático Foxy 200. As amostras obtidas são agrupadas formando pools respectivos e posteriormente liofilizadas e guardadas a - 20 C.

3.3.2 HPLC de Fase Reversa.

As amostras provenientes do LC de troca iônica são repurificadas em uma coluna u-Bondapack C-18 (0,78 x 30 cm) preparativa (Waters) acoplada a um sistema cromatográfico HPLC de fase reversa – PDA 991 (Waters), equipado com duas bombas Waters, modelo 510/B, injetor automático de amostras U6K com um loop de 2,0 ml.

A coluna é previamente equilibrada com tampão A (0,1% TFA) e as amostras são eluídas usando um gradiente linear de acetonitrila 66% (tampão B), com algumas modificações no gradiente para a otimização na purificação. A corrida cromatográfica é monitorada a 280nm e posteriormente liofilizada.

3.4 Caracterização bioquímica das isoformas de BthTX-II (Bj-IV e Bj-V) a partir do veneno total de *Bothrops jararacussu*.

3.4.1 Eletroforese em SDS-PAGE

A eletroforese em gel de poliacrilamida é realizada de acordo com a metodologia descrita por Laemmli (1970), onde as placas de poliacrilamida (PAGE) são feitas de modo descontínuo. O gel de concentração de 5% e um gel de corrida de 12,5%. de acrilamida estoque (30%T, 0,8%C). Para o gel de concentração é usado o tampão Tris-HCl 0,5M, pH 6,8, enquanto que para o gel de corrida é usado o tampão Tris-HCl 1,0M, pH 8,8. Em ambos os géis foram acrescentados 0,1% (v/v) de SDS 20%.

A corrida eletroforética é realizada em um Sistema High Small II SE 250 (Hoefer Scientific). Tanto as amostras quanto os marcadores foram dissolvidos no tampão de amostra (Tris-HCl, 0,075M, pH 6,8; 10% de Glicerol; 4% de SDS; 0,001% de Bromofenol). A corrida eletroforética é realizada usando-se uma amperagem constante de 40 mA, durante 60 minutos, ao final da eletroforese os géis foram corados com solução de Coomassie Blue 0,05% a 37°C e o excesso de corante removido em ácido acético 7%. Também são utilizados, para análises do grau de homogeneidade molecular das amostras, a eletroforeses em gel de PAGE-SDS-Tricina, de acordo com o método descrito por Schagger e Von Jagow (1987).

3.4.2 Medida de atividade PLA₂.

A medida da atividade PLA₂ é feita seguindo-se o método descrito por Cho e Kézdy (1991) e Holzer e Mackessy (1996) modificado por Ponce-Soto, *et al.*, (2002).

São utilizadas amostras na concentração de 1 mg/ml de PLA₂. O ensaio padrão continha 200 ul de tampão (10 mM de Tris-HCl, 10 mM de CaCl₂, 100 mM NaCl e pH 8.0), 20 ul de substrato (o substrato utilizado foi o ácido 4-nitro-3-(octanoiloxy) benzóico), 20 ul de água deionizada e 20 ul de amostra em um volume final de 260 ul.

Posteriormente à adição de 20 µl das isoformas de BthTX-II, Bj-IV e Bj-V (PLA₂); a mistura é incubada por 40 min a 37 °C e lida a absorbância de 425 nm em intervalos de 10 em 10 minutos. A atividade enzimática é calculada baseada no aumento da absorbância depois de 20 minutos e após o tempo de reação é adicionada Triton X100 para parar a reação. O sistema utilizado é um Versamax 190 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) e são utilizadas placas para microtitulação de 96-well.

3.4.3 Estudos cinéticos das isoformas de BthTX-II, Bj-IV e Bj-V (PLA₂)

As isoformas de BthTX-II, Bj-IV e Bj-V (PLA₂), depois de purificadas são estudadas do ponto de vista cinético. Os experimentos são feitos em triplicatas (n=3) e os resultados obtidos a partir de suas médias.

3.4.3.1 Efeito da concentração de substrato na atividade PLA₂ das isoformas de BthTX-II, Bj-IV e Bj-V.

Esse ensaio é feito variando-se a concentração do substrato 3-nitro-4(octanoiloxi) ácido benzóico de acordo com o método 3.4.2.

3.4.3.2 Efeito do pH na atividade das isoformas de BthTX-II, Bj-IV e Bj-V (PLA₂).

O experimento do efeito do pH sobre a atividade PLA₂ das isoformas de BthTX-II, Bj-IV e Bj-V, é realizado em meios de reação preparados com diferentes valores de pH (4,0-10,0), sendo que a determinação da atividade PLA₂ e a concentração da enzima idêntica ao item 3.4.2 e para cada pH é feito um controle. Os tampões utilizados nesse experimento são: tampão citrato de sódio-HCl pHs 4,5; 5,0 e 5,5, tampão fosfato-NaCl pHs 6,0; 6,5; 7,0 e 7,5, tampão Tris-HCl pHs 8,0; 8,5 e tampão glicina-NaOH pHs 9,0; 9,5 e 10,0 respectivamente.

3.4.3.3 Efeito da temperatura na atividade das isoformas de BthTX-II, Bj-IV e Bj-V (PLA₂).

O experimento para a observação do efeito da temperatura sobre a atividade PLA₂ das isoformas de BthTX-II, Bj-IV e Bj-V, é realizado segundo o método descrito em 3.4.2 com ensaio padrão contendo: 100 µl de substrato, 100 µl de água deionizada, 1000µl de

tampão (Tris-HCl 10 mM, CaCl₂ 10 mM, NaCl 100 mM, pH 8,0) e 100 µl de PLA₂. A temperatura variou de 30-70 °C e foi mantida por 20 minutos e lida em seguida a 425 nm.

3.4.3.4 Efeito de íons divalentes na atividade PLA₂ das isoformas de BthTX-II, Bj-IV e Bj-V.

A atividade PLA₂ das isoformas de BthTX-II, Bj-IV e Bj-V, na presença de íons divalentes, como Ca⁺², Mn⁺², Mg⁺², Zn⁺² e Cu⁺², é determinada segundo o método descrito em 3.4.2.

3.4.4 Medida da atividade inibitória de crotapotinas crotálicas sobre a atividade PLA₂ das isoformas de BthTX-II, Bj-IV e Bj-V.

A atividade específica das PLA₂ frente as diferentes crotapotinas crotálicas foi calculada seguindo o mesmo protocolo para a determinação da atividade fosfolipásica A₂ no item 3.4.2. As isoformas de BthTX-II, Bj-IV e Bj-V (PLA₂), na mesma concentração, são pré-incubadas com as crotapotinas por 20 minutos no tampão de reação, na razão molar de 1:1 (M/M), sendo que o meio de pré-incubação é o mesmo do ensaio enzimático sem a enzima, após isso, as amostras são colocadas no meio de reação e a velocidade expressa em quantidades de produto formado.

3.4.5 Análise da composição de aminoácidos.

A análise de aminoácidos é realizada no analisador automático de aminoácidos PICO TAG (Sistema Waters) seguindo a metodologia descrita por Henrikson e Meredith (1984). Os aminoácidos derivatizados (PITC aminoácidos) das amostras são identificados, em uma coluna de fase reversa, de acordo com o tempo de retenção dos PTC-aminoácido padrão. Para estimativa da composição global será realizado de acordo com método descrito por Toyama, *et al.*, (1995, 1998).

A determinação do triptofano é 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 seguirá os procedimentos anteriormente descritos.

3.4.6 Estudo da sequência N-terminal e estudos de homologia.

A sequência direta N-terminal é feita com a proteína reduzida e carboximetilada usando o seqüenciador da Applied Biosystem modelo 477A automático. O PTH (feniltioidantina) aminoácidos são identificados por comparação com seus tempos de retenção com standards de 20 PTH aminoácidos. Os peptídeos contendo ^{14}C -CM-Cys são monitorados e detectados por radioatividade usando um líquido que contém cintilação (Beckman model L-250). Os estudos de homologia seqüencial são realizados utilizando os banco de dados da SWISS-PROT: Annotated protein sequence database (<http://www.expasy.ch/sprot/>).

3.5 Caracterização neurotóxica das isoformas de BthTX-II (Bj-IV e Bj-V) a partir do veneno total de *Bothrops jararacussu*.

3.5.1 Estudo da atividade neurotóxica na preparação nervo frênico-diafragma isolado de camundongo (NF-DIC).

Para estes experimentos são utilizados preparações com nervo frênico de diafragma de camundongo. A preparação é removida cirurgicamente de animais anestesiados com hidrato de cloral (3 mg/Kg) e mortos por secção e sangria dos vasos cervicais. A preparação (músculo diafragmático, juntamente com seu nervo motor, o nervo frênico) é cuidadosamente retirada como descrito por Bülbring, 1946, e colocada em uma cuba contendo 5,0 mL. ou 3 mL. de solução de Tyrode e, em seguida presa através dos músculos da costela, por dois ganchos existentes na base da cuba. A temperatura é mantida a 37°C e a preparação aerada com carbogênio (mistura de 95% O₂ e 5% de CO₂). Os registros da força de contração musculares, em resposta a estímulos são realizados através de transdutor isométrico Load Bell BG 10GM, acoplado a um fisiógrafo Gold Universal Amplifier Model RS 3400.

O músculo é submetido à tensão constante de 5 g/cm por meio de um fio preso a porção tendinosa ligado ao transdutor isométrico sendo a estimulação indireta, com pulsos supramaximais, gerados por estimuladores S48F (Grass Instruments), de 0,2 ms de duração e 0,1 HZ de frequência, durante 20 minutos para estabilização. Ao final do período de incubação são adicionadas ao banho as amostras do veneno total de *Bothrops jararacussu* em doses de 50 µg/ml e de 100 µg/ml.

3.5.2 Medida da atividade neurotóxica em músculo *biventer cervicis* de pintainho.

A preparação é isolada e montada segundo o método de Ginsborg e Warriner (1960). Os pintainhos são anestesiados com éter etílico e após o isolamento, o músculo é suspenso em uma cuba de 5 ml contendo solução nutritiva de Krebs composta em mM por: NaCl 118,6; KCl 4,69; CaCl₂ 1,88; KH₂PO₄ 1,17; MgSO₄ 1,17; MgSO₄ 1,17; NaHCO₃ e C₆H₁₂O₆ 11,65. A solução é arejada de modo constante com carbogênio (mistura 95% O₂ e 5% CO₂) e mantida a 37°C. A preparação é submetida a uma tensão constante de 0,5 g e estimulada por meio de eletrodos bipolares (estimulação de campo).

São aplicados pulsos supramaximais de 0,1 Hz de frequência e 0,2 ms de duração (estimulador Grass S48). As contrações musculares resultantes de estímulos elétricos maximais e as contraturas em resposta à adição de KCl (13,4 mM) e ACh (14,6 µM) são registradas em fisiógrafo Gould RS 3400, por meio de transdutores isométricos Load Cell BG-10 GM.

Os registros das contraturas para KCl e ACh são realizados com ausência de estimulação elétrica, no início (antes da adição de veneno) e no final do experimento (após 120 minutos de incubação com o veneno).

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 Purificação das isoformas de BthTX-II, Bj-IV e Bj-V PLA₂ (D49) do veneno de *Bothrops jararacussu* através de cromatografia de troca iônica, em SP 5 PW (Waters) LC.

O veneno total de *Bothrops jararacussu* submetido à coluna de troca iônica SP 5 PW (0.78 x 8 cm) (Waters) LC mostrou a presença de nove frações (Bj-I – Bj-IX) conforme à Figura 6, sendo identificadas as frações Bj-IV e Bj-V, como isoformas de BthTX-II (PLA₂) D49 e Bj-VII (BthTX-I) PLA₂ K49. As frações Bj IV e Bj V mostraram atividade PLA₂ moderada, enquanto que a Bj-VII mostrou apenas uma atividade residual (Figura 1). Os picos Bj-IV, Bj-V e Bj-VII foram liofilizados e estocados a – 20 °C.

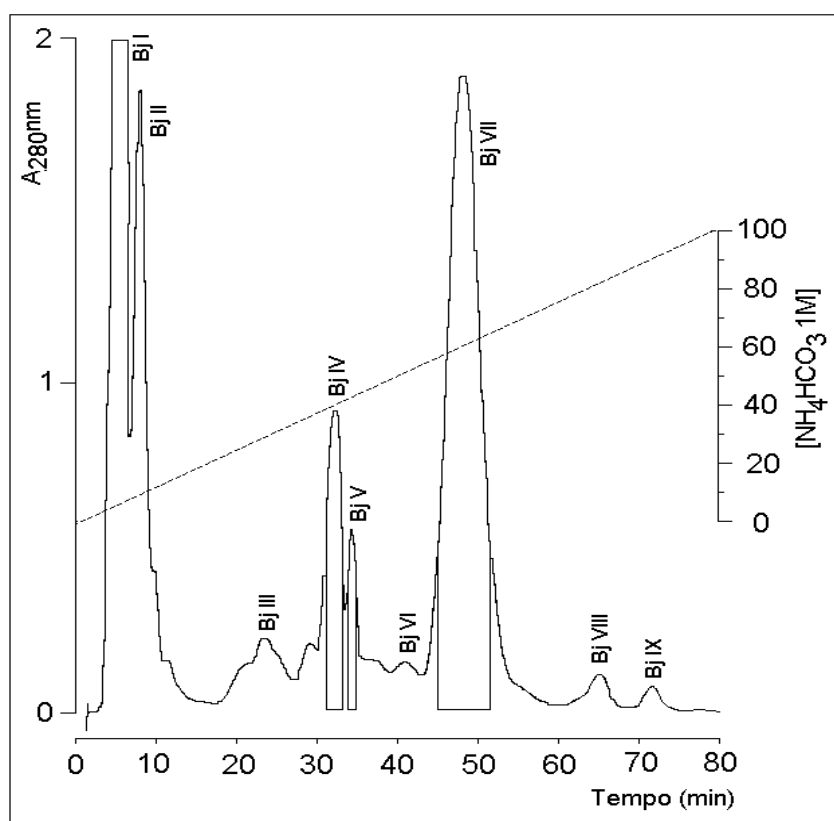


Figura 6 Cromatografia de troca iônica em LC, Protein Pack SP5PW (0,78 cm x 7,0 cm) (Waters) do veneno total de *Bothrops jararacussu*. As frações são identificadas como Bj-I a Bj-IX. A amostra foi eluída a partir de um gradiente linear com tampão bicarbonato de amônio (0,05-1,0 M), a um fluxo de 1 ml/min, monitorado a uma absorbância de 280 nm. (-) frações selecionadas.

4.2 Repurificação das isoformas de BthTX-II, Bj-IV e Bj-V PLA₂ (D49 de *Bothrops jararacussu* em HPLC de fase reversa.

As isoformas de BthTX-II (Bj-IV e Bj-V), anteriormente obtidas em coluna de troca iônica, foram submetidas a uma etapa de re-purificação para se confirmar o grau de pureza. A corrida foi realizada em uma coluna μ -Bondapack C-18 (0,78 x 30 cm) preparativa, acoplada a um sistema de HPLC de fase reversa – PDA 991 (Figura 7) e o perfil cromatográfico das frações Bj-IV e Bj-V mostraram a presença de um único pico de eluição, com uma diferença de tempos de retenção de apenas 6 décimos de segundos, sendo para Bj-IV $31,25 \pm 0,31$ minuto e para Bj-V $31,31$ minutos $\pm 0,28$.

A análise em HPLC de fase reversa das frações Bj-IV e Bj-V evidenciaram o alto grau de homogeneidade molecular que ficou em torno de 95% de pureza.

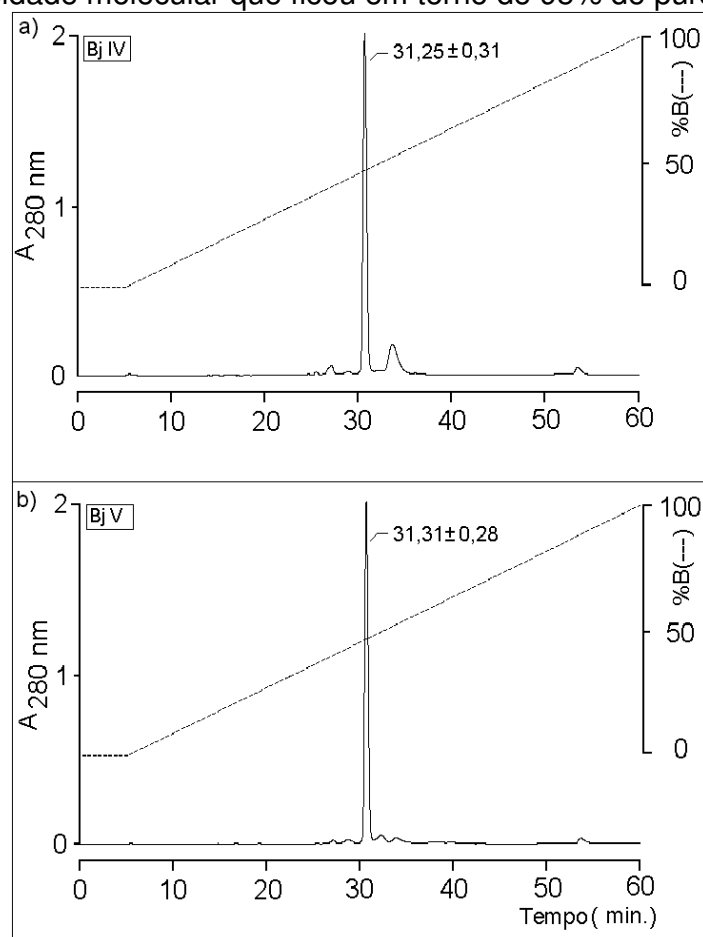


Figura 7 Repurificação das isoformas de BthTX-II (PLA₂): Bj-IV e Bj-V usando cromatografia de fase reversa HPLC, coluna μ -Bondapack C18 (0,78 cm x 30 cm; Waters 991-PDA). As isoformas foram eluídas através de um gradiente linear (0-100%) usando-se um tampão 66,5% de acetonitrila em 0,1% (v/v) de ácido trifluoroacético (solvente B), a um fluxo de 2,0 ml/min e monitorado a 280 nm.

4.3 Eletroforese em SDS-PAGE das isoformas de BthTX-II, Bj-IV e Bj-V PLA₂ (D49) de *Bothrops jararacussu*.

A eletroforese mostrou que as isoformas de BthTX-II, Bj-IV e Bj-V possuem uma massa molecular em torno à ~14 kDa quando se encontram reduzidas com DTT sendo que a tendência em formar agregados (dímeros) aparece em condições não reduzidas, conforme evidencia a Figura 8, respectivamente.

As frações de interesse migraram como uma banda eletroforética simples em condições reduzidas, demonstrando uma alta homogeneidade molecular.

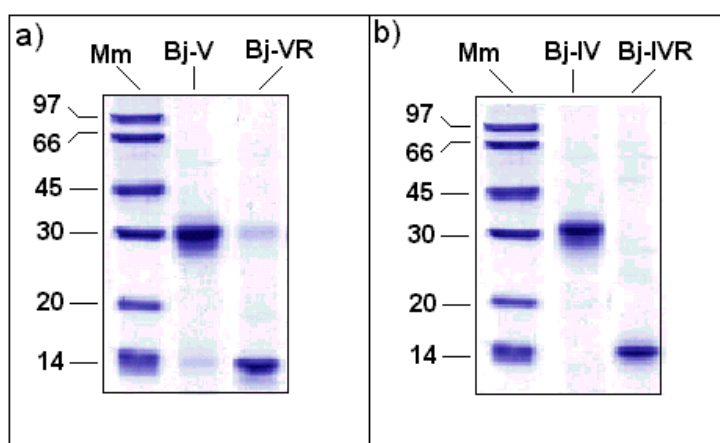


Figura 8 Eletroforese em gel de Tricina (16,5%) em SDS-PAGE, corado com comassie blue. Em a é ilustrado a isoforma de BthTX-II: Bj-V nas condições não reduzidas (nr) e reduzidas (r) e em b é ilustrada a isoforma de BthTX-II: Bj-IV nas mesmas condições. Em a e b as isoformas são comparadas com 6 marcadores de peso molecular ($\times 10^3$).

4.4 Medida da atividade PLA₂ do veneno total, isoformas de BthTX-II, Bj-IV e Bj-V PLA₂ (D49) e da BthTX-I, Bj-VII PLA₂ (K49).

A medida da atividade fosfolipásica foi realizada segundo Cho e Kézdy (1991) e Holzer e Mackessey (1996).

A atividade PLA₂ para o veneno total é $5,42 \pm 0,23$ nmoles/min; isoformas de BthTX-II, Bj-IV $15,35 \pm 0,30$ nmoles/min e Bj-V $13,18 \pm 0,47$ nmoles/min. e a atividade da BthTX-I, Bj-VII $0,35 \pm 0,13$ nmoles/min. (Figura 9).

As PLA₂, isoformas de BthTX-II, Bj-IV e Bj-V, quando isoladas mostraram maior atividade PLA₂ quando comparadas com a atividade do veneno total, já a fração Bj-VII (PLA₂) proveniente da BthTX-I apresentou uma residual atividade PLA₂.

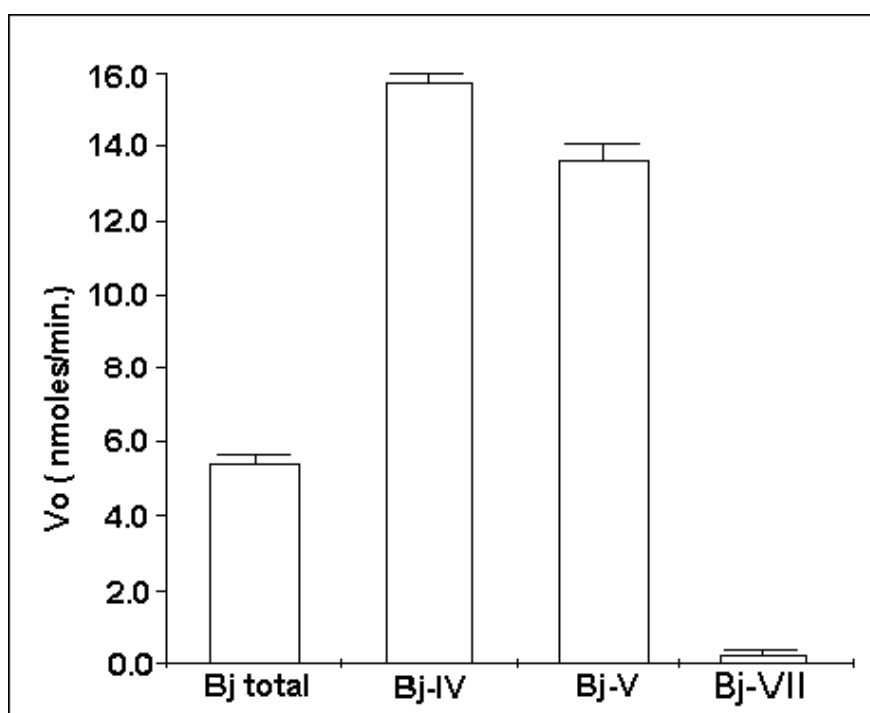


Figura 9 Atividade PLA₂ proveniente do veneno total e das isoformas de BthTX-II, Bj-IV e Bj-V (PLA₂) e da BthTX-I, Bj-VII (PLA₂) utilizando como substrato o 3-nitro-4(octanoiloxi) ácido benzóico.

4.5 Estudos cinéticos das isoformas de BthTX-II, Bj-IV e Bj-V (PLA₂)

4.5.1 Efeito da concentração de substrato na atividade PLA₂ das isoformas de BthTX-II, Bj-IV e Bj-V.

O efeito da concentração do substrato na atividade PLA₂ das isoformas de BthTX-II Bj-IV e Bj-V sobre o substrato 3-nitro 4-(octanoyloxy) benzoic ácido mostrou que as isoformas de Bj-IV e Bj-V, (PLA₂) tem um comportamento próximo do alostérico devido ao padrão de curva apresentado. (Figura 10).

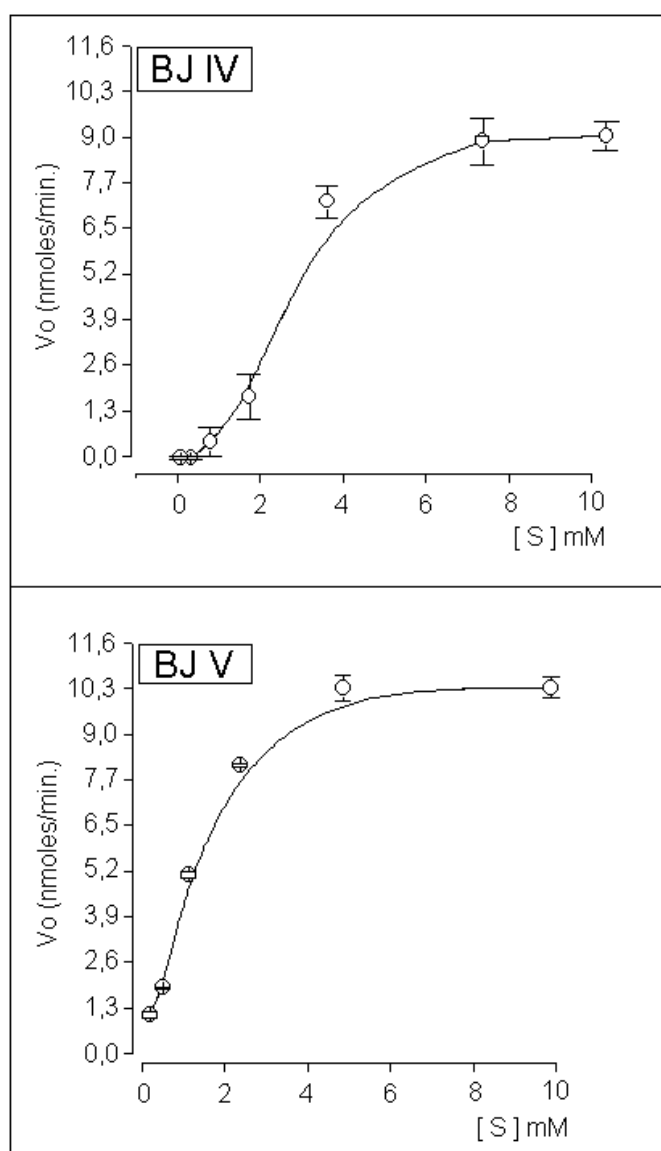


Figura 10 Efeito da atividade PLA₂ das isoformas de BthTX-II, Bj-IV e Bj-V. em diferentes concentrações do substrato 3-nitro 4-(octanoyloxy) ácido benzóico.

4.5.2 Efeito do pH na atividade das isoformas de BthTX-II, Bj-IV e Bj-V (PLA₂)

Os valores de pH foram determinados, incubando as isoformas de BthTX-II PLA₂ (Bj-IV e Bj-V) em diferentes pHs [4-10], sendo feito um controle para cada pH. Os pHs ótimos para ambas isoformas estavam em torno de 8,3 conforme mostrado na Figura 11a e b respectivamente.

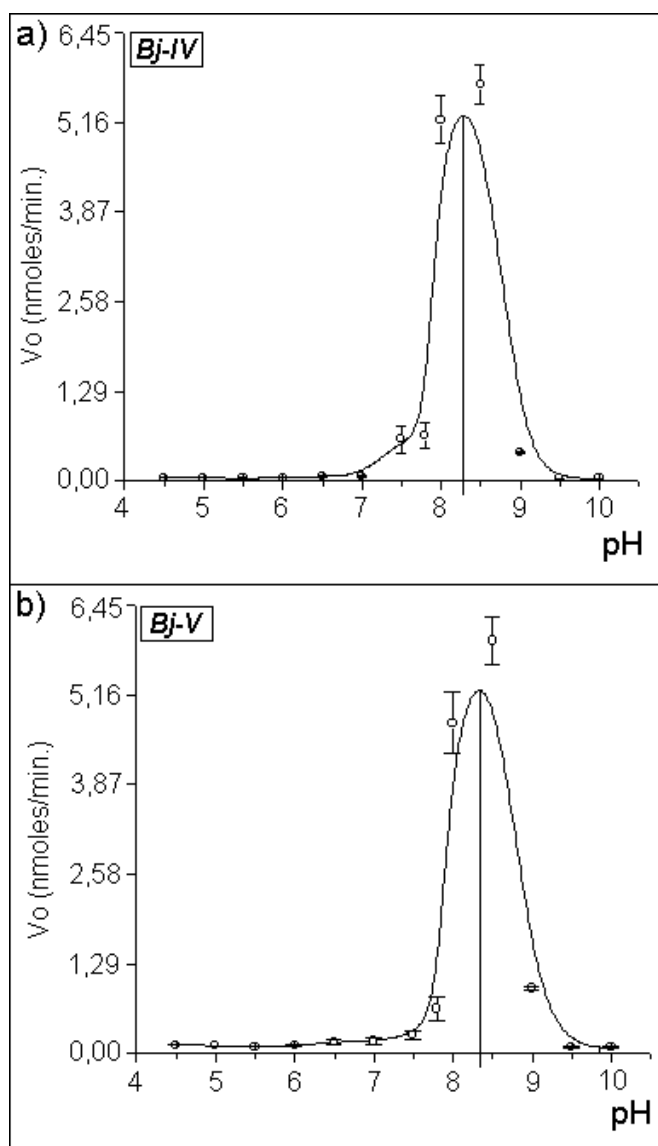


Figura 11 Efeito de diferentes pHs sobre a atividade PLA₂ das isoformas de BthTX-II, Bj-IV e Bj-V.

4.5.3 Efeito da temperatura na atividade das isoformas de BthTX-II, Bj-IV e Bj-V (PLA₂)

A temperatura ótima para a atividade biológica das isoformas de BthTX-II, Bj-IV e Bj-V, ficou próxima a 37°C. conforme ilustrado na Figura 12.

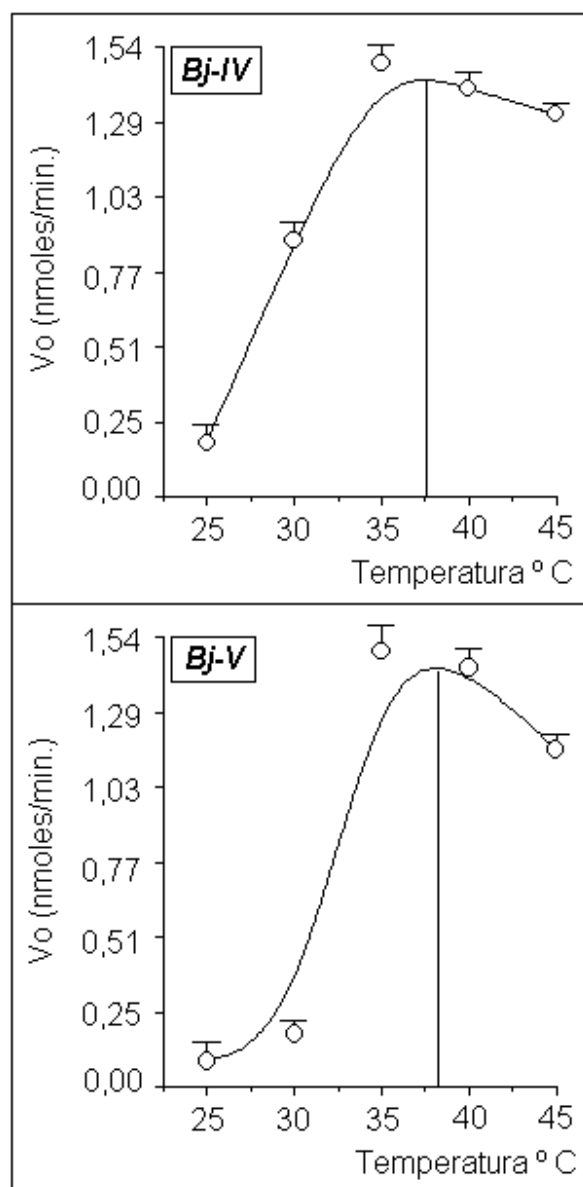


Figura 12 Efeito da temperatura na atividade PLA₂ das isoformas de BthTX-II, Bj-IV e Bj-V.

4.5.4 Efeito de íons divalentes na atividade PLA₂ das isoformas de BthTX-II, Bj-IV e Bj-V

A atividade das isoformas de BthTX-II, Bj-IV e Bj-V, (PLA₂) foi verificada na presença de alguns íons, tais como Mn²⁺, Mg²⁺, Zn²⁺, Cu²⁺ na concentração de 10 mM e também na presença de Ca²⁺ na concentração de 1 mM, não mostrando diferença em termos de atividade entre ambas concentrações.

Com relação aos íons testados, apesar de todos serem classificados como divalentes, mostraram atividade PLA₂ muito baixa, na ausência de cálcio.

A atividade PLA₂ da isoforma Bj-IV frente aos íons Mn²⁺ e Mg²⁺ (10 mM) e Ca²⁺ (1mM) é de $4,15 \pm 0,17$ nmoles/min. e $2,42 \pm 0,17$ nmoles/min. respectivamente e para a isoforma Bj-V a atividade é $2,1 \pm 0,17$ nmoles/min. e $1,04 \pm 0,13$ nmoles/min respectivamente.

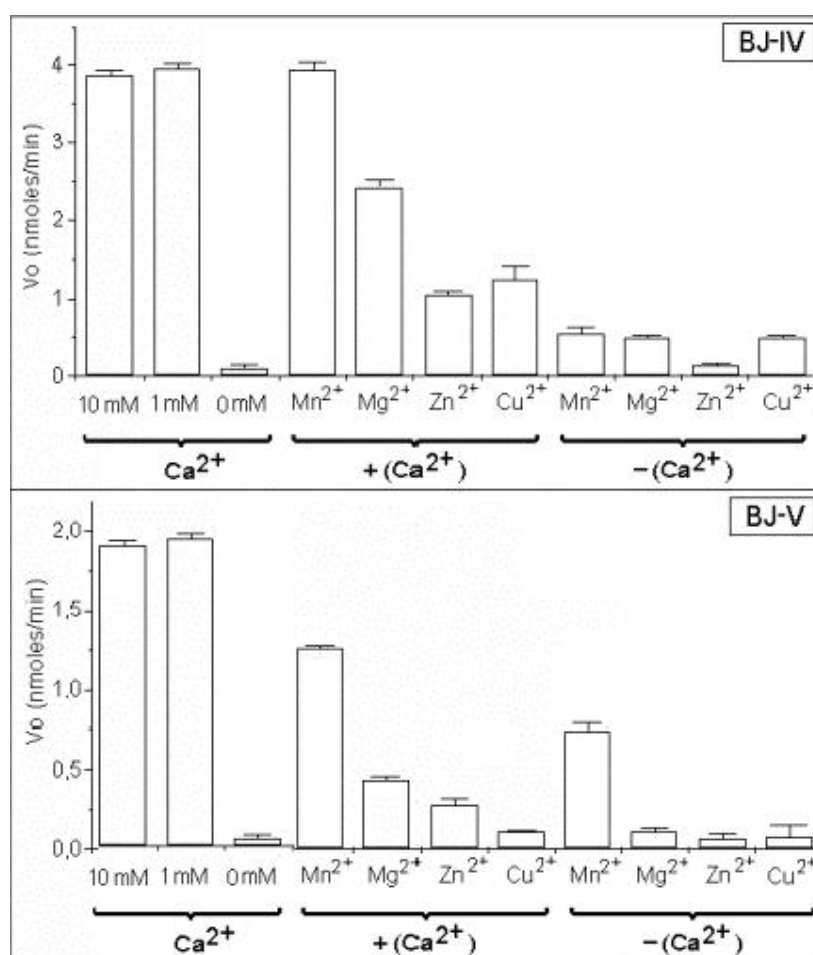


Figura 13 Efeito de diferentes íons divalentes sobre a atividade PLA₂ das isoformas de BthTX-II, Bj-IV e Bj-V, na presença e ausência de cálcio.

4.5.5 Medida da atividade inibitória da crotopotina sobre a atividade fosfolipásica das isoformas de BthTX-II, Bj-IV e Bj-V.

A inibição da atividade PLA₂ das isoformas de BthTX-II, Bj-IV e Bj-V, pelas diferentes crotopotinas crotálicas, foi determinada incubando as duas proteínas na razão molar de 1:1 por 20 minutos a 37⁰C.

A porcentagem da inibição sobre as isoformas de BthTX-II PLA₂ Bj-IV e Bj-V apresentou-se em torno do 50% (Vo=2,58 nmoles/min.) por ação das crotopotinas conforme demonstrado na Figura 14a e b respectivamente.

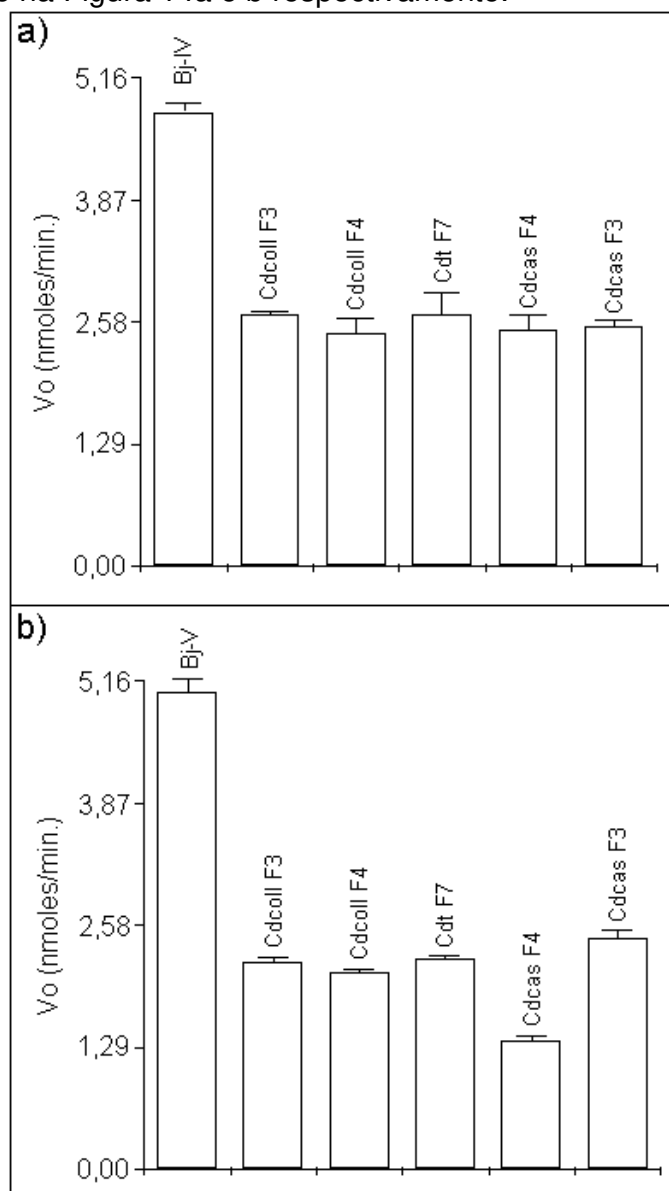


Figura 14 Inibição das isoformas de BthTX-II, Bj-IV e Bj-V, pelas crotopotinas de Cdcoll (Cdcoll F3 e F4), Cdt F7, Cdcasca (Cdcasca F3 e F4).

4.6 Análise da composição de aminoácidos

Em relação à análise da composição de aminoácidos (Tabela 1), verificou-se que as isoformas de BthTX-II, Bj-IV e Bj-V, possuem um alto conteúdo de aminoácidos básicos (Lys, Arg) e hidrofóbicos como Ala, Gly e Pro.

A presença de 14 cisteínas, evidencia provavelmente a presença de 7 pontes dissulfeto. Ambas isoformas foram comparadas com o pico de onde tais provêm (BthTX-II) para a análise de similaridade.

Aminoácido	BhTX-I*	BhTX-II**	Bj-IV***	Bj-V
Asp	12	12	12	11
Glu	8	9	13	12
Ser	4	3	2	2
Gly	12	11	9	10
His	2	2	1	1
Arg	6	5	5	6
Thr	4	6	8	7
Ala	7	4	7	7
Pro	5	9	9	9
Tyr	9	11	10	9
Val	4	5	3	4
Met	1	1	2	2
Cys	14	14	14	14
Ile	5	3	3	3
Leu	8	6	6	7
Phe	4	5	4	4
Lys	14	12	11	11
Trp	2	3	2	2
TOTAL	121	121	121	121

Tabela 1 Composição de aminoácidos da BthTX-I e das isoformas de BthTX-II, Bj-IV e Bj-V, determinada por PTC aminoácido derivatização. O Trp foi estimado segundo Simpson *et al.*, 1976. Os valores são expressos em mol de aminoácidos por mol de proteína. *Cintra *et al.*, 1993; ** Homs-Brandeburgo *et al.*, 1988 *** Bonfim *et al.*, 2001.

4.7 Estudo da seqüência N-terminal e estudo de homologia

As seqüências N-terminal das isoformas foram pesquisadas no banco de dados de proteínas com seqüências já determinadas e registradas, mostrando um alto grau de homologia seqüencial, conforme o estabelecido na Figura 15.

A região encerrada da figura 15 representa a seqüência consenso entre as diferentes PLA₂ provenientes de serpentes, indicando tanto regiões altamente conservadas quanto variáveis.

Existem diferenças na posição de alguns aminoácidos entre ambas isoformas de BthTX-II Bj-V e Bj-IV, na região N-terminal, assim Trp na posição 5 por Phe, Asn na posição 16 por Iso e Ala na posição 23 por Thr. (posições indicadas por *).

	1	*5	10	15*	20	*25	30	35																																		
Bj V	D	L	F	E	W	G	Q	M	I	L	K	E	T	G	K	N	P	F	P	Y	G	A	Y	G	C	Y	C	G	W	G	G	R	G	K	P	K	D	...				
Bj IV	..	W	Q	F	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	I	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..			
BthTX II	..	W	Q	F	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	I	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	V	..		
BJU PLA ₂	..	W	Q	F	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	I	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	Q	Q	..	
PrTX III	..	W	Q	F	..	K	..	..	..	..	..	..	..	..	I	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	V	G	..
MjTX-II	..	L	K	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	
PLA ₂ -like Bj	..	L	K	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	
Myotoxin II	..	L	K	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	
PrTX I	..	L	K	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	
PrTX II	..	L	K	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	
PrTX Ii	..	L	K	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	
BthTX I	..	L	K	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	

Figura 15 Análise da homologia seqüencial comparativa das isoformas de BthTX-II Bj-IV e Bj-V com outras PLA₂. A parte encerrada determina a região de uma seqüência invariável entre as diferentes PLA₂. Assim temos: Bj-V e Bj-IV isoformas de BthTX-II de *Bothrops jararacussu* (Bonfim, *et al.*, 2000); BthTX-II de *Bothrops jararacussu* (Pereira, *et al.*, 1998); BJU PLA₂ obtida por clonagem de *Bothrops jararacussu*; Moura-da-Silva, *et al.*, (1995) PrTX III de *Bothrops pirajai* (Rigden, *et al.*, 2003); MjTX-II de *Bothrops moojeni* (Soares, *et al.*, 1998); PLA₂-like de *Bothrops jararacussu* (Andriao-Escarso, *et al.*, 2000); Myotoxin II de *Bothrops asper* (Francis, *et al.*, 1991); PrTX I de *Bothrops pirajai* (Toyama, *et al.*, 1998); PrTX I de *Bothrops pirajai* (Toyama, *et al.*, 2000); PrTX Ii de *Bothrops pirajai* (Lee, *et al.*, 2001) e BthTX I de *Bothrops jararacussu* (Cintra, *et al.*, 1993).

4.8 Estudo da atividade neurotóxica do veneno total de *Bothrops jararacussu*, isoformas de BthTX-II, Bj-IV e Bj-V, BthTX-I e Bj-VII na preparação nervo frênico-diafragma isolado de camundongo (NF-DIC), doses de 50 e 100 $\mu\text{g/ml}$.

4.8.1 Registro gráfico e miográfico do veneno total de *Bothrops jararacussu*, das isoformas de BthTX-II, Bj-IV e Bj-V (PLA_2), da BthTX-I (Bj-VII).

Neste experimento são testadas as dosagens de 50 e 100 $\mu\text{g/ml}$ para as isoformas de BthTX-II, Bj-IV e Bj-V, BthTX-I e veneno total, conforme mostra a Figura 16. As isoformas de BthTX-II PLA_2 (Bj-IV e Bj-V) e a Bj-VII, proveniente da BthTX-I, utilizadas, foram àquelas provenientes da purificação na coluna de troca iônica Protein Pack SP 5PW (Waters) acoplado a um sistema de LC (Waters).

O tempo necessário para se obter um bloqueio de 50% (dose 50 $\mu\text{g/mL}$.) no caso do veneno total é de $14,80 \pm 6,50$ min., para a isoforma Bj-IV $11,38 \pm 6,00$ min. para a isoforma Bj-V $38,69 \pm 3,15$ min. respectivamente e para Bj-VII $39,18 \pm 7,17$ min.

A Figura 17 mostra o registro da resposta contrátil do veneno total de *Bothrops jararacussu* e das diferentes PLA_2 estudadas, evidenciando um bloqueio na transmissão neuromuscular.

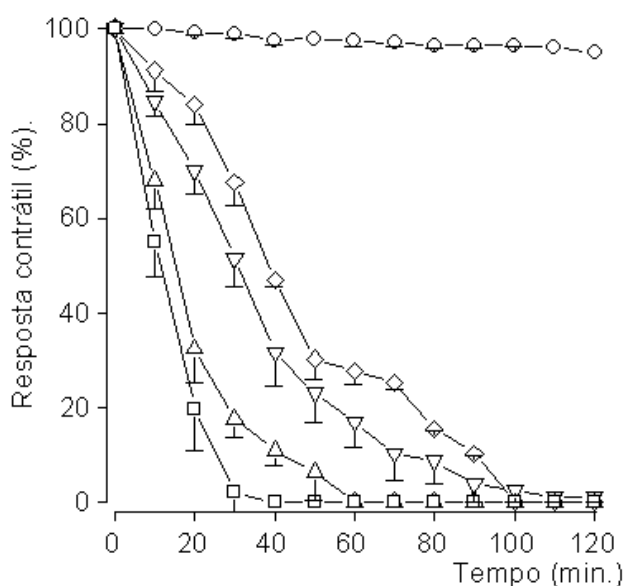


Figura 16 Bloqueio da resposta contrátil em preparação nervo frênico diafragma interno de camundongo NF-DIC (estímulo indireto). A figura mostra o bloqueio do veneno total de *Bothrops jararacussu* (△) e das frações Bj-IV (□), Bj-V (▽) e Bj-VII (◇), na dosagem de 50 $\mu\text{g/ml}$. ○ controle é representado por ○.

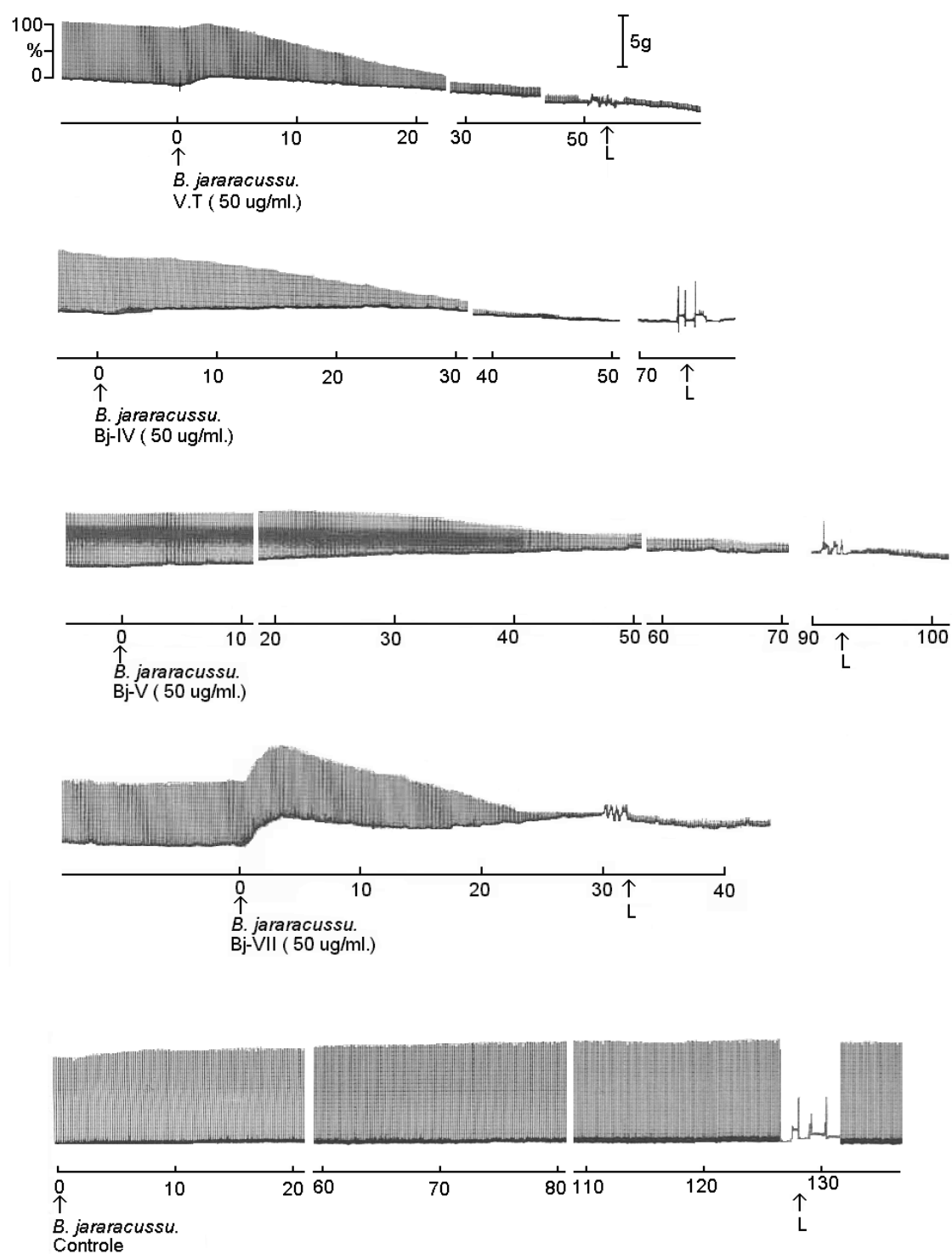


Figura 17: Registros da força de contração muscular em preparação NF-DIC (estímulo indireto). Registro miográfico do veneno total de *Bothrops jararacussu*, isoformas de BthTX-II, Bj-IV e Bj-V, Bj-VII, proveniente da BthTX-I e controle, respectivamente, na dosagem de 50 ug/ml.

O tempo necessário para um bloqueio de 50% na dose de 100 µg/mL foi de $8,46 \pm 7,33$ min. para o veneno total, $35,04 \pm 5,84$ min. para a isoforma Bj-IV, $37,74 \pm 5,11$ min para a isoforma Bj-V e $7,40 \pm 2,80$ min. para a Bj-VII. (Figura 18). Para ambas dosagens o bloqueio é irreversível pós-lavagem como se observa nos registros miográficos da Figura 19. Os resultados evidenciaram que as isoformas de BthTX-II, Bj-IV e Bj-V, não são dose-dependentes.

A Bj-VII, (BthTX-I), precisou de um tempo menor quando comparada as isoformas de BthTX-II, para se obter 50% de bloqueio.

4.8.2 Tempo para a obtenção de 50% de bloqueio da resposta contrátil em NF-DIC

O tempo necessário para se obter 50% de bloqueio na preparação nervo-frênico diafragma isolado de camundongo (NF-DIC) utilizando-se o veneno total de *Bothrops jararacussu*, isoformas de BthTX-II, Bj-IV e Bj-V, e Bj-VII, nas dosagens de 50 e 100 µg/ml ilustrado na Tabela 2. onde se verificou que as isoformas de BthTX-II, Bj-IV e Bj-V, não são dose-dependente como a Bj-VII e veneno total.

Amostra	Dose (µg/mL.)	Tempo de bloqueio 50 % (min.)	n
Bj veneno total	50	$14,80 \pm 6,50$	5
Bj veneno total	100	$8,46 \pm 7,33$	5
Bj-IV	50	$11,38 \pm 6,00$	5
Bj-IV	100	$35,04 \pm 5,84$	5
Bj-V	50	$38,69 \pm 3,15$	5
Bj-V	100	$37,74 \pm 5,11$	5
Bj-VII	50	$39,18 \pm 7,17$	5
Bj-VII	100	$7,40 \pm 2,80$	5

Tabela 2 Tempo para o bloqueio de 50% da resposta contrátil do veneno total, Bj-IV, Bj-V e Bj-VII, nas dosagens de 50 e 100 µg/ml, sobre a preparação nervo frênico-diafragma isolado de camundongo (NF-DIC).

Figura 18 Bloqueio da resposta contrátil em preparação nervo frênico diafragma interno de camundongo NF-DIC (estímulo indireto). A figura mostra o bloqueio do veneno total de *Bothrops jararacussu* ($\triangle$) e das frações Bj-IV ($\square$), Bj-V (∇) e Bj-VII ($\diamond$), na dosagem de 100 $\mu\text{g/ml}$. O controle é representado por ($\circ$).

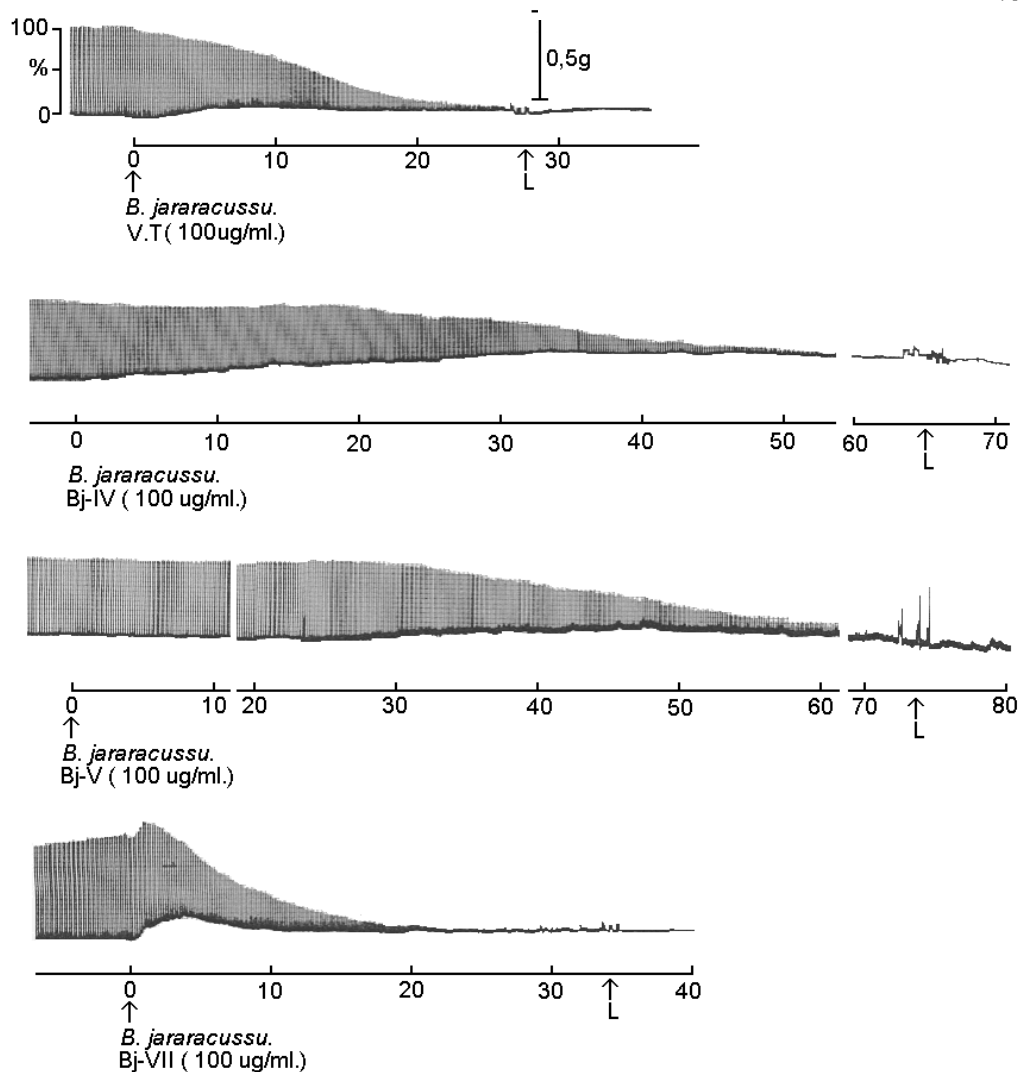
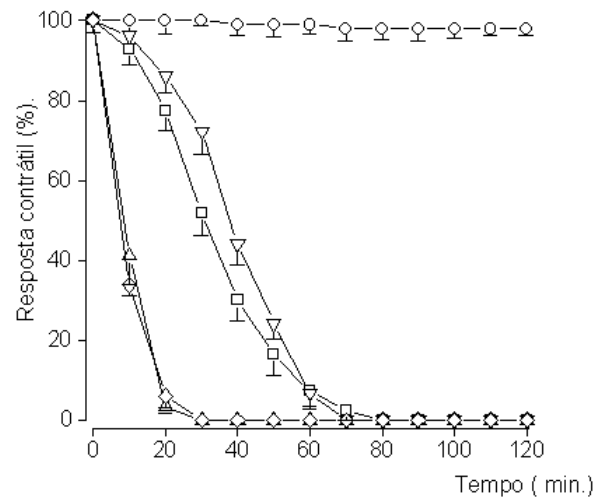


Figura 19: Registros da força de contração muscular em preparação NF-DIC (estímulo indireto). Registro miográfico do veneno total de *Bothrops jararacussu*, isoformas de BthTX-II, Bj-IV e Bj-V e Bj-VII, respectivamente, na dosagem de 100 $\mu\text{g/ml}$.

4.9 Medida da atividade neurotóxica do veneno total de *Bothrops jararacussu*, das isoformas de BthTX-II, Bj-IV e Bj-V e BthTX-I (Bj-VII) na preparação *biventer cervicis* de pintainho, doses de 50 e 100 ug/ml.

4.9.1 Registro gráfico e miográfico do efeito do veneno total de *Bothrops jararacussu*, das isoformas de BthTX-II, Bj-IV e Bj-V (PLA₂) e da BthTX-I, (Bj-VII).

Neste experimento foram testadas as dosagens de 50 e 100 ug/ml para as isoformas de BthTX-II, Bj-IV e Bj-V, BthTX-I (Bj-VII) e veneno total, conforme mostra a Figura 20.

As isoformas de BthTX-II PLA₂ (Bj-IV e Bj-V) e a Bj-VII, proveniente da BthTX-I, utilizadas, foram àquelas provenientes da purificação na coluna de troca iônica Protein Pack SP 5PW (Waters) acoplado a um sistema de LC (Waters).

Neste modelo de preparação muscular as isoformas não se mostraram como potentes bloqueadores na junção neuromuscular, mas o bloqueio foi irreversível na pós-lavagem em todos os casos tal como se mostra no registro miográfico da Figura 21.

Figura 20: Bloqueio da resposta contrátil em preparação biventer cervicis de pintainho. A figura mostra o bloqueio do veneno total de *Bothrops jararacussu* ($\triangle$) e das frações Bj-IV ($\square$), Bj-V (∇) e Bj-VII ($\diamond$), na dosagem de 50 $\mu\text{g/ml}$. O controle é representado por O. Cada ponto representa a média $\pm$ EPM de 5 experimentos.

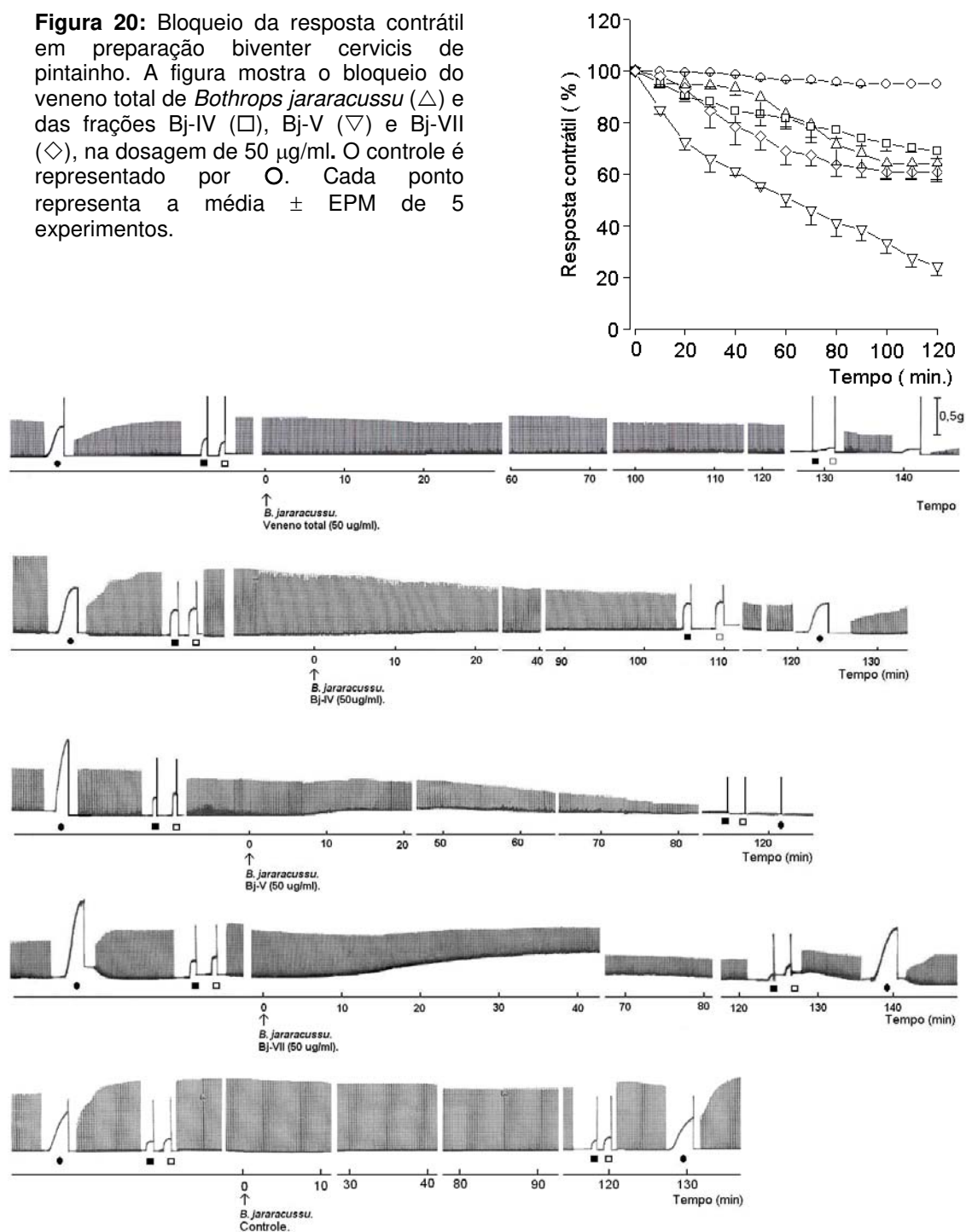


Figura 21: Resposta muscular na preparação de biventer cervicis de pintainho na presença do veneno total de *Bothrops jararacussu* e das suas frações: Bj-IV, Bj-V e Bj-VII, na dosagem de 50 $\mu\text{g/ml}$. A resposta contraturante da acetilcolina (ACh, 25 $\mu\text{g/ml}$ ■, 50 $\mu\text{g/ml}$ □ e KCl 75 $\mu\text{g/ml}$ ●) foi obtida antes e depois da adição do veneno. O traço superior vertical à direita mostra a tensão usada nas preparações.

Figura 22: Bloqueio da resposta contrátil em preparação biventer cervicis de pintainho. A figura mostra o bloqueio do veneno total de *Bothrops jararacussu* (Δ) e das frações Bj-IV ($\square$), Bj-V (∇) e Bj-VII ($\diamond$), na dosagem de 100 $\mu\text{g/ml}$. O controle é representado por $\circ$. Cada ponto representa a média $\pm$ EPM de 5 experimentos.

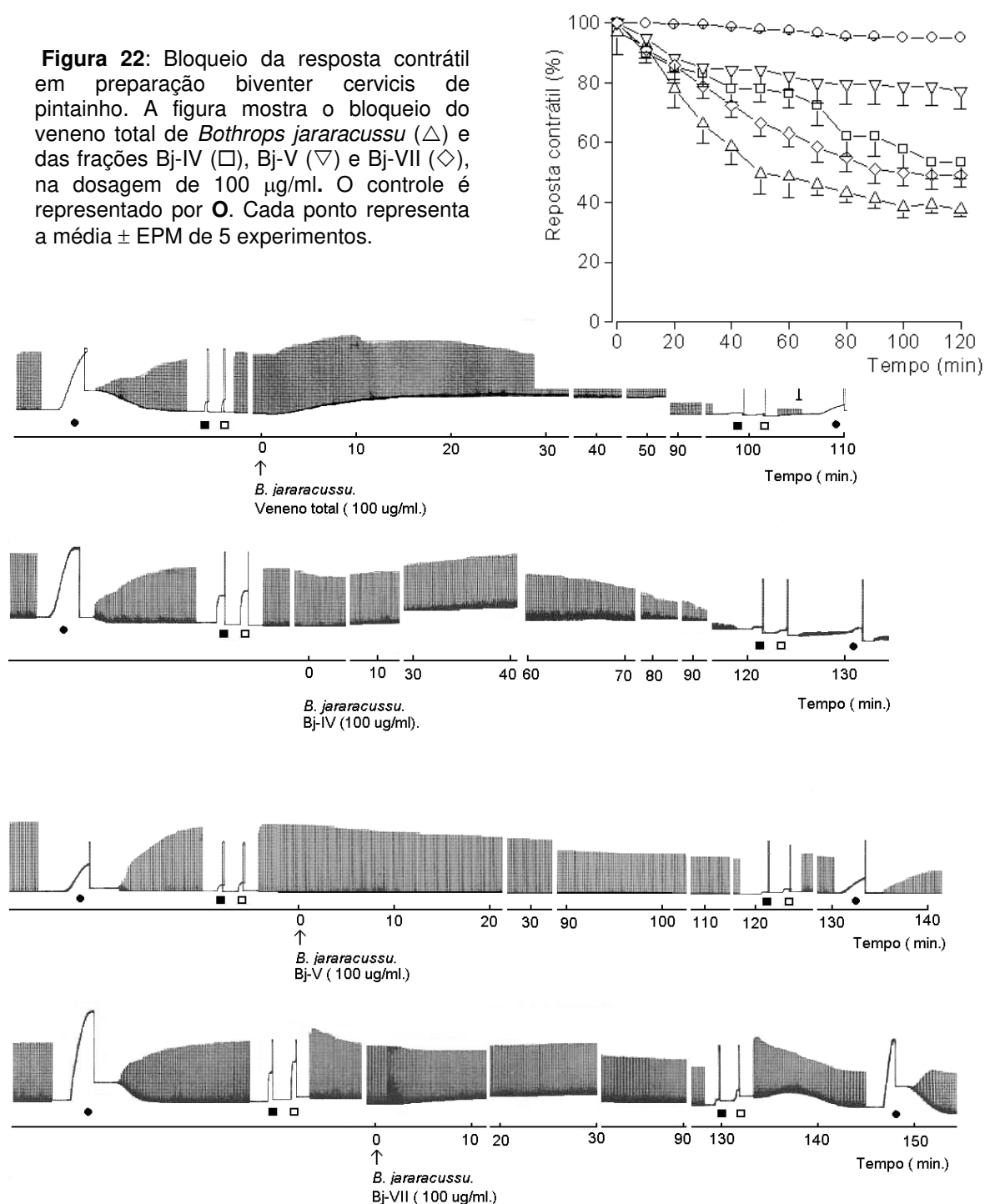


Figura 23: Resposta muscular na preparação de biventer cervicis de pintainho na presença do veneno total de *Bothrops jararacussu* e das suas frações: Bj-IV, Bj-V e Bj-VII, na dosagem de 100 $\mu\text{g/ml}$. A resposta contraturante da acetilcolina (ACh, 25 $\mu\text{g/ml}$ $\blacksquare$ e 50 $\mu\text{g/ml}$ $\square$ e KCl 75 $\mu\text{g/ml}$ $\bullet$) foi obtida antes e depois da adição do veneno. O traço superior vertical à direita mostra a tensão usada nas preparações.

4.9.2 Resposta contraturante à adição de ACh e K⁺

Após a adição das doses de 50 e 100 ug/ml do veneno total de *Bothrops jararacussu* e das suas respectivas frações, Bj-IV, Bj-V e Bj-VII, na preparação biventer cervicis de pintainho, houve pequena diminuição na resposta à adição de acetilcolina (ACh) 25 e 50 ug/ml, assim como a adição de KCl, 75 ug/ml (Tabela 3).

Este resultado mostra que as respostas contraturante a acetilcolina e ao KCl não foram significativamente diferentes entre o veneno total de *Bothrops jararacussu* e as respectivamente frações estudadas, Bj-IV, Bj-V e Bj-VII.

Amostra	Dose (µg/mL.)	KCl (13,4 mM) % Bloqueio	n
Bj veneno total	50	84,0 ± 1,03	5
Bj veneno total	100	71,2 ± 1,00	5
Bj-IV	50	20,5 ± 0,55	5
Bj-IV	100	70,9 ± 0,68	5
Bj-V	50	93,5 ± 1,00	5
Bj-V	100	52,6 ± 0,56	5
Bj-VII	50	22,7 ± 0,40	5
Bj-VII	100	40,9 ± 0,60	5

Amostra	Dose (µg/mL.)	ACh (25 µL) % Bloqueio	n
Bj veneno total	50	95,3 ± 0,15	5
Bj veneno total	100	92,4 ± 0,15	5
Bj-IV	50	00,6 ± 0,41	5
Bj-IV	100	80,4 ± 1,65	5
Bj-V	50	90,5 ± 0,58	5
Bj-V	100	91,1 ± 0,55	5
Bj-VII	50	61,2 ± 0,87	5
Bj-VII	100	81,2 ± 0,87	5

Amostra	Dose (µg/mL.)	ACh (50 µL) % Bloqueio	n
Bj veneno total	50	80,4 ± 1,01	5
Bj veneno total	100	90,3 ± 0,10	5
Bj-IV	50	00,4 ± 0,15	5
Bj-IV	100	95,5 ± 0,49	5
Bj-V	50	95,8 ± 0,64	5
Bj-V	100	50,3 ± 0,10	5
Bj-VII	50	44,7 ± 1,00	5
Bj-VII	100	82,9 ± 0,56	5

Tabela 3 Porcentagem de bloqueio da resposta contraturante à acetilcolina (ACh) e ao potássio, na forma de KCl, obtida após 120 minutos de incubação com as dosagens de 50 e 100 µg/mL de veneno total, Bj-IV, Bj-V e Bj-VII de *Bothrops jararacussu*, em músculo biventer cervicis de pintainho.

5. Discussão

Purificação das isoformas de BthTX-II, Bj-IV e Bj-V PLA₂ (D49).

Homsi-Brandeburgo *et al.* (1988), combinando cromatografia de gel filtração em Sephadex G-75 e troca iônica em SP-Sephadex C-25, iniciaram a purificação das Bothropstoxinas I e II a partir do veneno total de *Bothrops jararacussu* e baseando-se nesta metodologia obtida por Homsi-Brandeburgo um caminho foi aberto com relação ao estudo deste veneno; posteriormente Cintra, *et al* (1993) sequenciou a Bothropstoxina-I (BthTX-I) e Pereira, *et al* (1998) a Bothropstoxina-II (BthTX-II). Contudo essas metodologias não definem o grau de purificação de isoformas.

O estudo feito por Toyama, *et al* (2001) padronizando metodologias de purificação em HPLC de fase reversa para PLA₂ miotóxicas provenientes de serpentes botrópicas, já havia mostrado a otimização de metodologias em HPLC, mas não foram caracterizadas isoformas de BthTX-II.

Segundo a literatura, normalmente, quando se trata de metodologias empregadas com o intuito de obter PLA₂ provenientes de venenos ofídicos, inicia-se o processo com uma etapa de cromatografia de exclusão molecular, seguida de troca iônica e finalmente por fase reversa, no entanto, neste trabalho as metodologias utilizadas para a purificação das proteínas de interesse diferem da descrita pela literatura, pois, foi eliminada uma etapa cromatográfica, otimizando o custo/benefício.

No presente trabalho a purificação das isoformas de BthTX-II (PLA₂) Bj-IV e Bj-V a partir de veneno total de *Bothrops jararacussu*, foi realizada através de cromatografia de alta performance utilizando-se um único passo cromatográfico, sendo posteriormente repurificada em HPLC de fase reversa para confirmação do grau de pureza.

Inicialmente o veneno total de *Bothrops jararacussu* foi passado em uma coluna de troca iônica catiônica, SP 5 PW (Waters) LC e foram obtidas nove frações denominadas Bj-I – Bj-IX, sendo as frações Bj-IV, Bj-V (PLA₂) D49 e Bj-VII (PLA₂) K49 (Figura 6).

As frações Bj-IV e Bj-V foram identificadas como isoformas de BthTX-II pelo fato de compartilharem as mesmas características físicoquímicas e biológicas como, a neurotoxicidade. Posteriormente foram repurificadas em uma coluna u-Bondapack C18 (Waters) acoplado a um sistema de HPLC de fase reversa, para a confirmação do grau de pureza e este foi evidenciado, pois ambas isoformas foram eluídas em tempos de

retenção muito semelhante sendo para Bj-IV $31,25 \pm 0,31$ minuto e para Bj-V $31,31 \pm 0,28$ minuto (Figura 7), eliminando assim a etapa de cromatografia de exclusão molecular, normalmente utilizada como o primeiro passo cromatográfico.

A análise do perfil cromatográfico em troca iônica deste veneno evidencia que as frações Bj-IV e Bj-V (PLA₂) são isoformas da Bothropstoxina-II (BthTX-II), anteriormente considerada pela literatura como uma única fração e que a partir do refinamento obtido com nossas metodologias não convencionais utilizadas neste trabalho obteve-se duas frações.

Por outro lado à análise cromatográfica da repurificação em HPLC de fase reversa mostra que as frações Bj-IV e Bj-V são realmente, duas novas isoformas de BthTX-II pois o perfil cromatográfico destas amostras mostra a presença de um único pico de eluição, com uma diferença de tempos de retenção de apenas 6 décimos de segundo, como mostrados na Figura 7. As análises em HPLC de fase reversa mostraram também que as frações Bj-IV e Bj-V possuem um grau de homogeneidade molecular ao redor de 95% de pureza.

Tem sido observado que devido a modificações pós-translacionais mediadas por uma transglutaminase, há formação de dímeros, aumentando drasticamente sua atividade catalítica (Cordella-Mielle, *et al.*, 1990).

Também há estudos sobre estruturas cristalográficas que mostram estruturas monoméricas (Holand, *et al.*, 1990; Scott, *et al.*, 1992), diméricas (Brunie, *et al.*, 1985; Arni, *et al.*, 1995) e triméricas (Freemont, *et al.*, 1993) de PLA₂.

O perfil eletroforético em SDS-PAGE em gel de tricina (16,5%), das isoformas de BthTX-II Bj-IV e Bj-V isoladas, revelou que ambas tem tendência a formar agregados multiméricos, o que corrobora a afirmação de que as PLA₂ possuem tendência a formar agregados (Arni, R.K., e Ward, R.J. 1996). Em condições não redutoras as isoformas se apresentam formando dímeros o que explica sua massa em torno de 30 kDa, agora quando são reduzidas com dithiothreitol (DTT) as isoformas aparecem com massas moleculares 15 kDa, respectivamente. (Figura 8).

A atividade fosfolipásica mostrou ser maior para as frações isoladas, Bj-IV e Bj-V, quando comparadas com o veneno total e com a Bj-VII. Assim temos que para o veneno total é $5,42 \pm 0,23$ nmoles/min, para as isoformas de BthTX-II, Bj-IV $15,35 \pm 0,30$ nmoles/min e Bj-V $13,18 \pm 0,47$ nmoles/min. e para a BthTX-I, Bj-VII $0,35 \pm 0,13$

nmoles/min. (Figura 9). Este experimento reforça o fato de considerarmos as isoformas de BthTX-II (Bj-IV e Bj-V) como Asp49 e a Bj-VII (uma fração proveniente da BthTX-I) como Lys49 corroborando melhor nossa caracterização bioquímica.

Estudos cinéticos das isoformas de BthTX-II, Bj-IV e Bj-V PLA₂ (D49)

As PLA₂ (E.C.3.1.1.4) provenientes do veneno de serpentes são consideradas como PLA₂ de baixa massa molecular, extracelulares, Asp (49) e hidrolisam substratos em sua forma micelar ou lipídica, evidenciando assim um comportamento típico Michaeliano (Breithaupt, 1976; Deems e Dennis, 1995b; Holzer e Mackessy, 1996;).

Em nossos estudos cinéticos foram realizados experimentos que incluem: medida da atividade fosfolipásica, efeito da concentração de substrato na atividade PLA₂ das isoformas de BthTX-II, Bj-IV e Bj-V, efeito do pH, temperatura, efeito de íons divalentes e medida da atividade inibitória da crotapotina.

Com relação ao efeito da concentração de substrato, percebe-se que as isoformas Bj-IV e Bj-V possuem comportamento do tipo alostérico, devido ao padrão de curva sigmoidal apresentado (Figura 10). Não se pode afirmar que as isoformas de BthTX-II PLA₂ Bj-IV e Bj-V sejam necessariamente alostéricas pois, este resultado foi obtido frente ao substrato cromogênico e linear utilizado, 3-nitro 4-(octanoyloxy) benzóico ácido, ou seja, com este substrato a enzima agiu como uma enzima alostérica mas, com um substrato diferente o resultado poderia ser outro.

No entanto, as PLA₂ tem tendência a formar agregados, dímeros, trímeros (Arni, R.K e Ward, R.J. 1996) e estes agregados levam a um efeito conhecido como cooperatividade, também característico de enzimas alostéricas, o que reforçaria a possibilidade destas enzimas terem um comportamento parecido com o alostérico e, segundo resultados demonstrados na eletroforese, Figura 8, estas enzimas em estudo mostram essa tendência em agregar-se. Existem alguns trabalhos a respeito para PLA₂ D49 provenientes de serpentes crotálicas, e nestes as PLA₂ estudadas também obedecem a um comportamento do tipo sigmoidal (Beghini, *et al.*, 2000; Ponce-Soto, *et al.*, 2002) e também para uma PLA₂ básica procedente de *Bothrops jararacussu* (Bonfim *et al.*, 2001).

Outro parâmetro cinético conhecido para se caracterizar PLA₂ (Asp49) é o pH; o pH ótimo para as PLA_{2s} em estudo mostraram ser comuns entre si, cujos valores ótimos se encontram entre 7 e 8,5 (Kini, 1997; Breithaupt, 1976). Assim temos que as isoformas Bj-IV

e Bj-V podem ser consideradas básicas ao evidenciar sua atividade ótima em pH ao redor de 8. (Figura 11).

Com relação ao estudo que se verifica a atividade PLA₂ das isoformas frente a diferentes temperaturas, foi possível também constatar que tais enzimas são termoestáveis (Breithaupt, 1976; Deems e Dennis, 1995b; Holzer e Mackessy, 1996; Beghini, *et al.*, 2000; Bonfim *et al.*, 2001; Ponce-Soto, *et al.*, 2002). Tem sido registrado que a PLA₂ de *Naja naja naja* é altamente estável a temperaturas extremas tal como 100°C (Deems e Dennis, 1975a) assim como a PLA₂ de *Crotalus durissus terrificus* mostra uma alta atividade em temperatura em torno de 53-57°C (Breithaupt, 1976); apesar da atividade de ambas isoformas de BthTX-II de este trabalho ser ótima em torno de 37 °C, mesmo a 40-45 °C, estas ainda não haviam sofrido uma queda brusca na sua atividade (Figura 12).

Sabe-se que as PLA₂ procedentes do veneno de serpentes mostram ser cálcio-dependentes, uma vez que íon cálcio na concentração de 1 mM apenas, é um importante cofator para que ocorra a catálise (Kini, 1997; Tu, 1977; 1982; 1991; Breithaupt, 1976; Holzer e Mackessy 1996; Beghini, *et al.*, 2000; Bonfim, *et al.*, 2001; Ponce-Soto, *et al.*, 2002). No entanto, determinadas PLA₂ são também ativas cataliticamente por ação de outros íons divalentes como descrito por Breithaupt (1976) e Tu, *et al.*, (1970) para PLA₂ de *Crotalus durissus terrificus*, *Crotalus atrox* e *Liticauda semifasciata*.

Em nosso trabalho, as isoformas de BthTX-II, pode ser considerado cálcio-dependentes pois, na ausência deste íon a atividade catalítica é inibida. Outros íons divalentes foram testados junto com cálcio (1 mM) como Mn⁺², Mg⁺², Zn⁺² e Cu⁺² estes a 10 mM, com o intuito de se verificar a existência de alguma outra dependência para uma atividade ótima. Os demais íons testados, apesar de serem divalentes não contribuíram para a atividade catalítica e ainda foram capazes de reduzir esta atividade, nas concentrações utilizadas.

Com os resultados demonstrados na Figura 13 percebe-se que na presença de cálcio e em presença dos outros íons divalentes ensaiados as enzimas tiveram alguma atividade, embora pequena, talvez pelo fato destes íons terem um raio atômico próximo ao do cálcio. Dos íons testados na presença de cálcio (1 mM) somente o Mn⁺² (10 mM) garantiu uma atividade catalítica alta para as isoformas de BthTX-II PLA₂ Bj-IV e Bj-V.

O teste de atividade inibitória da crotapotina permitiu verificar que as isoformas de BthTX-II, Bj-IV e Bj-V, encontram-se em torno de 50% inibidas, frente as crotapotinas estudadas: *Crotalus durissus collilineatus*, *Crotalus durissus terrificus* e *Crotalus durissus cascavella*. (Figura 14).

Houve uma sensível diferença entre as isoformas estudadas, sendo que a Bj-V foi ligeiramente mais inibida que a Bj-IV. Com este resultado pode-se inferir que haja uma crotapotina-like, também nos venenos botrópicos, capaz de inibir a atividade catalítica das PLA₂ D49, com isso a baixa atividade catalítica dos venenos botrópicos pode ser parcialmente explicada como já discutido por Bonfim, *et al*, 2001.

Caracterização físico-química das isoformas de BthTX-II, Bj-IV e Bj-V PLA₂ (D49).

Tanto as PLA₂ D49 quanto K49 precisam de resíduos carregados positivamente tais como Lisina, Arginina e Histidina para desencadear seu possível efeito farmacológico. Conforme Araújo, *et al.*, (1996) as PLA₂ ácidas não causam processos de miotoxicidade e provavelmente neurotoxicidade, portanto aminoácidos carregados positivamente são extremamente importantes para a expressão da atividade farmacológica (Gutierrez e Lomonte, 1995).

Em nossos resultados, a análise de aminoácidos (Tabela 1) mostrou que não existem grandes diferenças entre a BthTX-I e BthTX-II (Bj-IV e Bj-V). A análise da composição global de aminoácidos mostra que todas elas são semelhantes, ou seja, possuem um caráter tanto básico quanto hidrofóbico, tornando este tipo de proteína altamente estável; provavelmente possuam 7 pontes dissulfeto e se encontram constituídas de 121 resíduos de aminoácidos.

A sequência da região N-terminal mostrou que ambas isoformas possuem uma alta homologia seqüencial, assim como estrutural (Araújo, *et al.*, 1996; Arni e Ward 1996; Gutiérrez, *et al.*, 1995). Estes estudos têm mostrado que existem determinadas posições extremamente conservadas. Na posição 1 e 2 predomina a sequência de aminoácidos (SL), na posição 4 (E), na posição 7 a 10 (KMIL), na posição 12 e 13 (ET), na posição 21 (Y), na posição 25-26 e 28-29 (GC e CG) e na posição 40 a 51 (TDRCCVHCCYK). Estas seqüências poderiam ter uma grande importância estrutural dentro das PLA₂ miotóxicas e neurotóxicas. Nas PLA₂ D49 existem vários resíduos conservados que também

possuem um papel crucial na expressão da atividade PLA₂. Assim temos que as seqüências de aminoácidos W/YCG-G (27, 28, 29 e 30) são essenciais para a formação da alça de ligação do cálcio e CCHDC (43, 44-47, 48-50) seria importante para a atividade PLA₂ (Arni e Ward, 1996).

De acordo com o estudo de homologia seqüencial realizado com as isoformas Bj-IV e Bj-V, existem algumas diferenças detectáveis, por exemplo, a substituição de (S) por (D) na posição 1; (W) por (F) na posição 3; (F) por (W) na posição 5; (N) por (I) na posição 16 e (T) por (A) na posição 23. Apesar de todas estas mudanças não houve diminuição da atividade catalítica nem da neurotóxica. Tais mudanças provavelmente podem estar relacionadas com alguns outros efeitos biológicos de importância ou não, mas, que não foram tratados no presente trabalho.

Por outro lado houve predominância dos aminoácidos (L) na posição 1; (MIL) na posição 8 a 10; (ET) na posição 12-13, (Y) na posição 21 e (GC e CG) na posição 25-26 e 28-29. A região responsável para a formação da alça de ligação do cálcio também é conservada (YCG-G-) na posição 27 a 31 da cadeia polipeptídica.

Assim, a partir dos estudos de caracterização físico-químico das isoformas de BthTX-II Bj-IV e Bj-V (PLA₂) revelou-se uma série de características comuns: grau de hidrofobicidade e basicidade semelhantes, massas moleculares similares, formação de dímero e alta homologia seqüencial.

Estudo da atividade biológica.

As neurotoxinas provenientes do veneno de serpentes são substâncias que afetam particularmente a união neuromuscular produzindo paralisia flácida. Essas toxinas podem atuar interferindo no processo de liberação do neurotransmissor (atuando pré-sinápticamente) ou ainda ligando-se aos receptores nicotínicos para acetilcolina (atuando pós-sinápticamente) (Rodriguez-Acosta, 2001).

Com respeito aos componentes neurotóxicos dos venenos de serpentes, os mais bem descritos estão na família Crotalidae. Sabe-se que muitas destas neurotoxinas, em condições naturais, não são capazes de penetrar a barreira hematoencefálica, mas que em condições de profundas alterações do endotélio podem alcançar o sistema nervoso central (SNC) e originar quadros patológicos até agora pouco descritos (Monterrey, 2001).

No entanto, como regra, os venenos bem como suas toxinas atuam periféricamente na função neuromuscular.

A capacidade bloqueadora neuromuscular de componentes presentes nos venenos botrópicos tem sido descrita desde o trabalho pioneiro de Rodrigues-Simioni, *et al.*, 1983. De fato estes autores descreveram os efeitos da bothropstoxina, ensaiando a principal fração ativa isolada do veneno total de *Bothrops jararacussu*, através de Sephadex G 150 e denominando, naquela fase do estudo, de pool IV. Em seguida, Homs-Brandeburgo (1988) utilizando Sephadex G 75 recuperou o mesmo pool IV, desta vez identificando como SIIISP-V, que foi denominada Bothropstoxina (BthTX) e posteriormente renomeada como BthTX-I (Cintra, *et al.*, 1993); a fração SIIISPIV resultou na BthTX-II, sendo descrita como ativa cataliticamente (Asp-49) (Pereira, *et al.*, 1998).

Desde os estudos feitos por Homs-Brandeburgo, *et al* (1988) sobre a purificação da BthTX-I e Cintra, *et al* (1993) sobre a BthTX-II, até os recentes realizados por Bonfim, *et al* (2001) sobre uma PLA₂ básica com atividade fosfolipásica, têm revelado que os estudos sobre toxinas com atividade neurotóxica presentes nos venenos de *Bothrops jararacussu* constituem uma nova abordagem no estudo dos venenos botrópicos.

Assim, estudos têm mostrado que outras espécies botrópicas também possuem efeito neurotóxico, como o reportado por Costa, *et al* (1999) que evidenciou que o veneno de *Bothrops pirajai* possui um efeito miotóxico e neurotóxico, capaz de bloquear a resposta contrátil na preparação extensor digitorum longus (EDL) de rato.

Cogo, *et al* (1993) mostraram que o veneno de *Bothrops insularis* também possui um efeito neurotóxico na preparação músculo *biventer cervicis* de pintainho em concentrações que não afetam as respostas contraturantes a ACh e ao KCl e nem mesmo interfere sobre a liberação de CK. Posteriormente, ficou demonstrado que a fração responsável pelo efeito neurotóxico continha uma fosfolipase A₂ com atividade catalítica. (Cogo, *et al.*, 1998).

Soares, *et al.*, (2000) caracterizaram uma neurotoxina miotóxica, BnSP-7, uma Lys49 fosfolipase A₂ de *Bothrops neuwiedi pauloensis*. Araújo, *et al.*, (2002) também observou que tanto o veneno como uma fração caseinolítica de *Bothrops lanceolatus* possui um efeito neurotóxico sobre a preparação músculo *biventer cervicis* de pintainho, assim como os estudos eletrofisiológico mostraram que o veneno total é capaz de aumentar ligeiramente a amplitude e frequência dos potenciais de placa em miniatura

(PPM). Estes resultados sugerem que esta neurotoxina purificada atua exclusivamente de forma pós-sináptica e se trata de uma proteína de 27,5 kDa com estrutura não fosfolipásica e uma única cadeia polipeptídica.

No presente trabalho foram caracterizadas farmacologicamente duas novas isoformas de BthTX-II, denominadas Bj-IV e Bj-V, em dois modelos biológicos diferentes com o intuito de se estabelecer uma comparação entre si.

As preparações de nervo-frênico diafragma interno de camundongo e músculo *biventer cervicis* de pintainho têm sido amplamente utilizadas, frente às preparações de músculo esquelético de rato ou mesmo sapo, que também são usadas para a investigação dos efeitos de toxinas na junção neuromuscular. (Hodgson and Wickramaratna, 2002).

A importância de se estudar diferentes modelos se baseia no fato de que diferentes espécies de serpentes exibem venenos com diferentes potências sobre as várias preparações biológicas. Assim, segundo Hodgson, *et al.*, 1997, o modelo diafragma interno de camundongo é marcadamente mais sensível do que o *biventer cervicis* de pintainho para a parodoxin, uma β -neurotoxina isolada do veneno da serpente *Oxyuranus microlepidotus*. A mesma ordem de sensibilidade tem sido registrada para a taipoxin, textilodoxin e notexin, todas β -neurotoxinas provenientes de serpentes elapídicas Australianas, em contraste, com a crotoxina e a β -bungarotoxina que são muito mais potentes em pintainhos. (Chang, *et al.*, 1985).

A caracterização neurotóxica feita a partir do veneno total de *Bothrops jararacussu* e de suas frações de interesse, Bj-IV e Bj-V, no modelo nervo frênico-diafragma isolado de camundongo mostrou que tanto o veneno total quanto as isoformas de BthTX-II são bem menos ativas que os venenos crotálicos, já que estes últimos levam a um bloqueio da transmissão neuromuscular muito mais rapidamente e usando-se baixas concentrações; no entanto, não se pode negar que o veneno botrópico e suas isoformas exibem também uma leve ação neurotóxica. Pode-se determinar assim, um grau de neurotoxicidade a partir das frações e do veneno estudado, sendo que a neurotoxicidade decresce no sentido: Bj-VII (proveniente da BthTX-I), veneno total, Bj-IV e finalmente, Bj-V (Figura 16, 17, 18 e 19). Os tempos para se obter 50% de bloqueio parecem não ser dose-dependente, mas para o caso do veneno total e Bj-VII (BthTX-I) sim (Tabela 2).

As neurotoxinas presentes nos venenos de serpentes que desencadeiam paralisia neuromuscular agem pré-juncionalmente causando interferência na liberação ou síntese

de acetilcolina (ACh) ou pós-juncionalmente bloqueando os receptores para a acetilcolina. Estes diferentes mecanismos de ação não podem ser facilmente diferenciados usando-se as preparações nervo frênico-diafragma isolado de camundongo, mas podem ser diferencialmente demonstrados usando-se a preparação *biventer cervicis* de pintainho (Harvey, 1994). Uma neurotoxina pré-sináptica ativa pode abolir a resposta contrátil evocada sem afetar as respostas aos agonistas colinérgicos ou as respostas à estimulação direta pelo KCl. Neurotoxinas ativas pós-sinápticamente bloqueiam respostas aos agonistas dos colinoreceptores tanto quanto a estimulação indireta, mas podem não afetar as respostas a elevadas concentrações de potássio ou a estimulação direta.

Em nossos experimentos no modelo *biventer cervicis* de pintainho, não houve relevante atividade neurotóxica, indicando assim que este modelo não é sensível ao veneno em questão e suas frações derivadas, tanto nas doses de 50 e 100 ug/ml. (Figura 20, 21, 22 e 23).

Na dose de 50 ug/ml somente a fração Bj-IV não mostrou diminuição nas curvas de ACh mas, para a dose de 100 ug/ml tanto o veneno total quanto às frações estudadas (Bj-IV, V e VII) revelaram curvas de ACh (25 e 50 ug/ml) diminuídas. Seriam necessários estudos mais detalhados, usando por exemplo às técnicas de eletrofisiologia, para dizermos sobre possíveis efeitos pós ou pré-sinápticos, já que os resultados obtidos a partir da preparação *biventer cervicis* de pintainho não foram tão esclarecedores. No entanto, com relação à adição de KCl (75 ug/ml) houve uma marcante diminuição da resposta contraturante, confirmando assim o caráter miotóxico do veneno botrópico.

Este resultado mostra que a resposta contraturante a acetilcolina não foi significativamente diferente entre o veneno total de *Bothrops jararacussu* e as respectivamente frações estudadas, Bj-IV, Bj-V e Bj-VII, no entanto o resultado obtido a partir da resposta para o KCl revelou indiretamente um efeito miotóxico, como já é conhecido na literatura para a BthTX-II.

6. Conclusão:

Neste trabalho isolamos duas isoformas de BthTX-II (PLA₂) D49 denominadas Bj-IV e Bj-V, ambas foram purificadas em um só passo cromatográfico, usando uma coluna de troca iônica SP 5 PW Protein Pack (Waters). A partir dos resultados anteriormente descritos, como: purificação em HPLC de fase reversa, eletroforese, composição e sequência de aminoácidos, pode-se afirmar que se trata de novas isoformas de BthTX-II (Bj-IV e Bj-V) pois, possuem quase o mesmo grau de hidrofobicidade, baseados nos tempos de retenção muito próximos, massas moleculares praticamente iguais, tendência a formar dímeros quando em solução, atividade fosfolipásica parecida e alta homologia na composição de aminoácidos. O sequenciamento da região N-terminal também revela informações sobre o grau de semelhança entre tais isoformas de BthTX-II (Bj-IV e Bj-V).

Os estudos cinéticos mostram que ambas isoformas de BthTX-II, Bj-IV e Bj-V, são PLA₂ básicas D49 estáveis e mostram uma série de características comuns tais como alto grau de hidrofobicidade e basicidade semelhante, massas moleculares similares, formam dímeros e possuem uma alta homologia sequencial.

Os resultados farmacológicos mostraram que ambas isoformas podem ser consideradas como neurotoxinas que agem na junção neuromuscular ao produzirem um bloqueio da resposta contrátil nas dosagens estabelecidas e ao evidenciarem um comportamento diferenciado em ambas as preparações. Estas isoformas em nervo frênico-diafragma isolado de camundongo mostram-se muito mais ativa que em biventer cervicis de pintainho. Assim pode-se considerar que tais isoformas de BthTX-II sejam não só miotoxinas, mas também neurotoxinas, apesar de menos potente quando comparadas com as PLA₂ crotálicas. A literatura relata que as PLA₂ provenientes da serpente *Bothrops jararacussu* são miotóxicas, mas, pouco se dizia com relação a neurotoxicidade demonstrada no presente trabalho.

Estudos de cristalização ou eletrofisiologia poderão revelar muitas informações que ajudarão a entender essa intrincada relação que existe entre estrutura e função de proteínas, o que reforçaria melhor tanto a caracterização bioquímica quanto a biológica.

7 Bibliografia.

- Arni, R.K. and Ward, R.J. (1996) Phospholipase A₂ - A structural review. *Toxicon* 34(8): 827 - 841.
- Beghini DG, Toyama MH, Hyslop S, Sodek LC, Novello, Marangoni S. (2000). Enzymatic characterization of a novel phospholipase A₂ from *Crotalus durissus cascavella* rattlesnake (Maracambaia) venom. *J Protein Chem.*19(8):679-84.
- Bomalaski JS, Clark MA. (1993) Phospholipase A₂ and arthritis. *Arthritis Rheum.* Feb;36(2):190-8. Review.
- Bonfim VL, Toyama MH, Novello JC, Hyslop S, Oliveira CR, Rodrigues-Simioni L, Marangoni S. (2001). Isolation and enzymatic characterization of a basic phospholipase A₂ from *Bothrops jararacussu* snake venom. *J Protein Chem.* 20(3):239-45.
- Brazil, V.- La Défense Contre L'Ophidisme. São Paulo: Pocal- Weiss & C.; 1911, p. 152.
- Breithaupt, H. (1976). Neurotoxic and myotoxic effects of crotalus phospholipase A and its complex with crotafotin. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* Mar 292, 271-8.
- Brunie, S., Bolin, J. Gewirth, D. and Sigler, P. B. (1985). The refined crystal structure of dimeric phospholipase A₂ at 2.5 Å. Access to a shielded catalytic center. *J. Biol. Chem.* 260, 9742 – 9749.
- Bülbring, E. (1946). Observation on the isolated phrenic nerve diaphragm preparation of the rat. *Br.J. Pharmacol* 1:38-61.
- Campbell CH. (1966) Professor Halford's germ theory of snake poisoning. *Med J Aust.* 26;1(13):552-5.
- Chang, C. C. and Dong Lee, J. (1977) The presynaptic neuromuscular blocking action of taipoxin: A comparison with B-bungarotoxin and crotoxin, *Toxicon*, 15: 571.
- Chang, C.C. (1985) Neurotoxins with phospholipase A₂ activity in snake venoms. *Proc.Natn.sci.Council, R.O.C.* B9:126-142.
- Chang, C.C.; Chen, T.F.; Lee, C.Y. (1973) Studies of the presynaptic effect of - bungarotoxin on neuromuscular transmission. *J Pharmacol Exp Ther* 184(2):339-345.
- Cho, W and Kézdy, F. J. (1991). In: *Methods Enzymol.* 197, 75 – 79.
- Cintra, A.C.O., Marangoni, S., Oliveira, B. and Giglio, J.R.(1993). Bothropstoxin - I: Amino Acid Sequence and Function. *J. Protein Chem.*12 (1); 57 - 64.
- Cirino, G.; Peers, S.M., John, L.W.& Flower, R.J. (1989). A study of phospholipase A₂-induced oedema in rat paw. *Euro. J. Pharmacol*, 166: 505-510
- Cogo JC, Prado-Franceschi J, Cruz-Hofling MA, Corrado AP, Rodrigues-Simioni L. (1993). Effect of *Bothrops insularis* venom on the mouse and chick nerve-muscle preparation. *Toxicon.* Oct;31(10):1237-47.
- Cogo JC, Prado-Franceschi J, Giglio JR, Corrado AP, Cruz-Hofling MA, Donato JL, Leite GB, Rodrigues-Simioni L. (1998) An unusual presynaptic action of *Bothrops insularis* snake venom mediated by phospholipase A₂ fraction. *Toxicon.* Oct; 36(10):1323-32.
- Cordella-Miele E, Miele L, Beninati S, Mukherjee AB. (1993). Transglutaminase-catalyzed incorporation of polyamines into phospholipase A₂. *J Biochem (Tokyo).* Feb;113(2):164-73.
- Damerau, B.; Lege, L.; Oldigs, H.D. & Vogt, W. (1975). Histamine release, formation of prostaglandin-like activity (SRS-C) and mast cell degranulation by the direct lytic factor (DLF) and phospholipase A of cobra venom. *Naunyn Schimie.Arch Pharmacol.*; 287(2): 141- 156.

- Deems RA, Dennis EA. (1975). Characterization and physical properties of the major form of phospholipase A₂ from cobra venom (*Naja naja naja*) that has a molecular weight of 11,000. J Biol Chem. 10;250(23):9008-12.
- Dennis E.A, Ackermann EJ, Deems RA, Reynolds LJ. (1995). Multiple forms of phospholipase A₂ in macrophages capable of arachidonic acid release for eicosanoid biosynthesis. Adv Prostaglandin Thromboxane Leukot Res. 23, 75-80. Review.
- Dennis, E.A. (1994). Diversity of groups types, regulation and function of phospholipase A₂. J. biol. Chem. 269, 13057 – 13060.
- Díaz-Oreiro, C. and Gutiérrez, J.M.(1997) Chemical modification of histidine and lysine residues of myotoxic phospholipase A₂ isolated from *B. asper* and *B. Godmani* snake venoms: effect on enzymatic and pharmacological properties. Toxicon 35: 241 - 252.
- Fletcher, J. E.; Hubert, M. ; Wieland, S. J. ; Gong, Q. H. and Jiang, M. S. (1996). Similarities and difference in mechanisms of cardiotoxins, melittin and other myotoxins. Toxicon 34(11 - 12): 1301 - 1311.
- Francis, B. ; Gutiérrez, J. M.; Lomonte, B. and Kaiser, I. I. (1991) Myotoxin II from *Bothrops asper* (Terciopelo) venom is a lysine 49 phospholipase A₂. Arch. Biochem. Biophys. 284: 352 - 359.
- Ginsborg, B.L and Warriner, J. (1960). The isolated chick biventer cervicis nerve-muscle preparation. Bri Pharm Chemother.15, 410-1.
- Grotendorst, G. R., Hessinger, D. A., (2000). Enzymatic characterization of the major phospholipase A₂ component of sea anemone (*Aiptasia pallida*) nematocyst venom. Toxicon 38: 931-943.
- Gutiérrez, J. M. & Cerdas.1984. Mecanismo de acción de miotoxinas aisladas de venenos de serpientes. Rev.Biol.Trop.32:213-222.
- Gutiérrez, J. M. and Lomonte, B. (1995) Phospholipase A₂ myotoxins from *Bothrops* snake venoms. Toxicon 33(11): 1405 - 1424.
- Gutiérrez,J.M., F. Chaves, E.Rojas & R.Bolaños. 1980. Efectos locales inducidos por el veneno de la serpiente coral *Micrurus nigrocinctus* en ratón blanco. Toxicon 18: 633-639.
- Hanada K, Kinoshita E, Itoh M, Hirata M, Kajiyama G, Sugiyama M. (1995). Human pancreatic phospholipase A₂ stimulates the growth of human pancreatic cancer cell line. FEBS Lett. Oct 2;373(1):85-7.
- Harris, J.B. (1991) Phospholipases in snake venoms and their effect on the nerve and muscle, In: Snake Toxins, Harvey, A.L. (ed), pp 91 - 129, Pergamon Press, Inc. New York.
- 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.
- Heinrikson, R. L and Meredith, S. C. (1984). Amino acid analysis by reverse-phase high-performance liquid chromatography: precolumn derivatization with phenylisothiocyanate. Anal. Biochem. 136, 60 – 65.
- Hodgson WC, Wickramaratna JC. (2002). In vitro neuromuscular activity of snake venoms. Clin Exp Pharmacol Physiol. Sep;29(9):807-14. Review.
- Hodgson WC, Rowan EG. (1997) The neuromuscular activity of paradoxin : A presynaptic neurotoxin from the venom of the inland taipan. Proc. Aust.Soc.Clin.Exp.Pharmacol. Toxicol. 4: 59 (Abstract).

- Holland, D. R., Clancy, L. L., Muchmore, S. W., Ryde, T. J., Einspahr, H. M., Finzel, B. C., Henrikson, R. L and Watenpaugh, K. D. (1990). The crystal structure of a Lysine 49 phospholipase A₂ from the venom of the cottonmouth snake at 2.0 Angstroms resolution. *J. biol. Chem.* 265, 17649 – 17656.
- Holzer, M. and Mackessy, S.P (1996). An aqueous endpoint assay of snake venom phospholipase A₂. *Toxicon* 34 (10) 1149 –1155.
- Homma, M. & A.T.Tu.1971. Morphology of local tissue damage in experimental snake envenomation. *Br.J.Exp.Pathol.* 52: 538-542.
- Homsi-Brandeburgo, M. I.; Queiroz, L. S.; Santo Neto, H.; Rodrigues-Simioni, L.; and Giglio, J. R. (1988) Fractionation of *Bothrops jararacussu* snake venom: Partial Chemical Characterization and Biological Activity of Bothropstoxin. *Toxicon* 26(7): 615 - 627.
- Iwanaga, S.; Ohshima, G. and Suzuki, I. (1976) Proteinase from the venom of *Agkistrodon halys blomhoffii*. In: Lorand, L.)Ed). *Methods in Enzimology* vol XLVB. Academic Press.
- 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.
- Jimenez-Porras, J. M. (1973) Reptile toxins. In: *Biolog Data Book*, 2nd edn, Vol. II. P.697. Federation of American Societies for Experimental Biology (FASEB), Bethesda, MD., U.S.A.
- Karlsson, E. (1979). Chemistry of protein toxin in snake venoms. In: *Handbook of Experimental Pharmacology*. 52, 159. (Lee, C.Y., Ed). Berlin: Springer-Verlag.
- Kini, R. M. and Evans, H. J. (1987) Structure Function relationships of phospholipases. The anticoagulant region of phospholipase A₂. *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 A₂. *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. Phospholipase A₂: a complex multifunctional protein puzzle (1997) in: R. M. Kini (Ed), *Venom Phospholipase A₂ enzymes: Structure, Function and Mechanism*, Wiley, Chichester pp. 1-28.
- Kowyoumdjian, J.A., J.B.Harris & M.A.Johnson.1986. Muscle necrosis caused by the subunits of crotoxin. *Toxicon* 24:575-583.
- Laemmli U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227, 680 – 685.
- Laloo DG, Trevett AJ, Black J, Mapao J, Saweri A, Naraqi S, Owens D, Kamiguti AS, Hutton RA, Theakston RD, Warrell DA. (1996) Neurotoxicity, anticoagulant activity and evidence of rhabdomyolysis in patients bitten by death adders (*Acanthophis* sp.) in southern Papua New Guinea. *QJM*. 89(1):25-35.
- Landucci, E.C.D.; Castro, R.C.; Pereira, M.F.; Cintra, A. C. O., Giglio, J.R.; Marangoni, S.; Oliveira, B.; Cirino, G.; Antunes, E. & de Nucci, G. (1998). Mast cell degranulation induced by two phospholipase A₂ homologues: dissociation between enzymatic and biological activities. *Euro. J. Pharmacol.*, 343: 257-263.
- Laskowski, M. (1971) *Venom exonuclease*. In Boyer, P. D. (ed): *Enzymes*, Vol 4. New York - London: Academic Press.

- Lobo de Araujo A, Donato JL, Leite GB, Prado-Franceschi J, Fontana MD, Bon C, Rodrigues Simioni L. (2002) Neuromuscular action of *Bothrops lanceolatus* (Fer de lance) venom and a caseinolytic fraction. *Toxicon*. Sep;40(9):1283-9.
- Maraganore, J. M., Merutka, G., Cho, W., Welches, W., Kézdy, F. J. and Heinrickson, R. L. (1984). A new class of phospholipases A₂ with lysine in place of aspartate 49. Functional consequences for calcium and substrate binding. *J. Biol. Chem.* 259, 13839 – 13843.
- Mayatepek E, Hoffmann GF. (1995) Leukotrienes: biosynthesis, metabolism, and pathophysiologic significance. *Pediatr Res*. Jan;37(1):1-9.
- McClean, R. L.; Massaro, E. J. and Elliot, W. B. (1971) A comparative study of the homology of certain enzymes in elapid venoms. *Comp. Biochem. Physiol.* 39B: 1023 - 1037.
- McIntosh, J.M.; Ghomashchi, F.; Gelb, M.H.; Dooley, D.J.; Stoehr, S.J.; Giordani, A.B.; Naisbitt, S.R. (1995) Conodipine-M, a novel phospholipase A₂ isolated from the venom of the marine snail *Conus magus*. *J. Biol. Chem.* 270: 3518 - 3526.
- Mebs, D. (1970) A comparative study of enzyme activities in snake venoms. *Int. J. Biochem.* 1: 335 - 342.
- Meister, A (1965) Biochemistry of amino acid. New York - London Academic Press.
- Meyer, K.; Kiffman, P. and Linker, A. (1960) Hyaluronidases. In: Bayer, P. D.; Lardy, H.; Myrback, K. (ed). *The enzymes*. vol 4. Academic Press.
- _____. Ministério da Saúde (1988) SNABS. Acidentes ofídicos Boletim 18.
- _____. Ministério da Saúde Fundação Nacional de Saúde FUNASA (2001) Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos. 2 ªEd. Brasília 120:1
- Monterrey, F. 2001. Trabajo de Grado. Facultad de Ciencias, UCV, Caracas, Venezuela.
- Moreno, J. J.; Ferrer, X.; Ortega, E. & Carganico, G (1992). PLA₂-induced o edema in rat skin and histamine release in rat mast ce4lls. Evidence for involvement of lysophospholipids in the mechanism of action. *Agents Actions*, 36: 258-263.
- Moura da Silva, A. M., Paine, M. J. I., Diniz, M. R. V., Theakston, R. D. G and Crampton, J. M. (1995). The molecular cloning of a phospholipase A₂ from *Bothrops jararacussu* snake venom: evolution of venom group II phospholipase A_{2s} may imply gene duplications. *J. molec. Evol.* 41, 174 – 179.
- Mukherjee, A.B., Miele, L and Pattabiraman, N. (1994). Phospholipase A₂ enzymes: regulation and physiological role. *Biochem. Pharmac.* 48: 1-10.
- N. F Heluany, M. I Homsí-Brandeburgo, J.R Giglio, J. Prado-Franceschi and L. Rodrigues-Simioni. (1992). Effects induced by bothropstoxin, a component from *Bothrops jararacussu* snake venom, on mouse and chick muscle preparations. *Toxicon*. 30, 1203 – 1210.
- Nakai, M.; Nakashima, K. I.; Ogawa, T.; Shimohigashi, Y.; Hattori, S.; Chang, C. C. and Ohno, M. (1995) Purification and primary structure of a myotoxic lysine 49 phospholipase A₂ with low lipolytic activity from *Trimeresurus gramineus* venom. *Toxicon* 33 (11): 1469 - 1478.
- Ownby, C.L. 1982. Pathology of rattlesnake envenomation, p.163-209. In A.T. Tu (ed). *Rattlesnake Venoms. Their Actions and Treatment*. Marcel Dekker, New York.
- Ownby, C.L., T.Colberg & G.V.Odell. 1984. In vivo test of the ability of antiserum to myotoxin a from praire rattesnake (*Crotalus viridis viridis*) venom to neutralize local myonecrosis induced by myotoxin a and homologous crude venom. *Toxicon* 22:99-105.

- Ownby, C.L., G.V. Odell., W.H. Woods & T.R. Colberg. 1983. Ability of antiserum to myotoxin a from prairie rattlesnake (*Crotalus viridis viridis*) venom to neutralize local myotoxicity and lethal effect of myotoxin a and homologous crude venom. *Toxicon* 21:35-45.
- Pereira, M. E., Novello, J.C., Cintra, A.C.O., Giglio, J.R., Landucci, E.T., Oliveira, B and Marangoni, S. (1998). The amino acid sequence of Bothropstoxin-II, an Asp-49 myotoxin from *Bothrops jararacussu* (Jararacuçu) venom with low phospholipase A₂ activity. *Journal of Protein Chemistry*. 17, 381 – 386.
- Ponce-Soto LA, Toyama MH, Hyslop S, Novello JC, Marangoni S. (2002) Isolation and preliminary enzymatic characterization of a novel PLA₂ from *Crotalus durissus collilineatus* venom. *J Protein Chem*. 21(3):131-6.
- Pruzanski, W.; Vadas, P. & Fornasier. Inflammatory effect of intradermal administration of soluble phospholipase A₂ in rabbits. *J. Invest. Dermatol.*, 86: 380-383.
- Queiroz, L. S., Santo Neto, H., Rodrigues-Simioni, L and Prado-Franceschi, J. (1984). Histopathological changes caused by venom of urutu snake (*Bothrops alternatus*) in mouse skeletal muscle. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*. 26, 247-253.
- R. M. Kini. (1997). *Venom Phospholipases A₂ Enzymes: Structure, Function and Mechanism*, Wiley, Chichester. Pp. 1 – 28.
- Richard J. Ward, Lucimara Chioato, Arthur H. C de Oliveira, Roberto Ruller and Juliana M. Sá. (2002). Distinct sites for myotoxic and membrane-damaging activities in the C-terminal region of a Lys49-phospholipase A₂. *Biochem J*. 366(Pt 3), 971-6.
- 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.
- Rodrigues-Acosta,
<http://caibo.ucv.ve/vitaeNueve/articulos/medicinetropical/archivosPDF/medicinetropical.PDF>
- Rodrigues-Simioni L, Borgese N, Ceccarelli B. (1983). The effects of *Bothrops jararacussu* venom and its components on frog nerve-muscle preparation. *Neuroscience*. 10, 475 – 489.
- Rosenberg, P. (1979). Pharmacology of phospholipase A₂ from snake venoms. *Handb. Exp. Pharmacol.*, 52: 403.
- Rosenfeld, G. (1971). Symptomatology, pathology and treatment of snake bites in South America. In: *Venomous Animals and Their Venoms*. II, p.345 (Bücherl, W. and Buckley, E.E., Eds). New York: Academic Press.
- Rotchild, A. M. and Rotchild, Z. (1979) Liberation of pharmacologically active substances by snake venoms. In: *Snake Venoms*, (Lee, C. Y. Ed). New York: Springer Verlag. p. 541
- Sasaki, T. (1960) Chemical studies on the venom of Formosan habu (*Trimeresurus mucrosquamatus canton*). III. On the dialyzable substances. In the venom, *Yakugaku Zasshi*, 80, 844.
- Schäfer, H and von Jagow, G. (1988). Coomassie blue-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for direct visualization of polypeptides during electrophoresis. *Anal Biochem*. 173, 201-5.
- Scott, D. L., Achari, A., Vidal, J. C and Sigler, P. B. (1992). Crystallographic and biochemical studies of the inactive Lys-49 phospholipase A₂ from the venom of *Agkistrodon piscivorus piscivorus*. *J. Biol. Chem*. 267, 22645 – 22657.

- Selistre, H. S.; White, S. P. and Ownby, C. L. (1996). Sequence analysis of Lys 49 phospholipase A₂ myotoxins: a highly conserved class of 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.
- Simpson, R.J., Neuberger, M.R. and Liu, T.Y. (1976). *J. Protein. Chem.* 251, 1936-1940.
- Silvia H Andrião-Escarso, S. V. Sampaio, O. A B. Cunha, S. Marangoni, B. Oliveira and J. R. Giglio. (1997). Isolation and characterization of a new clotting factor from *Bothrops jararacussu* (*Jararacuçu*) venom. *Toxicon*. 35, 1043-1052.
- Silvia H. Andrião-Escarso, Andreimar M. Soares, Veridiana M. Rodrigues, Yamileth Ângulo, Cecília Díaz, Bruno Lomonte, José M. Gutiérrez, José R. Giglio. Myotoxic phospholipases A₂ in *Bothrops* snake venoms: Effect of chemical modification on the enzymatic and pharmacological properties of bothropstoxins from *Bothrops jararacussu*. *Biochemie* 82 (2000) 755-763.
- 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 und Krystallization des Klapperschlangengiftes. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* 71: 1076-1081.
- Soares AM, Oshima-Franco Y, Vieira CA, Leite GB, Fletcher JE, Jiang MS, Cintra AC, Giglio JR, Rodrigues-Simioni L. (2002). Mn(2+) ions reduce the enzymatic and pharmacological activities of bothropstoxin-I, a myotoxic Lys49 phospholipase A(2) homologue from *Bothrops jararacussu* snake venom. *Int J Biochem Cell Biol.* 34(6):668-77.
- Soares, A. M., Guerra-Sá R., Borja-Oliveira, C. R., Rodrigues V. M., Rodrigues-Simioni L., Rodrigues V., Fontes M.R.M., Lomonte B., Gutiérrez J. M., Giglio J. R. (2000). Structural and functional characterization of BnSP-7, a Lysine-49 myotoxic phospholipase A₂ homologue from *Bothrops neuwidi pauloensis* venom. *Arch. Biochem. Biophys.* 378, 201 – 209.
- Soares, A.M., Anzaloni-Pedrosa, L.H., Fontes, M.R.M., da Silva R. J., Giglio J. R. (1998). Polyacrylamide gel electrophoresis as a tool for the taxonomic identification of snakes from the Elapidae and Viperidae families. *J. Ven. Anim. Toxins.* 4, 137-142.
- Soons K.R., Condrea E., Yang C.C., Rosenberg P. Effects of modification of tyrosines 3 and 62 (63) on enzymatic and toxicological properties of phospholipases A₂ from *Naja naja nigricolis* and *Naja naja atra* snake venoms. *Toxicon* 24 (1986) 679-693.
- Takasaki A, Sugama A, Yanagita A, Tamiya N., Rowan E.G., Harvey A.L. Effects of chemical modification of PA –11, a phospholipase A₂ from the venom of Australian king brown snake, on its biological activities. *Toxicon* 28 (1990) 107-117.
- Toyama MH, Carneiro EM, Marangoni S, Amaral MEC, Velloso LA, Boschero AC (2001). Isolation and characterization of a convulxin-like protein from *Crotalus durissus collilineatus* venom. *J Protein Chem.* 20(7):585-91.
- Toyama, M. H., Soares, A. M., Novello, J. C., Oliveira, B., Giglio, J. R., and Marani, S. Amino Acid Sequence of piratoxin-II, a myotoxic Lys 49 phospholipase A₂ homologue from *Bothrops pirajai* venom. *Biochemica Biophysica Acta*-2000.
- 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.; Mancuso, L. C., Giglio, J. R., Novello, J. C., Oliveira B. and Marangoni, S., (1995) A quick procedure for the isolation of dimeric piratoxins I and II: Two myotoxins from *Bothrops pirajai* snake venom: N - terminal. *Biochem. Mol. Biol. Int.* 37(6): 1047 - 1055.
- Tu AT. (1982). Hemorrhage induced by snake venoms. *Taiwan Yi Xue Hui Za Zhi.* Jul;81(7):807-18.
- 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.*
- Ueda, E., Sasaki, T., and Peng, MT. (1951). A chemical study of Formosan cobra venom, *Mem. Fac. Med. Nat. Taiwan Univ.*, 1: 194.
- Vadas, P.; Pruzanski, W. & Stefanski, E. (1985). Caracterization of extracellular phospholipase A₂ in human synoal fluid. *Life Sci.*; 36: 579.
- Vadas, P.; Pruzanski, W.; Kim, J.& Fornasier, V. (1989). The proinflammatory effect of intra-articular injection of soluble human and venom phospholipase A₂. *Am. J. Pathol.*; 134(4): 807-811.
- 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.
- Vidal, J. C and Stoppani, A. O. M. (1971). Isolation and purification of two phospholipase A from *Bothrops* venoms. *Archs. Biochem. Biophys.* 145, 543.
- Wen-Hwa Lee, Maria Teresa da Silva Giotto, Sérgio Marangoni, Marcos Toyama, Igor Polikarpov and Richard C. Garratt. (2001). Structural basis for low catalytic activity in Lys-49 phospholipases A₂ – A Hypothesis: The crystal structure of Piratoxin II complexed to fatty acid. *Biochemistry.* 40, 28 – 36.
- Wittcoff, H. (1951) *The phosphatides.* Ed. Reinhold Publisng Corporation (New York), pp.99 - 115.
- Yang, C.C. (1994). Structure-function relationship of phospholipase A₂ from snake venoms. *J.Toxicol.*, 13 (2): 125-177.