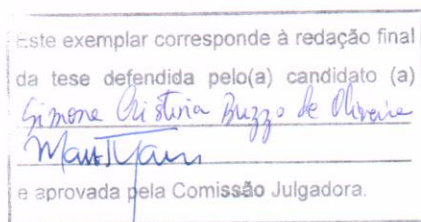


UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS - UNICAMP
INSTITUTO DE BIOLOGIA
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA



Simone Cristina Buzzo de Oliveira

**Avaliação da glicosilação não enzimática
(glicação) sobre a fosfolipases A2 secretórias
pró-inflamatórias isoladas de venenos de
serpentes.**



Tese apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Doutor em Biologia Funcional e Molecular na Área de Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. Marcos Hikari Toyama

Campinas - 2011

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP**

OL43a

Oliveira, Simone Cristina Buzzo de
Avaliação da glicosilação não enzimática (glicação)
sobre a fosfolipase A2 secretórias pró-inflamatórias isoladas
de venenos de serpentes / Simone Cristina Buzzo de
Oliveira. – Campinas, SP: [s.n.], 2011.

Orientador: Marcos Hikari Toyama.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de
Campinas, Instituto de Biologia.

1. Glicosilação. 2. Fosfolipase A2. 3. Carboidratos.
4. MALDI-TOF. 5. Edema. I. Toyama, Marcos Hikari. II.
Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia.
III. Título.

(rcdt/ib)

Título em inglês: Evaluation of non enzymatic glycosylation (glycation) on phospholipase A2 secretory pro-inflammatory isolated from snake venoms.

Palavras-chave em inglês: Glycosylation; Phospholipase A2; Carbohydrates; MALDI-TOF; Edema.

Área de concentração: Bioquímica.

Titulação: Doutor em Biologia Funcional e Molecular.

Banca examinadora: Marcos Hikari Toyama, Sérgio Marangoni, Patrícia Moriel, Marcelo José Pena Ferreira, João Henrique Ghilardi Lago.

Data da defesa: 08/02/2011.

Programa de Pós-Graduação: Biologia Funcional e Molecular.

Campinas, 08 de fevereiro de 2011.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Marcos Hikari Toyama


Assinatura

Profa. Dra. Daniele Ribeiro de Araujo

Assinatura

Profa. Dra. Patricia Moriel


Assinatura

Prof. Dr. Marcelo José Pena Ferreira


Assinatura

Prof. Dr. João Henrique Ghilardi Lago


Assinatura

Prof. Dr. Sérgio Marangoni


Assinatura

Prof. Dr. Wagner Vilegas

Assinatura

Profa. Dra. Daniela Carla da Silva Damico

Assinatura

A Deus, por me dar força e perseverança
para concluir este trabalho.

Aos meus pais, Oswaldo e Regina, que com amor
me ensinaram o valor do estudo e do trabalho.

Ao Vinícius, meu marido e companheiro de todas as horas,
que me incentivou durante todo o desenvolvimento deste projeto

.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Marcos Hikari Toyama, da UNESP - Campus São Vicente pela amizade, incentivo e orientação imprescindíveis.

Ao Prof. Dr. Sérgio Marangoni, pela acolhida em seu laboratório, pela amizade, pelo apoio e colaboração na realização deste trabalho.

A Dra. Daniela Oliveira Toyama pela amizade e orientação.

Ao Lineu e Fabiana pela amizade e colaboração nos experimentos de agregação plaquetária.

Aos colegas de equipe Eduardo, Camila, Mariana, Fábio e Veronica pela amizade, apoio na realização dos experimentos e valiosas sugestões.

Ao Paulo Baldasso pela competência e apoio técnico.

A todos os amigos do Departamento de Bioquímica, especialmente do LAQUIP, pelo carinho, amizade e pela convivência durante esse período.

Aos docentes, funcionários e pós-graduandos do Departamento de Bioquímica do Instituto de Biologia UNICAMP que direta ou indiretamente, colaboraram para a realização deste trabalho.

À FAPESP, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pelo imprescindível apoio financeiro.

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS	ix
ABREVIACÕES	xi
ABREVIACÕES PARA AMINOÁCIDOS	xiii
RESUMO	xiv
ABSTRACT	xvi
1. Introdução	1
1.1. Fosfolipase A2	1
1.1.1. Classificação das Fosfolipases	2
1.1.2. Estrutura e função das PLA2	3
1.1.3. Crotoxina	8
1.1.4. Fosfolipase A2 Lys 49	9
1.1.5. PLA ₂ e efeitos biológicos	11
1.2. Glicação de proteínas	13
1.2.1. Glicação e PLA2	17
2. Objetivos	20
2.1. Geral	20
2.2. Específicos	20
3. Material e Métodos	21
3.1 Animais	21
3.2 Veneno e Reagentes	21
3.3 Purificação da PLA2	21
3.3.1. Purificação da PLA2 de <i>Crotalus durissus collilineatus</i>	21
3.3.2. Purificação das PLA2 de <i>Bothrops jararacussu</i>	22

3.4. Glicação da PLA ₂	23
3.5. Espectrometria de massa MALDI-TOF	23
3.6. Dicroísmo Circular	23
3.7. Fluorescência Intrínseca	24
3.8. Atividade enzimática da PLA ₂ .	24
3.9. Eletroforese em SDS-PAGE	25
3.10. Atividade de agregação plaquetária.	25
3.10.1. Preparo da solução de plaquetas	25
3.10.2. Medida da Agregação plaquetária	26
3.11. Experimento de Edema em pata de camundongo	27
3.12. Atividade Miotóxica	27
3.13. Viabilidade Celular	27
3.14. Predição da estrutura tridimensional da PLA ₂ .	28
3.15. Análise estatística	29
4. Resultados	30
4.1. Experimentos com a PLA ₂ de <i>Crotalus durissus collilineatus</i>	30
4.2. Experimentos com as PLA ₂ de <i>Bothrops jararacussu</i>	47
5. Discussão	61
6. Conclusão	70
7. Referências Bibliográficas	71
8. Apêndices	92
8.1 Publicações	92
8.2 Congressos	94
8.3 Comitê de Ética	100

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1) Principais classes de fosfolipases e seus respectivos sítios de atuação sobre o triacilglicerol	2
Figura 1.2) Atividade da PLA2 citosólica e os produtos da degradação dos fosfolipídios de membrana..	4
Figura 1.3) a) Estrutura terciária da PLA2 de <i>Bothrops pirajai</i> , destacando-se a localização das estruturas secundárias desta molécula.....	6
Figura 1.4) Representação esquemática do mecanismo catalítico proposto para a PLA2. (Verheij et al, 1980).....	8
Figura 1.5) Estrutura química dos glicerofosfolipídios de membranas celulares. Na posição sn-1 é geralmente encontrado um resíduo de ácido graxo saturado, como ácido palmítico ou esteáricos, e na posição sn-2 um resíduo de ácido graxo insaturado, como ácido oléico, linolênico ou araquidônico. O grupo fosfato é ligado a um átomo de hidrogênio – H (ácido fosfatídico) ou a uma base, como a colina ou etanolamina.....	12
Figura 4.1) Purificação da PLA2 do veneno de <i>Crotalus durissus collilineatus</i>	31
Figura 4.2) Espectrometria de massa da PLA2 de Cdcogli, nativa ou glicada.....	33
Figura 4.3) Atividade Enzimática da PLA2 de Cdcogli, nativa ou glicada.....	36
Figura 4.4) Eletroforese da PLA2 de Cdcogli glicada ou não.....	37
Figura 4.5) Agregação Plaquetária induzida pela PLA2 de Cdcogli, nativa ou glicada	39
Figura 4.6) Edema em pata de camundongo induzido pela PLA2 de Cdcogli nativa ou glicada.....	41
Figura 4.7) Atividade miotóxica da PLA2 de Cdcogli, nativa ou glicada	42
Figura 4.8) Citotoxicidade da PLA2 de Cdcogli, nativa ou glicada.....	44
Figura 4.9) Dicroísmo Circular da PLA2 de Cdcogli, nativa ou glicada.....	45

Figura 4.10) Estrutura da PLA2 de Cdcoll.	46
Figura 4.11) Purificação do veneno da serpente <i>Bothrops jararacussu</i>	47
Figura 4.12) Espectrometria de massa da PLA2 de BthTX-I, nativa ou glicada.	49
Figura 4.13) Espectrometria de massa da PLA2 de BthTX-II, nativa e glicada.	50
Figura 4.14) Atividade Enzimática da BthTX-II, nativa ou glicada	52
Figura 4.15) Edema induzido pela BthTX-I, nativa ou glicada.	54
Figura 4.16) Edema induzido pela BthTX-II, nativa ou glicada.	56
Figura 4.17) Atividade miotóxica da PLA2 de BthTX-I, nativa e glicada.	57
Figura 4.18) Atividade miotóxica da PLA2 de BthTX-II, nativa e glicada.	58
Figura 4.19) Fluorescência Intrínseca da PLA2 BthTX-I	59
Figura 4.20) Fluorescência Intrínseca da PLA2 BthTX-II	60
Figura 5.1)	67

ABREVIACÕES

ACD-C – ácido citrato dextrose (acid citrate dextrose)

ADP – adenosina difosfato

AGEs – Produtos finais da glicação avançada (Advanced glycation end products)

Bj – *Bothrops jararacussu*

BthTX-I – Bothrops toxin I

BthTX-II – Bothrops toxin II

C-terminal – carboxi-terminal

Cdcolli – PLA2 de *Crotalus durissus collilineatus*

CK – Creatina Quinase (Creatine kinase)

CRD – Domínio de Reconhecimento de Carboidratos (carbohydrate recognition domain)

DTT- ditionitrito

DEAE – Cromatografia de troca iônica (Diethylaminoethyl)

EDTA – ácido etilenodiamino tetra ácido (Ethylenediamine tetraacetic acid)

HPLC – Cromatografia líquida de alta eficiência (High Performance/Pressure Liquid Chromatography)

IUPAC – União Internacional de Química Pura e Aplicada (International Union of Pure and Applied Chemistry)

kDa – kilodalton

MALDI-TOF – Dissorção a Laser Assistida por Matriz – Tempo de Ionização (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization / Time of Flight)

N-terminal – amino-terminal

PAGE – eletroforese em gel de poliacrilamida (polyacrylamide gel electrophoresis)

PKC – Proteína Quinase C (Protein kinase C)

PL – plaqueta lavada

PLA2 – fosfolipase A2

pI – ponto isoeletrico

PPP – plasma pobre em plaquetas

PRP – plasma rico em plaquetas

PTC – fenil tio carbamida (phenyl-thio-carbamide)

ROS – espécies reativas de oxigênio (reactive oxygen species)

SDS – dodecil sulfato de sódio (sodium dodecyl sulfate)

TFA – ácido trifluoroacético (trifluoroacetic acid)

TRIS – hidroximetil aminometano (tris(hydroxymethyl)aminomethane)

v/v – volume por volume

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito de glicações sobre a PLA₂ secretórias isoladas do veneno das serpentes *Crotalus durissus collilineatus* e *Bothrops jararacussu*. A técnica de MALDI-TOF foi usado para comprovar a glicação dos carboidratos nas PLA₂: a PLA₂ de Cdcolli apresentou glicação a 6 moléculas de D-Glicose e de 5 moléculas de D-Lactose, mas aparentemente não houve glicação com nenhuma molécula de D-Galactose; a BthTX-I apresentou glicação com 5 moléculas de D-Glicose, 1 molécula de D-Galactose e 4 moléculas de D-Lactose; a BthTX-II apresentou ligação a 6 moléculas de D-Glicose, a 1 molécula de D-Galactose e a 4 moléculas de D-Lactose; além disso, a dimerização das PLA₂ não ocorreu.

A glicação da PLA₂ de Cdcolli com D-Glicose e D-Lactose aumentou sua atividade enzimática e mudou seu perfil alostérico, da mesma forma, esses carboidratos aumentaram a ação edematogênica e anularam a atividade citotóxica dessa PLA₂. No entanto, D-Lactose e D-Glicose diminuíram o efeito miotóxico e modificaram o perfil de agregação plaquetária da PLA₂ de Cdcolli nativa, embora apenas a D-Lactose tenha diminuído significativamente a agregação.

A glicação de BthTX-I a D-Glicose e D-Galactose diminuiu sua ação edematogênica, e sua glicação aos carboidratos testados diminuiu seu efeito miotóxico. A glicação de BthTX-II a D-Lactose diminuiu sua atividade enzimática, a ação edematogênica foi diminuída pela glicação a todos os carboidratos, enquanto a glicação a D-Glicose e D-Galactose diminuíram seu efeito miotóxico.

A fluorescência intrínseca apresenta mudanças na estrutura terciária de BthTX-I e BthTX-II após a glicação e o dicroísmo circular sugere modificação na estrutura

secundária da PLA2 de Cdc10. Além disso, a modelação da PLA2 de Cdc10 apresentou várias regiões da proteína livres onde pode estar ocorrendo a glicação.

Esses resultados sugerem que a glicação modifica a estrutura da PLA2, modulando de forma diferente a atividade enzimática e o efeito biológico, possivelmente a mudança estrutural ou mesmo os carboidratos ligados a estrutura da PLA2 estão modificando sua afinidade a receptores de membrana. Adicionalmente, os resultados evidenciam que os sítios responsáveis pelas atividades enzimática e biológica estão em lugares diferentes dentro da estrutura da PLA2

Palavras chaves: glicação (glicosilação não enzimática), PLA2, carboidrato, MALDI-TOF, edema.

ABSTRACT

The objective of this work was evaluate the effect of glycation in the secretory PLA₂ isolated from *Crotalus durissus collilineatus* (Cdcogli) and *Bothrops jararacussu* (BthTX-I, catalytic inative K49 and BthTX-II, catalytic active D49) rattlesnake venom. The MALDI-TOF technic was used to test the glycation in the PLA₂: Cdcogli showed glycation to 6 molecules of D-Glucose and 5 molecules of D-Lactose, but no glycation to D-Galactose; the BthTX-I showed glycation to 5 molecules of D-Glucose, 1 molecule of D-Galactose and 4 molecules of D-Lactose; the BthTX-II showed glycation to 6 molecules of D-Glucose, 1 molecule of D-Galactose and 4 molecules of D-Lactose.

The glycation of PLA₂ from Cdcogli to D-Glucose and D-Lactose increased the enzymatic activity and changed its alosteric profile, in the same way, theses carbohydrates increased the edematogenic effect and annuled the citotoxic activity. However, D-Lactose and D-Glucose decreased the miotoxic effect and changed the platelet aggregation profile of native PLA₂, although only D-Lactose had decreased the aggregation.

The glycation of BthTX-I to D-Glucose and D-Galactose decreased the edematogenic effect and its glycation to all carbohydrates decreased the miotoxic effect. The glycation of BthTX-II to D-Lactose decreased its enzymatic activity; the edematogenic effect was decreased by the glycation to all the carbohydrates, while the glycation to D-Glucose and D-Galactose decreased the miotoxic effect.

The intrinsec fluorescence shows changes in the terciary structure of BthTX-I and BthTX-II after glycation and the circular dichroism suggests modification in the secondary structure of glycated PLA₂ from Cdcogli. Besides, the structure modelation shows many free areas in the PLA₂ from Cdcogli, where the glycation can be happening.

Theses results suggest that the glycation modifies the structure of PLA2, modulating in a different way the enzymatic and the biologic activity; probably the structure changes or even the linked carbohydrates to the PLA2 structure are modifying the affinity for membrane receptors. Additionally, the results show that the enzymatic and biological sites are in different areas in the PLA2 structure.

Key Words: glycation (not enzymatic glycosilation), PLA2, carbohydrate, MALDI-TOF, edema

1. Introdução

1.1. Fosfolipase A₂

O grupo de moléculas chamadas fosfolipases A₂ (PLA₂) (EC 3.1.1.4), são proteínas relativamente pequenas que hidrolisam a ligação sn-2 dos fosfolipídios. A descoberta da PLA₂ foi feita a partir da observação do suco pancreático de animais e do veneno de serpentes que é capaz de hidrolisar a fosfatidilcolina, bem como outros tipos de fosfolipídios. A reação catalisada pela PLA₂ é dependente de cálcio e proporciona a liberação de ácidos graxos e lisofosfolipídios. Esta reação de hidrólise ocorre na interface lipídio/água, pois atuam preferencialmente em substratos agregados como micelas, bicamadas ou lipoproteínas. Isso seria uma das explicações para a ampla distribuição das PLA₂ no reino animal com participação em inúmeros fenômenos fisiopatológicos e/ou fisiológicos. Estas enzimas são amplamente distribuídas na natureza, sendo que nos mamíferos, especialmente no homem, podem ser encontrados em diversos tipos de tecidos.

Intracelularmente as PLA₂ são os principais grupos de proteínas mediadoras de processos inflamatórios, via produção de ácido araquidônico. Já extracelularmente possuem basicamente função digestiva e são encontradas em grandes quantidades no suco pancreático, em venenos de serpentes, abelhas, vespas e lagartos (Burke & Dennis, 2009).

Durante muitos anos, as fosfolipases foram moléculas de domínio quase exclusivo dos enzimologistas. Hoje se sabe que estas enzimas desempenham um papel chave em vários processos biológicos, entre os quais estão: a homeostase da membrana celular, digestão de lipídios, defesa do organismo, transdução de sinal e produção de mediadores

lipídicos, tais como os eicosanóides e lisofosfolipídios que exibem diversas e potentes ações biológicas (Valentin e Lambeau, 2000; Rigden et al, 2003).

1.1.1. Classificação das Fosfolipases

As fosfolipases são classificadas dependendo de sua estrutura, do seu mecanismo de catálise e de acordo com seu sítio de hidrólise sobre o triacilglicerol. Podendo desta forma, ser inicialmente classificadas em Fosfolipase A1, Fosfolipase A2, Fosfolipase B, Fosfolipase C ou Fosfolipase D (Figura 1.1).

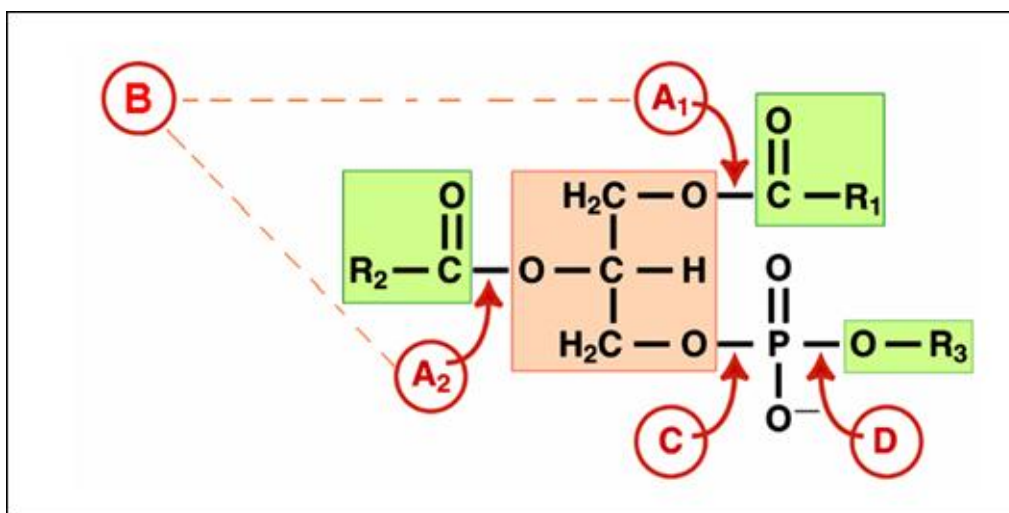


Figura 1.1) Principais classes de fosfolipases e seus respectivos sítios de atuação sobre o triacilglicerol, sendo classificadas em Fosfolipase A1, A2, B C ou D.

No caso das fosfolipases A₂ (PLA₂), estas também podem ser classificadas segundo algumas características tais como: localização celular (secretórias ou citosólicas), de acordo com a massa molecular (de alta ou baixa massa), de acordo com o número de pontes dissulfeto. Desta forma as PLA₂ conhecidas até o momento podem ser classificadas de acordo com o Quadro 1.

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

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

1.1.2. Estrutura e função das PLA2

As PLA2 secretórias são proteínas de baixa massa molecular (13 a 15 KDa), possuem sete pontes dissulfeto e são secretadas por células. Requerem concentração mM de Cálcio para sua atividade enzimática e podem ser inibidas pelo brometo de bromofenacil (pBPB). Estas enzimas foram primeiramente caracterizadas no suco pancreático de mamíferos, mas também são abundantemente encontradas no veneno de serpentes de todas as famílias.

Já foram caracterizados mais de 100 membros de PLA2 que são capazes de hidrolisar glicerofosfolipídios, gerando dois produtos extremamente importantes, o lisofosfolipídio e o ácido araquidônico, que é precursor de lipídios bioativos, tais como: prostaglandinas, leucotrienos e tromboxanos, sendo que há evidências de que estas enzimas poderiam também atuar em respostas imunológicas, inflamações, proliferação celular e vasoconstrição (Murakami & Kudo, 2002). Desta forma as PLA2 induzem a produção tecidual de vários tipos de lipídios biologicamente ativos, que irão induzir os diferentes tipos de atividades biológicas (Figura 1.2).

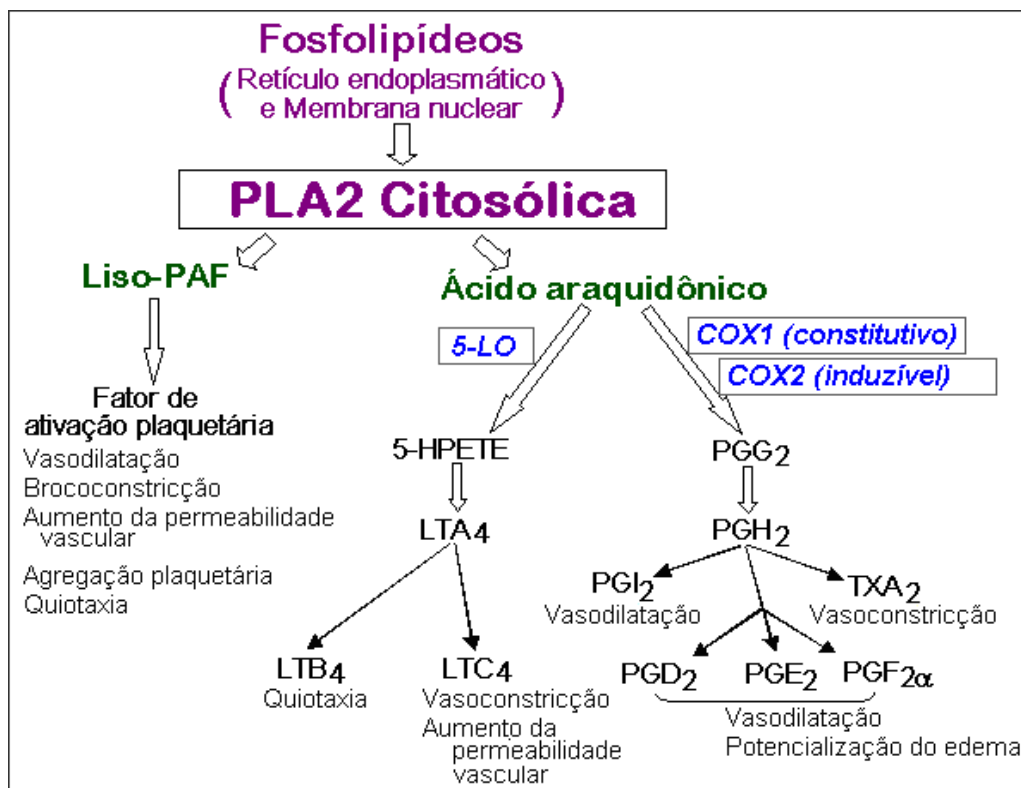


Figura 1.2) Atividade da PLA2 citosólica e os produtos da degradação dos fosfolipídios de membrana. O Lisofosfolipídio (Liso-PAF) é precursor do Fator de ativação plaquetária. O Ácido araquidônico sofre ação das Lipooxigenases (5-LO) e das Ciclooxygenases 1 e 2 (COX1 e COX2) produzindo Leucotrienos (LTA4, LTB4, LTC4), Prostaglandinas (PGG2, PGH2, PGI2, PGD2, PGE2, PGF2α) e Tromboxanos (TXA2).

As enzimas de classes I e II, apesar de possuírem origens filogenéticas distintas, possuem uma estrutura terciária com os mesmos motivos estruturais, que incluem a presença de três segmentos em alfa hélice, a presença de alças e folhas beta (Figura 1.3). Além disso, possuem um íon de cálcio coordenado em sua estrutura que é definido como região hidrofóbica onde está localizado o sítio catalítico. Este canal formado pela hélice encontra-se aberto na superfície externa da molécula e durante a atividade enzimática é ocupado pelas cadeias acilas do substrato (Arni e Ward, 1996).

Estas enzimas possuem um *loop* de ligação ao íon cálcio, denominado de “*calcium-binding loop*” que possui uma seqüência consenso de glicinas. Esses resíduos conferem a este *loop* uma grande flexibilidade estrutural, que permite três átomos de oxigênio das carbonilas proximais a coordenação molecular primária do cálcio. Além disso, o resíduo carboxila da Asp 49 participa secundariamente da coordenação do cálcio (Rigden et al, 2003). As PLA2 classe I e II também possuem uma estrutura em folhas beta antiparalelas conservadas, que formam a β -Wing. Apesar desta estrutura secundária não participar da catálise, sua estrutura tem sido relacionada a várias atividades biológicas, tais como: neurotoxicidade, miotoxicidade ou atividade anticoagulante (Harris e Franson, 1991; Soares et al, 2002).

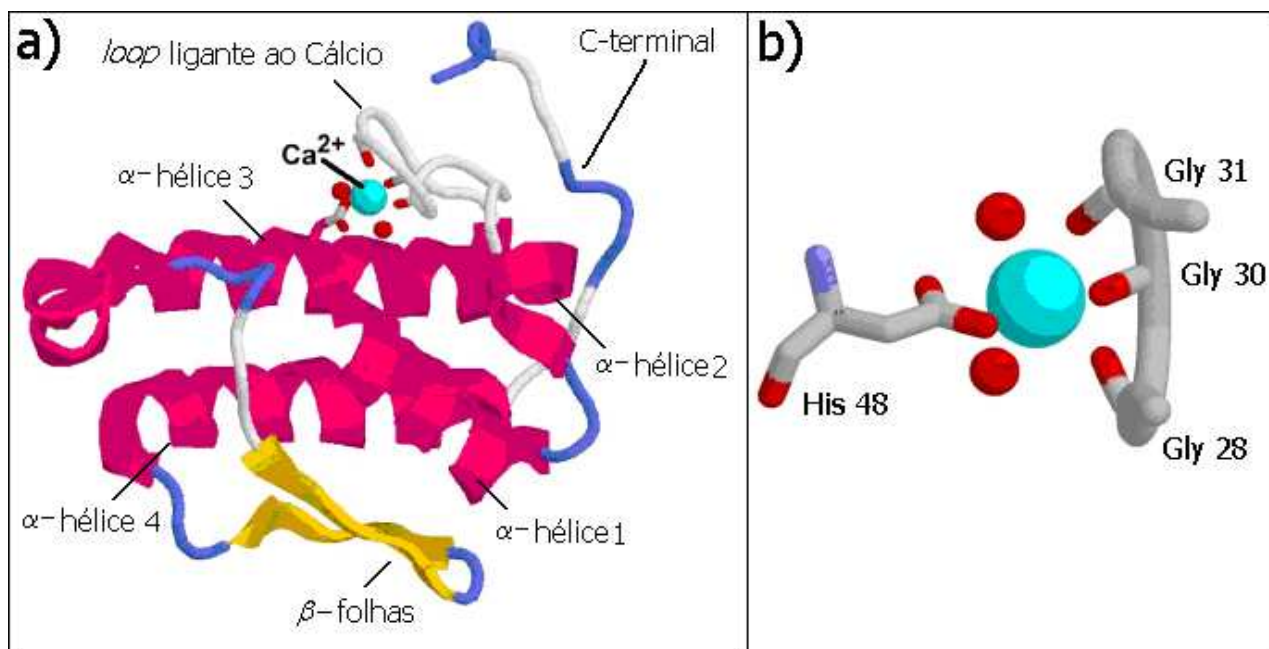


Figura 1.3) a) Estrutura terciária da PLA2 de *Bothrops pirajai*, destacando-se a localização das estruturas secundárias desta molécula. B) Detalhes da ligação do cálcio e sua coordenação com o loop de ligação do cálcio e com a His 48. (Rigden et al, 2003)

A catálise das PLA2 é análogo ao mecanismo de ação das serino proteases, envolvendo as cadeias laterais dos resíduos de Asp-99, His-48 e uma molécula de água (Scott e Sigler, 1994). Estudos cristalográficos de PLA₂ complexadas com análogos do estado de transição confirmaram alguns aspectos da catálise, sendo dividido em três estágios: 1)Ataque base mediado sobre o substrato, 2)Formação e colapso do intermediário tetraédrico e 3)Liberação dos produtos.

Quando o substrato está presente, o cálcio primariamente faz coordenações (pentágono bipiramidal) com os átomos de oxigênio de duas moléculas de água, o oxigênio do Aspartato 49, e do esqueleto formado pelos resíduos de Gly32, Gly28 e Gly30. Durante a entrada do substrato no sítio catalítico ocorre uma acomodação do substrato dentro do canal hidrofóbico da enzima (Scott e Sigler, 1994). No mecanismo de catálise

proposto por Verheij et al (1980), um próton na posição 3 do anel imidazólico do aminoácido His-48 está envolvido em uma forte interação com o grupo carboxílico da Asp-99, impedindo que ocorra uma rotação no anel imidazol (que está envolvido com a catálise), deixando o nitrogênio da posição 1 deste anel na posição espacial própria. Uma molécula de água promove então um ataque nucleofílico ao carbono do grupo éster do substrato e nesse momento o anel imidazol da His-48 recebe um próton da molécula de água facilitando a reação. Logo após ocorre a hidrólise da união acil-éster na posição sn-2 do fosfoglicerídio (substrato), este próton é doado pelo anel imidazol para o oxigênio que forma então um grupo álcool de lisofosfolípídio a ser liberado (Verheij et al, 1980). O sítio para união do cálcio, importante para a catálise, apresenta um cátion ligado pelo oxigênio do grupo carbônico dos resíduos Gly-28, Gly-30, Gly-31 e por oxigênio da cadeia lateral do resíduo Asp-49. Neste caso, o cálcio tem dupla função: fixar o fosfato e estabilizar a carga negativa do oxigênio do grupo carbônico da ligação éster na posição sn-2 do substrato (Figura 1.4).

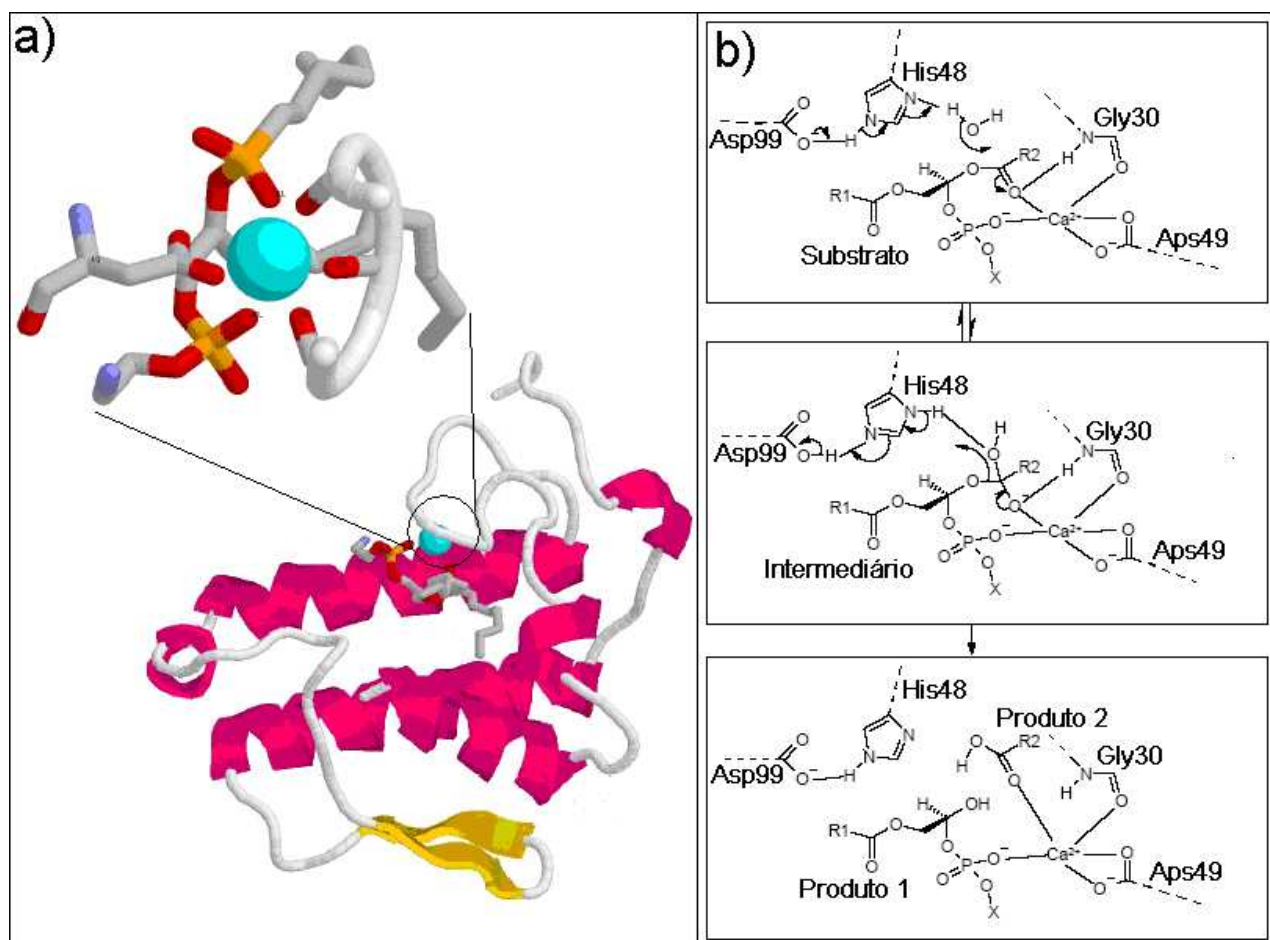


Figura 1.4) Representação esquemática do mecanismo catalítico proposto para a PLA2. (Verheij et al, 1980). a) Estrutura terciária da PLA2, destacando-se o *loop* ligante ao Cálcio. b) Estágios do mecanismo de catálise: ataque base mediado sobre o substrato, formação e colapso do intermediário tetraédrico, liberação dos produtos.

1.1.3. Crotoxina

A crotoxina é a principal neurotoxina encontrada no veneno total da cascavel *Crotalus durissus*, representando aproximadamente 50% de seu peso seco, e sendo responsável pela alta toxicidade do veneno: atua nas terminações nervosas, causando as paralisias motoras e respiratórias, em condições experimentais.

É composta por duas diferentes subunidades, formando um heterodímero: uma fosfolipase A2 (PLA2 - componente básico) com massa molecular aproximadamente de 14,5 kDa e outro componente denominado crotapotina (componente ácido) com uma massa molecular de 9,0 kDa. (Bon et al, 1979).

Segundo Breithaupt (1976) e Bon et al (1979), a crotoxina, do ponto de vista farmacológico e fisiológico, possui dois tipos de ações: a pré-sináptica e a pós-sináptica (Hawgood e Santana de Sá, 1979; Bon et al, 1979), sendo que ela pode inibir a transmissão axônica afetando o fluxo normal de íons Na^+ e K^+ ao longo da ação.

Na transmissão pré-sináptica a crotoxina causa uma modificação na liberação de neurotransmissores das terminações nervosas motoras. Esta modificação é caracterizada por uma depressão fugaz na liberação de acetilcolina seguida de um ligeiro aumento que precede o bloqueio irreversível da transmissão neuromuscular.

No nível pós-sináptico, o efeito da crotoxina caracteriza-se pelo bloqueio da resposta da acetilcolina através de uma estabilização do receptor de acetilcolina em um estado conformacional inativo (Bon et al, 1979). Com isso, impede a transmissão do estímulo nervoso para a contração muscular. Elas causam morte por falência respiratória, sendo a apoptose palpebral um dos primeiros sinais da ação do veneno. Além de ter um efeito neurotóxico, a crotoxina é também miotóxica, afetando diretamente as células do músculo esquelético (Gopalakrishnakone et al, 1981).

1.1.4. Fosfolipase A2 Lys 49

As PLA2 de serpentes possuem vários efeitos biológicos tais como: neurotoxicidade pré e pós sináptica, miotoxidade (Cupo et al, 1988), atividade coagulante (Landucci et al, 1994) e anticoagulante, convulsionante, hipotensiva, hemolítica (Rosenfeld, 1971),

hemorrágica e edematogênica (Kini e Evans, 1987). Estas atividades não necessariamente envolvem a geração de lipídios biologicamente ativos, portanto, dependem de mecanismos independentes da atividade catalítica (Gutierrez e Lomonte, 1995). Segundo Valentin et al (1999), há evidências de que os efeitos biológicos são mediados via receptores de alta afinidade por determinados tipos de PLA₂.

Durante muito tempo a atividade enzimática da PLA₂ foi uma condição *sinequanon* e *per se* necessária para a atividade biológica. Essa visão modificou-se após o isolamento e caracterização molecular das PLA₂ Lys 49 (Maraganore et al, 1984), que estruturalmente mantém os mesmos motivos estruturais das PLA₂ Asp49 (cataliticamente ativas).

Portanto, a substituição da Asp 49 (D49) por Lys 49 (K49), indisponibiliza a coordenação do íon cálcio, e assim a atividade enzimática é perdida. As PLA₂ Lys 49 são proteínas desprovidas de atividade catalítica, mas responsáveis por várias atividades biológicas, que são independentes da liberação do ácido araquidônico (Maraganore et al, 1984; Gutierrez e Lomonte, 1995; Arni e Ward, 1996; de Araújo et al, 1996).

Segundo Gutierrez e Lomonte (1995) as PLA₂ poderiam se ligar a determinados sítios, com uma carga parcial negativa que poderiam servir de ancoragem. Unidas assim à membrana celular, poderiam gerar uma desorganização da membrana levando à alteração na permeabilidade e conseqüente destruição celular devido preferencialmente à desorganização da membrana celular. Segundo Kini (1997) as PLA₂ isoladas do veneno de serpentes poderiam interagir com determinadas células mediante reconhecimento específico de determinados receptores ou “sítios ativos”. Desta forma, as PLA₂ não específicas podem interagir ao acaso com todos os tipos de células, incluindo as “células alvo”. Assim, o efeito biológico produzido pela interação da PLA₂ não específica é menos potente do que numa interação específica (Kini, 1997).

1.1.5. PLA₂ e efeitos biológicos

As PLA₂ são enzimas importantes para a atividade celular, pois hidrolisam fosfolipídios de membrana e constituem a via predominante para a produção de ácido araquidônico, precursor de mensageiros químicos que incluem as prostaglandinas, tromboxanas e leucotrienos, e algumas enzimas geram o lisofosfolipídios, precursor do fator ativador de plaquetas (PAF). Os derivados do ácido araquidônico e do lisofosfolipídio, além de serem mediadores de fenômenos fisiológicos, estão envolvidos em vários processos inflamatórios (Oka e Arita, 1991; Granger e Kubes, 1994; Murakami et al, 1997).

Estas PLA₂ citossólicas atuam sobre a bicamada de fosfolipídios (também conhecida como glicerofosfolipídios) que compõem a membrana plasmática, principalmente de células excitáveis. Os glicerofosfolipídios, juntamente com o colesterol, são os principais componentes da bicamada da membrana neural e formam a matriz na qual receptores, canais iônicos e outras proteínas envolvidas em tradução de sinais estão alojados (Agranoff et al, 1999). Esses compostos contêm uma molécula de glicerol como componente básico, ao qual um grupo fosfato (PO₄) é esterificado no carbono α (sn-3) e dois ácidos graxos esterificados nos dois átomos de carbono remanescentes (posição sn-1 e sn-2). O glicerol e o PO₄, que é ligado a uma base (etanolamina, colina, serina, inositol) ou a um átomo de hidrogênio (ácido fosfatídico), formam a cabeça polar (hidrofílica), e os ácidos graxos esterificados formam a cauda apolar (hidrofóbica) dos glicerofosfolipídios. Os ácidos graxos podem ter de 16 a 24 átomos de carbono e, normalmente, a primeira cadeia é saturada (sn-1) e a segunda insaturada (sn-2) com uma ou mais duplas ligações (Figura 1.5). O grau de insaturação dessas moléculas determina o arranjo espacial, bem como a fluidez da membrana e também podem modificar o funcionamento das células

como no caso das células que influenciam e alteram o micro-ambiente e, conseqüentemente, a estrutura e função de receptores, canais iônicos e enzimas.

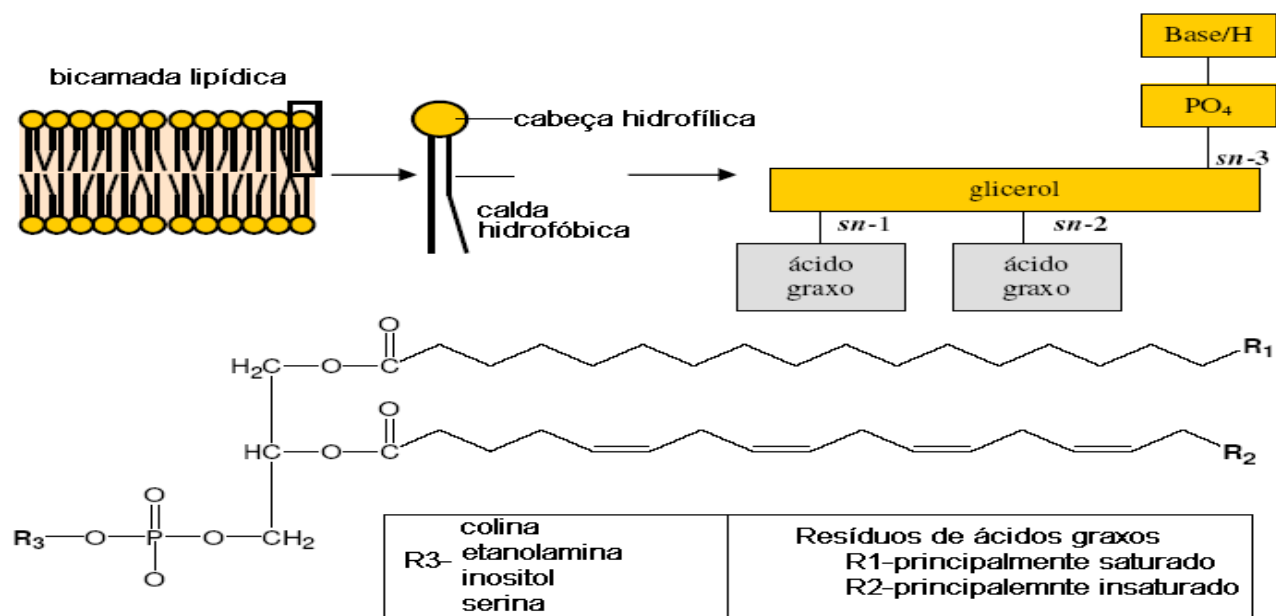


Figura 1.5) Estrutura química dos glicerofosfolipídios de membranas celulares. Na posição *sn*-1 é geralmente encontrado um resíduo de ácido graxo saturado, como ácido palmítico ou esteáricos, e na posição *sn*-2 um resíduo de ácido graxo insaturado, como ácido oléico, linolênico ou araquidônico. O grupo fosfato é ligado a um átomo de hidrogênio – H (ácido fosfatídico) ou a uma base, como a colina ou etanolamina.

O controle do metabolismo de fosfolipídios torna-se crucial para o desempenho das atividades celulares e este metabolismo é controlado por enzimas ligadas à membrana, sendo a PLA_2 a mais relevante. A PLA_2 citossólica catalisa a clivagem da ligação éster da posição *sn*-2 dos fosfolipídios, liberando o ácido araquidônico que é precursor, através da ação de lipooxigenases e ciclooxygenases, de eicosanóides (importantes na estimulação do processo inflamatório em si, que vão desde asma até artrite; e nas transduções de sinais, que podem desencadear efeitos biológicos como a inflamação e agregação plaquetária, por

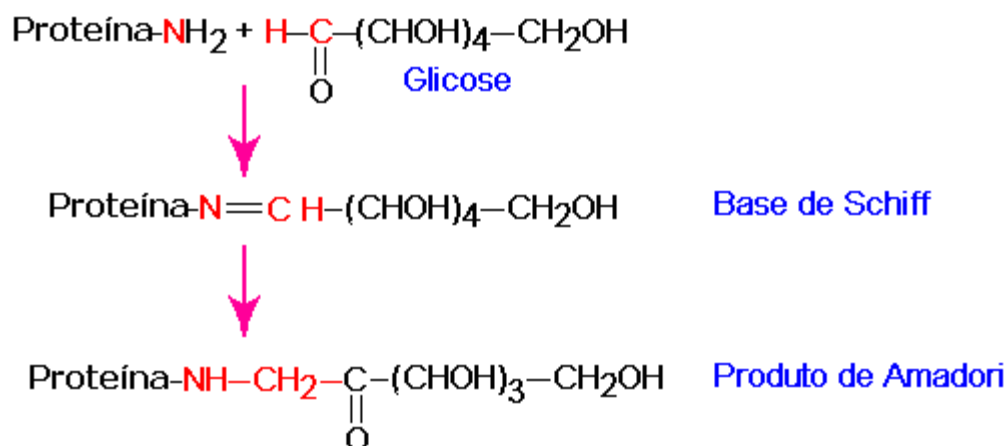
exemplo), além de ativar a proteína quinase C (PKC), estimular liberação de Ca^{2+} , modular a atividade de várias enzimas importantes e regular a transcrição gênica (Figura 1.6).

Outros produtos da clivagem dos fosfolipídios de membrana pela PLA_2 são os lisofosfolipídios, importantes na sinalização celular, remodelamento de fosfolipídios e propriedade da fluidez e permeabilidade da membrana (Dennis, 1994; Six e Dennis, 2000; Farooqui e Horrocks, 2004; Schaloske e Dennis, 2006). Os lisofosfolipídios sofrem a ação subsequente da fosfolipase A_1 (PLA_1) para liberar o ácido graxo da posição sn-1. O outro produto da ação da PLA_1 consiste de fosfodiésteres (PDE), que por sua vez são clivados pela fosfodieesterases, produzindo fosfomonoésteres (PME), que são usados na síntese de novos fosfolipídeos de membrana (Farooqui e Horrocks, 2004; Schaloske e Dennis, 2006).

1.2. Glicação de proteínas

A glicação é um evento molecular denominado também de glicosilação não enzimática e é o resultado da ligação de moléculas de carboidrato a uma proteína ou lipídio. Esta reação não é controlada por enzimas. A glicação pode ocorrer endogenamente ou exogenamente, mas em ambos os casos referem-se a reações que conduzem à ligação de moléculas de carboidratos em proteínas ou lipídios. A reação de Maillard, ou glicosilação não enzimática, refere-se a toda reação química que envolve a interação entre as aminas (primárias ou secundárias) com os compostos que contêm um grupo carbonila. A glicação dos resíduos de aminas expostos na cadeia protéica inicia-se com a formação de uma base de Schiff, que sofre um rearranjo formando um produto mais estável, chamado de cetoamina ou produto de Amadori (α -carbonil), o qual se

degrada em 1,3-deoxiglicosonas (Ruggiero-Lopez et al, 1999). Esquematicamente o processo de glicação pode ser representado como segue:



Nos alimentos ou nos sistemas biológicos, as fontes mais importantes de amina são os grupos amino terminal e os grupos amino dos resíduos de lisina de peptídeos e proteínas. As principais fontes de compostos carbonílicos são os carboidratos redutores (glicose, galactose, lactose e outros) e seus derivados. A química da reação de Maillard foi estudada extensivamente, especialmente com relação à formação de compostos de sabor, usando aminoácidos e carboidratos redutores (Yaylayan e Huyghues-Despointes, 1994).

Nas últimas duas décadas, entretanto, a reação do Maillard atraiu e recebeu grande interesse em várias disciplinas incluindo nutrição, toxicologia, fisiologia e patologia. Grande parte deste interesse se deve ao fato de que a glicação induz várias modificações estruturais e funcionais de proteínas em alimentos, mas também possuem grande importância em nível fisiológico e patológico em sistemas biológicos.

Os efeitos da reação do Maillard podem ser positivos ou negativos. Os atributos positivos desta reação são: seu emprego na indústria alimentícia, sendo usado para mudar sabor e textura dos alimentos, tornando-os mais palatáveis. Em relação à textura, estas reações permitem uma melhoria da solubilidade de proteínas, capacidade de hidratação, estabilidade térmica (Darewicz et al, 1998; Shu et al, 1996; Kato et al, 1995), geilificação e propriedades emulsionantes (Saeki, 1997; Shu et al, 1996; Kato et al, 1993; Matsudomi et al, 1995). Existem relatos de que a conjugação de polissacarídios com o α -amino da lisosima usando a reação de Maillard e modificação dos resíduos de asparagina melhora a estabilidade térmica, emulsionante e a atividade enzimática da lisosima (Kato et al, 1995).

Com o desenvolvimento de técnicas analíticas mais sensíveis, diversos estudos relataram outras conseqüências favoráveis da reação de glicosilação não enzimática na indústria de alimentos onde a formação dos compostos provenientes da reação de Maillard são usados como antioxidantes (Chuyen et al, 1998), compostos antibacterianos, anti-mutagênicos e possuem propriedades anti-carcinogênicas (Aeschbacher, 1990).

Os aspectos negativos da reação do Maillard podem ser considerados do ponto de vista nutricional, toxicológico e fisiológico. Do ponto de vista nutricional, a reação de Maillard reduz a qualidade dos alimentos reduzindo a biodisponibilidade da lisina, que é um aminoácido essencial, e destruindo outros aminoácidos essenciais tais como o triptofano e a cisteína (Hurrell et al, 1990). A reação também pode reduzir a solubilidade e digestibilidade de proteínas alimentares e desta forma diminuir a razão total de proteínas disponíveis para alimentação. Do ponto de vista toxicológico, alguns dos produtos provenientes de reações extensivas de Maillard, os AGEs, especialmente as aminas heterocíclicas têm sido caracterizadas como compostos com forte propriedades

genotóxicas capazes de interagir e causar modificações estruturais no DNA de células (Sugimura e Wakabayashi, 1990; Skog, 1993).

Outras moléculas de baixo peso molecular, tais como metilglioxal e glioxal, produzidos *in vitro* durante a preparação de alimentos, bem como *in vivo*, mostram que estes compostos podem interagir com o tecido e com proteínas séricas, interferindo em sua atividade biológica. Do ponto de vista fisiológico, a reação de Maillard entre proteínas e carboidratos redutores, ou seus derivados em sistemas biológicos, tem sido relatadas como causadora de vários efeitos deletérios.

A glicação de proteínas em sistemas biológicos causa mudanças estruturais e conformacionais além de alteração na atividade biológica da proteína. Algumas das mudanças observadas na função biológica das proteínas glicadas incluem: a perda de seu reconhecimento pelos receptores, aumento da proteólise (o que pode levar a um acúmulo perigoso de algumas proteínas) (Takizawa et al, 1993), perda da capacidade de protease e proteinase em reconhecer como substrato as proteínas glicadas, flexibilidade diminuída da proteína (devido ao aumento de reações cruzadas intra e inter cadeia), aumento da fluorescência (Raza e Harding, 1991), agregação protéica (Stevens et al, 1978), *cross-linking* (Argirova e Breipohl, 2002) e aumento da susceptibilidade à oxidação por tiol (Stevens et al, 1978). Estes conjuntos de alterações caracterizam mudanças conformacionais na proteína, que posteriormente, apresenta alterações de fluorescência do triptofano e dicroísmo circular (Beswick e Harding, 1987; Liang e Rossi, 1990; Kumar et al, 2004). A glicação não é específica ou restrita a proteínas estruturais, mas podem afetar enzimas susceptíveis, principalmente as intracelulares.

Os efeitos da glicação de proteínas *in vivo* são pronunciados particularmente no diabetes e em pacientes com insuficiência renal, devido aos níveis elevados de glicose no

sangue circulante e de AGEs solúveis. A glicose em particular, provoca alterações celulares decorrentes do processo de glicação não enzimática e da glicoxidação. Estes processos estão relacionados à produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e de AGEs, que contribuem para a modificação irreversível de proteínas, DNA e lipídios. Desta maneira, a hiperglicemia pode promover sérios danos celulares, podendo induzir precocemente morte celular (Monnier et al, 1996). Os efeitos desejáveis ou indesejáveis da glicação da proteína dependem das condições da reação. As circunstâncias principais que influenciam a reação de glicação incluem a temperatura, a atividade de água, a presença ou a ausência de circunstâncias de oxidação e tempo. A reação depende também do tipo de proteína e de carboidrato reduzido envolvidos na reação.

Um dos primeiros trabalhos mostrando a importância clínica da glicação foi demonstrado em proteínas do cristalino do olho humano por Van Heyningen (1969), outras doenças relacionadas com a glicação podem incluir: complicações da diabetes, doenças neuro-degenerativas, envelhecimento e osteoartrite. Diversas enzimas sofrem modificações por glicação, levando a perda da atividade enzimática, como por exemplo o sistema glutatona, contudo, a glicação não necessariamente inibe a atividade de outras enzimas (Seidler e Squire, 2005).

1.2.1. Glicação e PLA2

A atividade biológica e funcional de determinadas PLA2 podem ser moduladas por vários compostos, que não são necessariamente proteínas. Eles podem influenciar a estrutura e função da enzima, acentuando, diminuindo ou abolindo determinados efeitos biológicos das PLA2 secretórias. Muitos destes compostos têm sido largamente utilizados como ferramentas moleculares para estudos sobre a estrutura e função das PLA2. Existe

na literatura relatos da interação das PLA2 com ácidos graxos, como descrito por Lee et al (2001), que mostrou a presença de moléculas de ácido graxo dentro da cavidade hidrofóbica de PLA2 catalicamente não ativa (Lys 49) isoladas de *Bothrops pirajai*, que poderiam servir como uma espécie de âncora para estabilizar sua cavidade hidrofóbica, facilitando e acentuando o efeito biológico induzido por esta PLA2 Lys49.

Soares et al (2002), mostrou que a prévia incubação de PLA2 Lys 49 isoladas de *Bothrops jararacussu* com íons de manganês reduziram significativamente a sua atividade miotóxica e neurotóxica. Toyama et al (2003), também mostrou que o manganês, bem como outros cátions divalentes, induzem uma diminuição significativa da atividade enzimática da PLA2 cataliticamente ativa isolada do veneno de *Crotalus durissus terrificus*. Esses dados mostram que a estrutura e função das PLA2 podem ser moderadamente ou fortemente moduladas por íons.

As PLA2 são capazes de interagir de forma altamente específica com determinados receptores protéicos presentes na membrana celular, induzindo uma série de eventos moleculares que levam a várias atividades biológicas importantes; a inibição ou estímulo de sua ação, podem modificar o início de um processo inflamatório que pode vir a se tornar crônico (Gutierrez e Lomonte, 1995; Arni e Ward, 1996; Lindahl e Tagesson, 1997; Gambero et al, 2002; Iglesias et al, 2005).

In vitro as glicações induzem mudanças significativas na função das proteínas como a perda da capacidade de reconhecimento de receptores, resistência aumentada a proteólise, modificação de sua estrutura terciária e quaternária (Takizawa et al, 1993; Bitensky et al, 1989), flexibilidade, estrutura diminuída devido ao aumento de “cross-linking” intra e intermolecular (Kato et al, 1993).

Os efeitos da glicação “*in vivo*” são particularmente pronunciados em pacientes diabéticos e nos pacientes com insuficiência renal, devido ao aumento da concentração de carboidrato circulante. O fenômeno da glicação de proteínas também tem sido relacionado a muitas complicações secundárias, como doenças coronarianas, perda da visão e sintomas de inflamação crônica e, mais recentemente, associada também à doença de Alzheimer (Dandona et al, 2002, 2004 e 2007).

As PLA2 de venenos tem sido caracterizados como excelentes modelos para o estudo de PLA2 e especialmente das secretórias. Desta forma, neste trabalho utilizamos as PLA2 secretórias isoladas do veneno de *Crotalus durissus collilineatus* e de *Bothrops jararacussu* como modelos para estudar o efeito da glicação sobre a atividade enzimática e efeito biológico destas proteínas, e assim buscar entender as conseqüências do excesso de glicose ou de outros carboidratos redutores sobre suas funções.

2. Objetivos

2.1. Geral

Este trabalho teve por objetivo avaliar o efeito da glicação dos carboidratos D-Glicose, D-Galactose e D-Lactose sob a atividade enzimática e efeito biológico das PLA₂ de *Crotalus durissus collilineatus* e *Bothrops jararacussu*.

2.2. Específicos

- Isolar a PLA₂, cataliticamente ativa, do veneno da serpente *Crotalus durissus collilineatus*;
- Isolar as PLA₂ BthTX-I, cataliticamente não ativa, BthTX-II, cataliticamente ativa, do veneno de *Bothrops jararacussu*;
- Glicar as PLA₂ com os carboidratos simples D-Glucose, D-Galactose e D-Lactose;
- Verificar número de glicações das PLA₂ através da técnica de MALDI-TOF;
- Verificar alteração na atividade enzimática das PLA₂ cataliticamente ativas glicadas;
- Verificar alteração no efeito biológico da PLA₂ glicada através dos experimentos:
 - Agregação plaquetária;
 - Citotoxicidade;
 - Edema induzido em pata de camundongo;
 - Miototoxicidade.
- Caracterizar mudanças na estrutura das PLA₂ através dos experimentos:
 - Fluorescência intrínseca da proteína;
 - Dicroísmo Circular.

3. Material e Métodos

3.1 Animais

Camundongos machos de 4 semanas, Swiss (18–20 g) usados nos experimentos biológicos foram obtidos no Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na Área da Ciência em Animais de Laboratório (Cemib) da Unicamp. Todos os experimentos com animais foram aprovados pelo Comitê de Ética da Unicamp (Protocolo número: 1321-1; São Paulo, Brasil).

3.2 Veneno e Reagentes

O veneno de *Bothrops jararacussu* e de *Crotalus durissus collilineatus* foram doados pelo Instituto Butantan (São Paulo, Brasil). Todos os solventes, produtos químicos e reagentes usados nesse trabalho foram da Sigma, Aldrich Chemicals, Merck e Bio-Rad.

3.3 Purificação da PLA2

3.3.1. Purificação da PLA2 de *Crotalus durissus collilineatus*

O veneno bruto foi primeiramente fracionado como descrito por Toyama et al (2005): o veneno seco (35 mg) foi dissolvido em tampão bicarbonato de amônio (0.2M; pH 8.0) para completa dissolução, seguida por centrifugação (4500g por 2min). O sobrenadante obtido foi recuperado e aplicado no HPLC (Waters 991 PDA System) acoplado a coluna de exclusão molecular, numa coluna Superdex 75 (1,0cmx60cm) previamente equilibrada com o mesmo tampão usado na dissolução. A fração principal do veneno foi purificada em fluxo constante de 0,3 mL/min, a corrida cromatográfica foi monitorada a 280nm e a PLA2 foi coletada e liofilizada. A fração de PLA2 foi sujeita a

um segundo passo cromatográfico usando HPLC acoplado a coluna de fase reversa, a PLA₂ foi dissolvida em 200µL de TFA 0,1% (tampão A) até completa dissolução, seguida por centrifugação (4500g por 3 min). O sobrenadante foi aplicado no HPLC acoplado a coluna C18 µ-Bondapak (0.78cmx30cm) (Waters 991-PDA system). A PLA₂ foi coletada usando gradiente não linear com tampão B (acetonitrila a 66.6% em TFA 0.1%), num fluxo constante de 1.0 mL/min. A cromatografia foi monitorada a 280nm e a fração obtida foi liofilizada e guardada a -20°C.

3.3.2. Purificação das PLA₂ de *Bothrops jararacussu*

O veneno seco (35 mg) foi dissolvido em tampão bicarbonato de amônio (0.2M; pH 8.0) seguida por centrifugação (4500 g por 2min). O sobrenadante obtido foi recuperado e aplicado no HPLC (Waters 991-PDA system) acoplado a coluna de exclusão molecular(Superdex 75(1x60 cm)) previamente equilibrada com o mesmo tampão usado na dissolução. A fração principal do veneno foi purificada em fluxo constante de 0.3 mL/min, a corrida cromatográfica foi monitorada a 280nm e a PLA₂ foi coletada e liofilizada. A fração de PLA₂ foi sujeita a um segundo passo cromatográfico, a PLA₂ foi dissolvida em 200 µL de Bicarbonato de Amônio 0,05M (tampão A) seguida por centrifugação (4500 X g for 3 min). O sobrenadante foi aplicado em HPLC (Waters 991-PDA system) acoplado a coluna TSKgel SP-5PW (7,5cm ID x 7,5cm L) Tosoh Bioscience. As PLA₂ foram coletadas usando gradiente não linear com tampão B (Bicarbonato de Amônio 1,0M), num fluxo constante de 1.0 mL/min. A cromatografia foi monitorada a 280nm e a fração obtida foi liofilizada e guardada a -20°C.

3.4. Glicação da PLA₂

Aproximadamente 8 mg de PLA₂ e 1 mg do carboidrato foram dissolvidos em 5mL de tampão fosfato (0,1M; pH 7,0). Outra solução contendo apenas a PLA₂ também foi submetida as mesmas condições para ser utilizada como controle. As soluções foram estocadas em frascos de vidro, hermeticamente fechadas e cobertas com folhas de papel alumínio para evitar contato com a luz. Os frascos foram incubados a 35°C dentro de uma estufa por um período de 15 dias. Após a incubação, as amostras foram sujeitas a cromatografia em HPLC acoplado a coluna de exclusão molecular (Superdex 75, 1,0cmx60cm) para remoção do tampão e do carboidrato excedente. Após coletadas e liofilizadas, foram estocadas a -20°C.

3.5. Espectrometria de massa MALDI-TOF

A massa molecular da PLA₂ nativa e glicada foram analisadas por espectrômetro de massa MALDI-TOF usando um Voyager-DE PRO MALDI-TOF (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Um microlitro da amostra em TFA 0,1% foi misturado com 2µL de matriz de ácido sinapínico (3-(4-hidróxi-3,5-dimetóxfenil)prop-2-enóico). A matriz foi preparada com acetonitrila 30% e TFA 0,1% e analisado sobre as seguintes condições: voltagem acelerada de 25 kV, o laser fixado em 2890 iJ/cm², atraso 300 ns, e modo de análise linear.

3.6. Dicroísmo Circular

A PLA₂ pura e a PLA₂ glicada foram solubilizadas em água e a concentração final da proteína foi ajustada para 15µM. As amostras foram transferidas para uma cubeta de quartzo de 0,1cm. O espectro de dicroísmo circular foi medido no intervalo de

comprimento de onda 195-296 nm em um J-715 espectropolaróide (Jasco Corp., Japan) com fenda de 1 nm e um tempo de resposta de 4 segundos. A coleta de dados foi realizada à temperatura de 20°C, com velocidade de scan de 50 nm/min. Vinte scans foram obtidos para cada amostra e todos os espectros foram corrigidos pela subtração do tampão branco.

3.7. Fluorescência Intrínseca

A intensidade de fluorescência intrínseca relativa da PLA₂ nativa e glicada foram monitoradas com um software chamado Varian Cary Eclipse. As proteínas foram solubilizadas em água a temperatura ambiente. As medidas foram conseguidas usando uma cubeta de quartzo de 1,5 mL e 1,0cm de altura. A fluorescência foi mensurada entre 300 e 450 nm após excitação a 280 nm.

3.8. Atividade enzimática da PLA₂.

Para mensurar a atividade enzimática da PLA₂ seguiu-se o protocolo descrito por Holzer e Mackessy (1996) e modificado por Toyama et al (2003) para placas de ELISA de 96 poços, fundo chato. Foram colocados 20uL de enzima PLA₂, glicada ou não, diluída em solução tampão (Tris-HCl 10mM, CaCl₂ 10mM, NaCl 100mM, pH 7,8) na concentração de 1,0mg/mL em cada poço, menos nos poços referentes ao branco. Foram adicionados 20uL de substrato (4-nitro-3-(octanoloxy) benzoic acid (Sigma) 3mM), 200uL de solução tampão (Tris-HCl 10mM, CaCl₂ 10mM, NaCl 100mM, pH 7,8) e 20uL de água destilada em cada poço da placa (40uL nos poços referentes ao branco), num volume total de 260uL em cada poço. A leitura dos poços foi feita a 425 nm durante um período de tempo, sendo feitas em leitor de placa de multicanal (Spectramax 340; Molecular Devices) a 37°C

de temperatura. A atividade enzimática foi expressa em nmols do produto formado nmols/ min/ mg. O experimento foi feito em triplicata.

3.9. Eletroforese em SDS-PAGE

A eletroforese em gel de poliacrilamida foi realizada seguindo a metodologia descrita por Laemmli (1970). As placas de poliacrilamida foram feitas de modo descontínuo, apresentando gel estoque na concentração de 5% e gel de corrida de 12,5%. O gel de concentração a 5% foi preparado utilizando-se o tampão Tris-HCl 0,5M, pH 6,8 e o gel de corrida foi feito utilizando-se o tampão Tris-HCl 1,0M, pH 8,8. Em ambos os géis foram acrescentados 0,1% (v/v) de SDS 20%.

A eletroforese SDS-PAGE foi realizada em um sistema duplo de mini placas SE 250 Mighty Small II (Hoefer Scientific Instruments). As amostras e os marcadores de peso molecular foram dissolvidos em tampão de amostra (Tris-HCl, 0,075M, pH 6,8; 10% de glicerol; 4% de SDS; 0,001% de azul de bromo fenol). A corrida eletroforética foi realizada a 40 mA. Os géis foram corados com solução de Comassie Blue R250 0,1%, água: metanol: ácido acético glacial (5:5:2 por volume) a 37°C e o excesso de corante foi removido com água: metanol: ácido acético glacial (5:5:2 por volume).

3.10. Atividade de agregação plaquetária.

3.10.1. Preparo da solução de plaquetas

Para este ensaio foi coletado sangue de voluntários sadios, que não tomaram medicamentos nos últimos 15 dias. O sangue foi colocado em tubos plásticos contendo citrato de sódio 3,8% (1:10 v/v), e centrifugado a 200 x g por 15 minutos a 20°C para obtenção do plasma rico em plaquetas (PRP). Para preparar as plaquetas lavadas, o PRP

foi centrifugado a 800 x g por 12 minutos a 20°C na presença de iloprost 8µM (1 µL de solução para cada 1 mL de plasma), um análogo da prostaciclina. O sobrenadante foi desprezado e o precipitado de plaquetas foi ressuspendido em solução de Krebs livres de Ca²⁺ e centrifugado a 800 x g por 12 minutos a 20°C. O processo foi repetido por mais duas vezes (Radomski e Moncada, 1983). Após a lavagem, as plaquetas (50µl) foram incubadas em tubos “eppendorf”, com 950 µl de oxalato de amônio 1% por 10 min e a contagem de plaquetas foi feita em Câmara de Newbauer espelhada, ajustada para 2 x 10⁸ plaquetas/mL. Cloreto de cálcio (1 mM) foi adicionado à suspensão final das plaquetas. O sangue para obtenção das plaquetas lavadas (PL) possuía ACD-C (124 mmol/L Na₃-citrato, 130 mmol/L ácido cítrico e 110 mmol/L glicose) (1:10, v/v).

3.10.2. Medida da Agregação plaquetária

A medida de agregação foi realizada usando-se um agregômetro de dois canais (Payton Scientific Instruments, Inc, Buffalo, NY). O PRP representa 0% de agregação, determinando-se uma linha de base para o aparelho que foi calibrado contra PL, que apresenta 100% de agregação, determinando-se um pico máximo. Com isso foi possível determinar uma amplitude para o registro de agregação deste plasma. A calibração foi realizada contra solução de Krebs (NaCl 118mM, NaHCO₃ 25mM, D-glicose anidra 5,6mM e KCl 74g/L). Uma suspensão de PL (400 µl) foi mantida sob agitação constante (900 rpm) no agregômetro em cuvetas a 37°C. Os experimentos de agregação foram realizados em triplicatas, as amostras estavam numa concentração de 1,0mg/mL, sendo injetado apenas 10µL da solução. Como controle positivo foi utilizado trombina.

3.11. Experimento de Edema em pata de camundongo

Camundongos machos Swiss (18-20g) foram usados (n=5). O edema de pata foi induzido por uma única injeção subplantar de PLA₂ glicada ou não glicada(20 ug/pata). O volume da pata foi medido antes da aplicação e nos intervalos de tempo de 15, 30, 60, 120, 180 e 360 minutos após a injeção, utilizou-se um hidropletismômetro (modelo 7150, Ugo Basile, Itália). Todas as amostras foram dissolvidas em solução salina estéril 0,9% e o volume injetado na pata foi sempre de 20uL. Os resultados foram expressos em volume de pata (mL) calculado pela subtração do volume basal pelo volume final. A área sobre a curva (AUC) foi também calculada (regra trapezoidal) e os resultados expressos como volume total do edema (mL/pata).

3.12. Atividade Miotóxica

A atividade da creatina kinase plasmática(CK) foi mensurada usando um kit cinética de CK-UV (Sigma Chemical Co). A PLA₂ tratada ou nativa (1µg/µL) foi injetada intramuscularmente no músculo gastrocnêmio de camundongos Swiss machos (25µL, n = 5). Nos camundongos usados como controle negativo foi injetado salina. Após 1 hora, uma amostra de sangue foi coletado do rabo em tubos capilares heparinizados e centrifugados para separação do plasma. A atividade de CK foi determinada usando 4µL do plasma, de acordo com o manual de instrução do kit. A atividade foi expressa em U/L.

3.13. Viabilidade Celular

As células neuronais N2A e as células produtoras de insulina RINm5F foram cultivadas como descrito por Souza et al (2004) em meio RPMI- 1640, contendo 10 mmol/L de glicose, 10% de FCS (vol/vol), penicilina e estreptomicina a 37°C e 5% de CO₂.

Para as células neuronais utilizou-se o redutor MTS que foi mensurado usando um espectrofotômetro do tipo CellTiter 96TM AQueous 5- Assay (Promega, USA) a 490nm, para todos os testes de viabilidade. As células neuronais (N2A) foram cultivadas em placas de 96 poços numa concentração de células/poços de 100uL de meio de cultura incubada por 12 horas a 37°C antes de exposta a PLA2 glicada ou nativa (15ug/mL). A mistura de PMS/MTS foi preparada seguindo as indicações do fabricante e diluída em tampão de Krebs 15%. A viabilidade foi expressa como percentual de absorção de MTS na ausência de compostos citotóxicos para cada grupo (n=8).

Para as células produtoras de insulina RINm5F, normais e com superexpressão de catalase (Kat), as células foram semeadas a um densidade de 2×10^6 por prato de plástico de 90mm e cresceu durante 2 dias. Após isso, as células foram expostas por 6 horas a PLA2. O controle de RINm5F cresceu na ausência da PLA2.

3.14. Predição da estrutura tridimensional da PLA2.

Utilizando a seqüência de aminoácidos do trabalho de Toyama et al (2005) da PLA2 de Cdc10 foram feitos testes de similaridade e alinhamento usando o Protein Data Bank através de BLASTP. A estrutura 3D da PLA2 foi determinada através do modelamento de homologia comparativa. Usando gráficos no computador, a seqüência de aminoácidos da PLA2 foi ajustada a uma estrutura de raio-X de alta resolução. Isso permitiu a construção de um modelo, que foi então sujeito a simulações de mínima energia e dinâmica molecular.

3.15. Análise estatística

Os resultados foram expressos como média $\pm$ erro padrão. A significância da diferença entre médias foi feita pela análise de variância, seguindo teste de Dunnett's quando vários grupos experimentais foram comparados com o grupo controle. O valor $p < 0,05$ foi considerado significativo.

4. Resultados

4.1. Experimentos com a PLA2 de *Crotalus durissus*

collilineatus

Após o primeiro passo de purificação, no HPLC acoplado a coluna de exclusão molecular com a coluna Superdex 75 (1x60 cm), a fração principal (com atividade enzimática) foi coletada e liofilizada. Uma alta homogeneidade molecular foi obtida após a fração passar pelo HPLC acoplado a coluna de fase reversa (Figura 4.1 a), cujo resultado foi apenas uma banda eletroforética (Figura 4.1 b) com massa molecular de 14kDa, aproximadamente. A PLA2 foi sujeita a glicação com D-Glicose, D-Galactose e D-Lactose durante 15 dias, e após esse período o excesso de carboidratos foi removido.

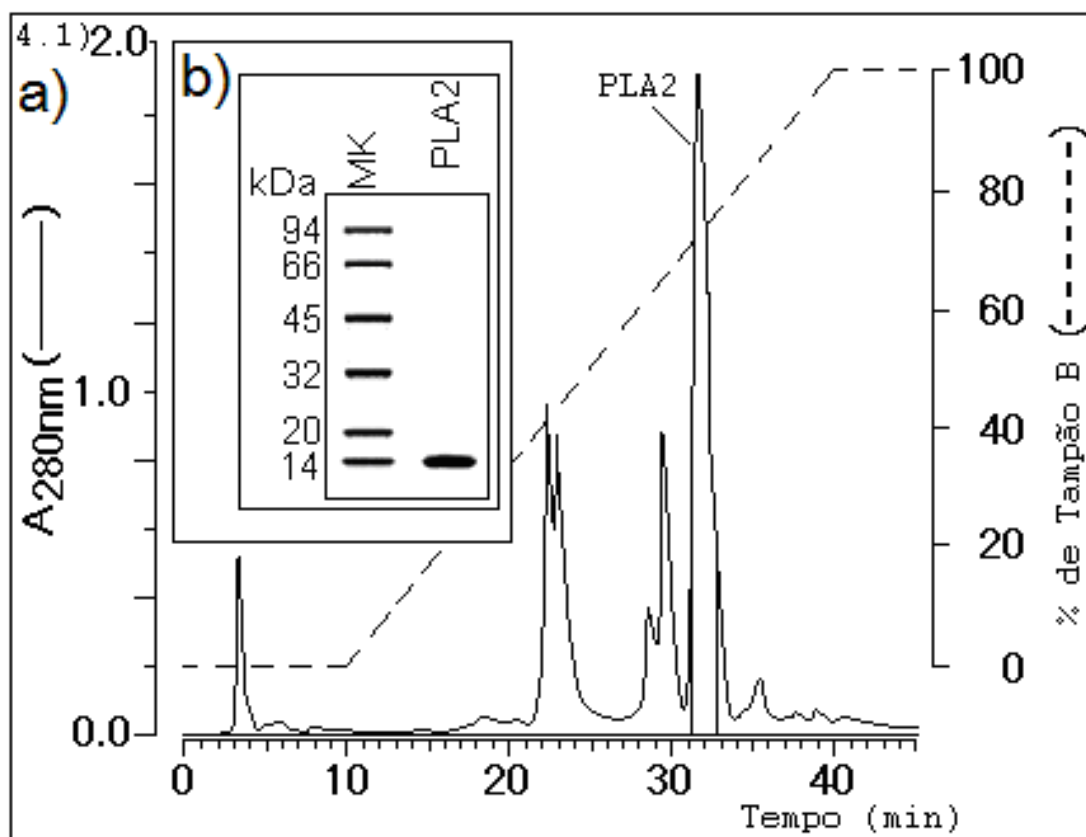


Figura 4.1) Purificação da PLA2 do veneno de *Crotalus durissus collilineatus*

a) Perfil cromatográfico da purificação da PLA2 de Cdcogli, obtido em HPLC acoplado a coluna de fase reversa. b) SDS-PAGE confirmou o grau de pureza da amostra apresentando uma única banda de massa molecular estimada de aproximadamente 14kDa.

Após a indução da glicação dessas PLA2 com os carboidratos, o excesso de carboidratos foi removido das amostras, e as enzimas resultantes foram guardadas. O MALDI-TOF foi feito para confirmar a glicação das proteínas, os resultados sugerem que a PLA2 de Cdc10li apresentou glicação a 6 moléculas de D-Glicose e a 5 moléculas de D-Lactose, mas aparentemente não houve glicação com nenhuma molécula de D-Galactose (Figura 4.2).

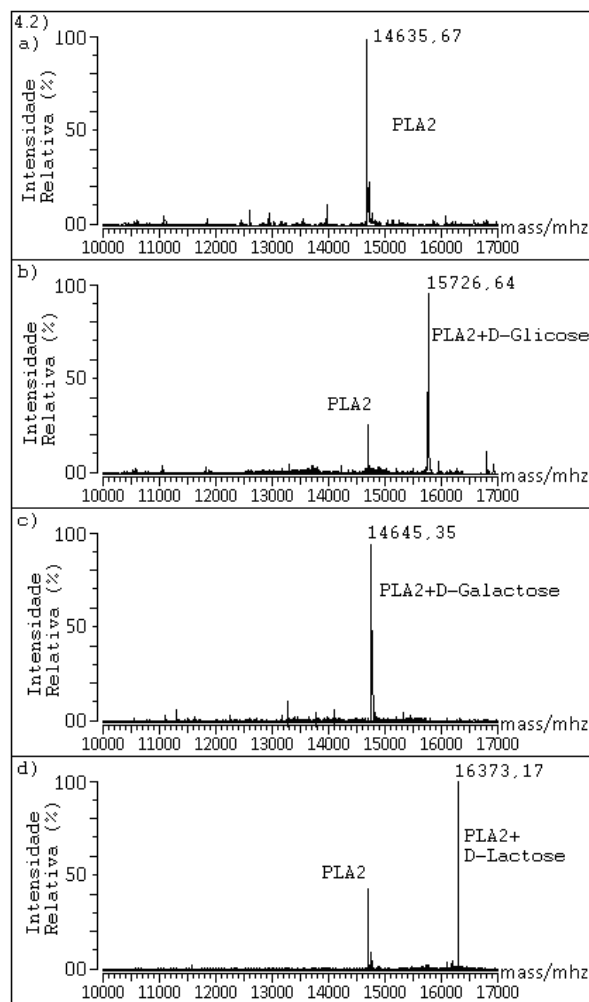
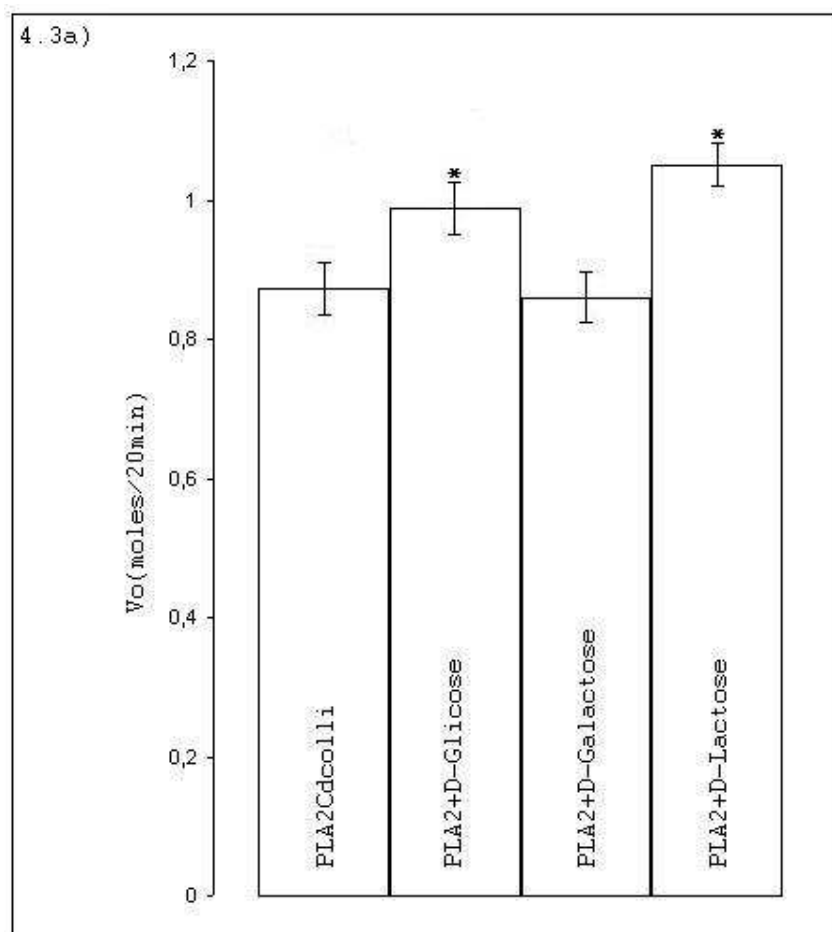


Figura 4.2) Espectrometria de massa da PLA2 de Cdcogli, nativa ou glicada.

a) PLA2 de Cdcogli apresentou um único de pico de 14635,67 kDa. **b)** A PLA2 de Cdcogli glicada a D-Glucose apresentou dois picos, um correspondente a PLA2 nativa, que não foi glicada, e outro pico de 15726,64 correspondente a PLA2 glicada a 6 moléculas de D-Glucose. **c)** A PLA2 de Cdcogli glicada a D-Galactose apresentou um pico de 14645,35 correspondente a PLA2 nativa, aparentemente não houve glicação de nenhum carboidrato à proteína. **d)** A PLA2 de Cdcogli glicada a D-Lactose apresentou dois picos, um correspondente a PLA2 nativa, que não foi glicada, e outro pico de 16373,17 correspondente a PLA2 glicada a 5 moléculas de D-Lactose.

A atividade enzimática foi mensurada e as enzimas glicadas com D-Glicose e D-Lactose tiveram sua atividade aumentada (Figura 4.3 a e b). A PLA2 nativa mostrou um V_{max} de 18,54 e K_m de 7,52, no entanto, as PLA2 glicadas com D-Lactose, D-Glucose ou D-Galactose exibiram um V_{max} e K_m de 43,32 e 6,91; 36,09 e 5,02; 22,4 e 6,93, respectivamente. A análise da figura 4.3b sugere que a PLA2 nativa apresentou um comportamento alostérico, enquanto a proteína glicada apresentou a curva deslocada. Essa mudança de comportamento sugere que a presença de carboidratos na estrutura da PLA2 aumentou a afinidade da enzima pelo substrato. A constante de Michaelis-Menten, K_m , que representa a concentração de substrato à qual se detecta uma velocidade de reação igual a metade de V_{max} . Cada enzima possui um K_m característico para um dado substrato; este parâmetro é muitas vezes usado para demonstrar a força de ligação de um substrato à enzima.



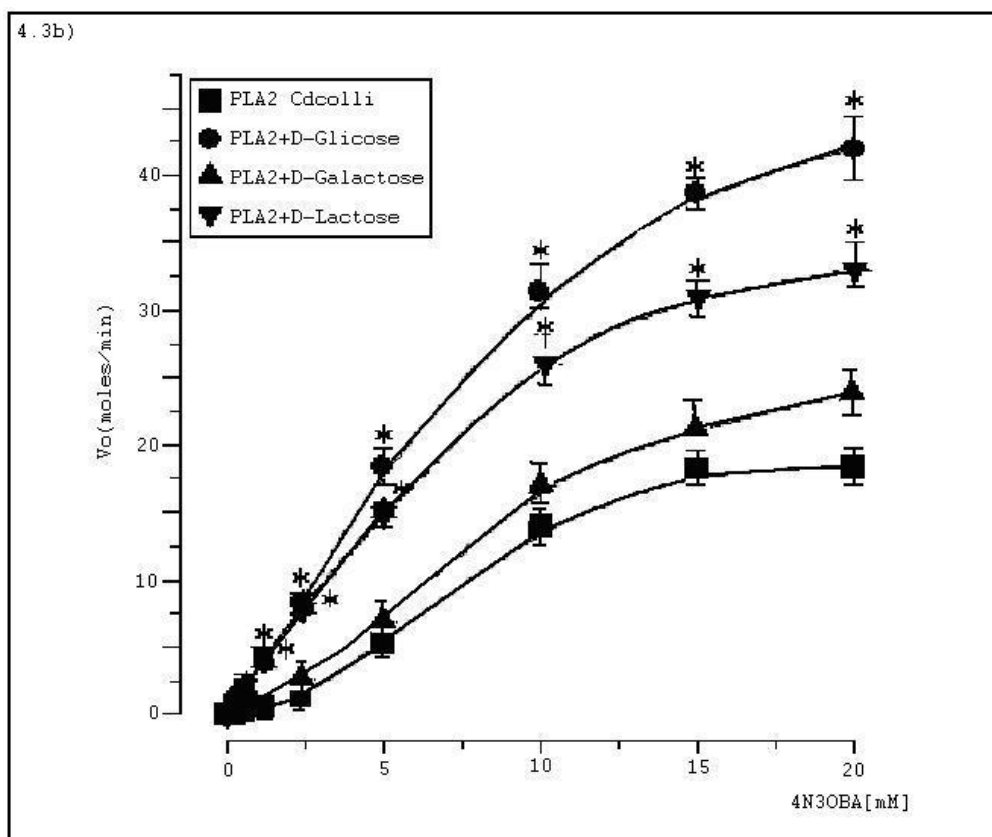


Figura 4.3) Atividade Enzimática da PLA2 de Cdcolli, nativa ou glicada.

a) A PLA2 de Cdcolli apresentou aos 20 minutos de reação, V_o de $0,8736 \pm 0,0496$ moles, enquanto a PLA2 glicada a D-Glicose apresentou atividade aumentada de $0,9884 \pm 0,0414$ moles assim como a PLA2 glicada a D-Lactose com $1,0500 \pm 0,0376$ moles. No entanto a PLA2 sujeita a glicação com D-Galactose apresentou atividade de $0,8588 \pm 0,0425$ moles, muito similar a PLA2 nativa. A PLA2 glicada a D-Glicose e a D-Lactose aumentaram significativamente a atividade enzimática da PLA2 nativa ($n=3$). **b)** A atividade enzimática da PLA2 nativa mostrou um V_{max} de 18.54 e K_m de 7.52, no entanto, as PLA2 glicadas com D-Lactose, D-Glucose ou D-Galactose exibiram um V_{max} e K_m de 43,32 e 6,91; 36,09 e 5,02; 22,4 e 6,93, respectivamente. Podemos observar que as PLA2 glicadas aumentaram sua atividade enzimática pelo aumento de sua afinidade pelo substrato ($n=3$).

Na figura 4.4, a eletroforese da PLA2 nativa, a PLA2 sujeita a glicação com D-Galactose e a PLA2 glicada a D-Glicose apresentaram uma única banda de aproximadamente 14kDa correspondente a forma monomérica da proteína. A PLA2 glicada a D-Lactose apresentou duas bandas, uma banda de aproximadamente 14kDa na forma monomérica da PLA2 e uma banda de 30kDa consistente com homodimerização da PLA2 .

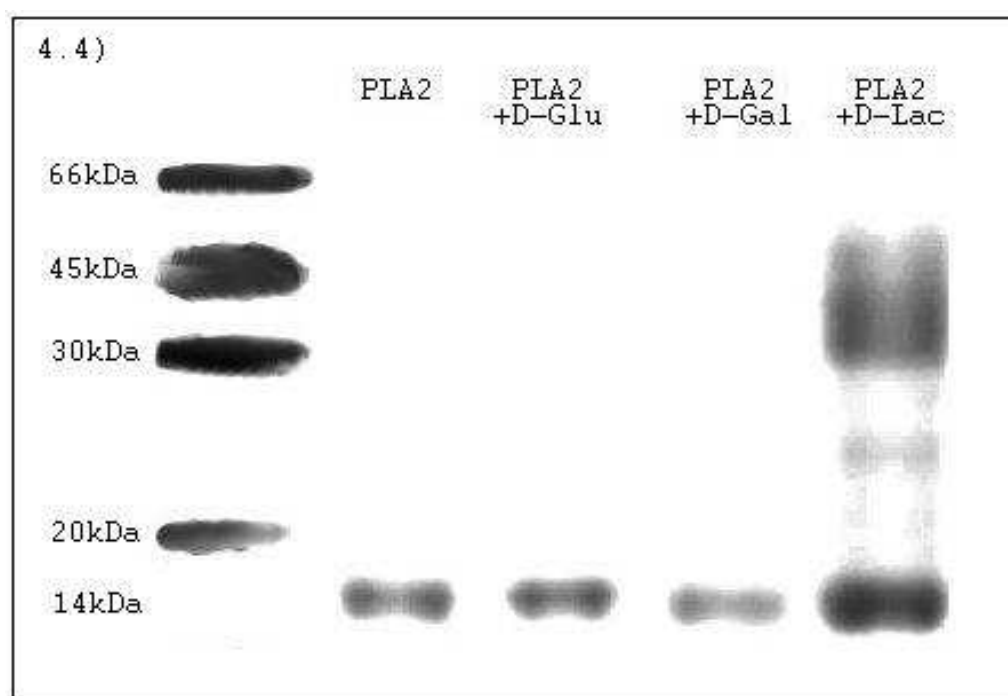


Figura 4.4) Eletroforese da PLA2 de Cdc10li glicada ou não

Todas as amostras apresentaram uma banda de aproximadamente 14kDa, consistente com a proteína em sua forma monomérica. Além disso, a PLA2 glicada a D-Lactose apresentou uma segunda banda de aproximadamente 30kDa consistente com a proteína em sua forma homodimérica.

No experimento de agregação plaquetária, a PLA2 nativa induziu $54,83\% \pm 3,0422$ de agregação, enquanto as PLA2 glicadas a D-Glicose e D-Galactose induziram, respectivamente, $55,33\% \pm 2,0275$ e $53,0\% \pm 5,7154$ de agregação. A D-Lactose, por outro lado, diminuiu a agregação plaquetária e induziu $24,66\% \pm 5,4873$. Na figura 4.5 a, é possível observar que há diferenças significantes entre os perfis induzidos pela PLA2 glicada com D-Galactose e D-Glicose e a PLA2 nativa, mesmo o resultado de agregação total ser similar (Figura 4.5 b).

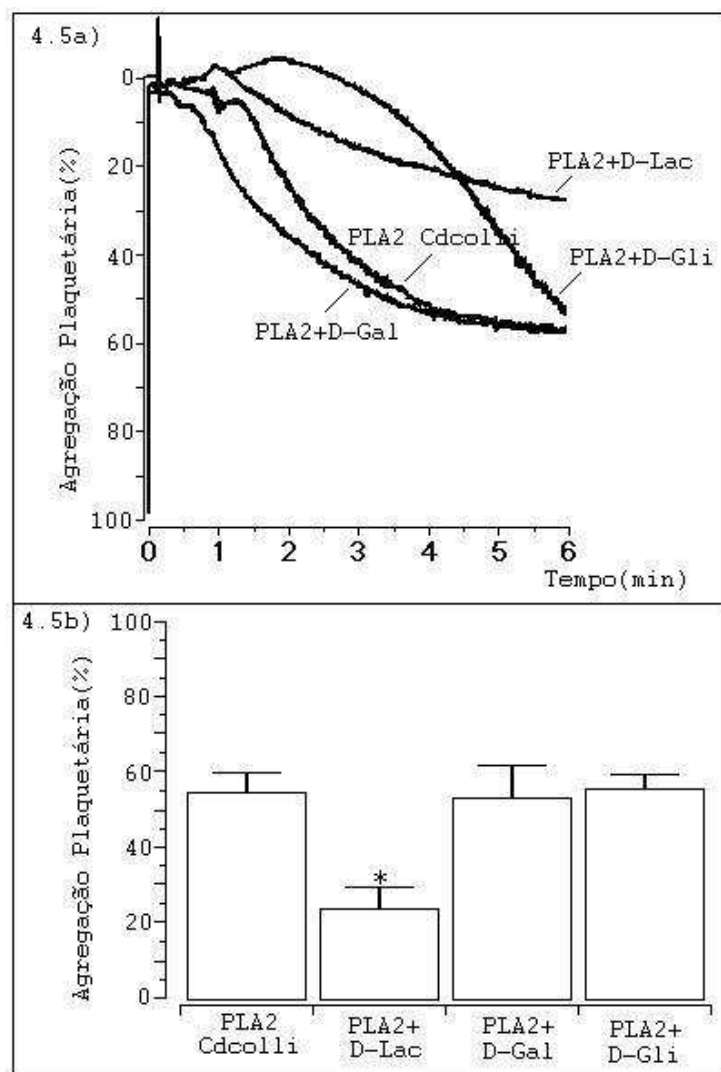


Figura 4.5) Agregação Plaquetária induzida pela PLA2 de Cdcolli, nativa ou glicada

a) A PLA2 de Cdcolli nativa e sujeita a glicação com D-Galactose induziram agregação plaquetária similar; a PLA2 glicada a D-Glicose apresentou mesma intensidade de agregação embora o perfil tenha sido bem diferente. A PLA2 glicada a D-Lactose apresentou agregação plaquetária diminuída. **b)** Os valores totais de agregação plaquetária induzidos foram: PLA2 54,83%±3,0422, PLA2 sujeita a glicação com D-Galactose 53%±5,7154, PLA2 glicada a D-Glicose 55,33%±2,0275 e PLA2 glicada a D-Lactose 24,66%±5,4873. A PLA2 glicada a D-Lactose diminuiu significativamente a agregação da PLA2 nativa (n=3).

A PLA2 nativa induziu um edema significativo com efeito máximo observado aos 60 minutos depois da injeção da proteína, que diminuiu rapidamente aos 120 minutos (Figura 4.6 a). Todas as PLA2 tratadas diminuíram o edema máximo inicial induzido pela PLA2 como pode-se ver na figura 4.6 a. Observa-se também que após 180 minutos o edema causado pelas enzimas glicadas a D-Glicose e D-Lactose se prolongam. A área sobre a curva foi mensurada para obtenção do valor de edema total: PLA2 nativa $0,1768 \pm 0,0195$, a PLA2 sujeita a glicação com D-Galactose $0,2127 \pm 0,0126$, a PLA2 glicada a D-Glicose $0,2687 \pm 0,0172$ e a PLA2 glicada a D-Lactose $0,2379 \pm 0,0251$ (Figura 4.6 b). A glicação com D-Glicose e D-Lactose aumentou significativamente o edema induzido pela PLA2 nativa (n=5).

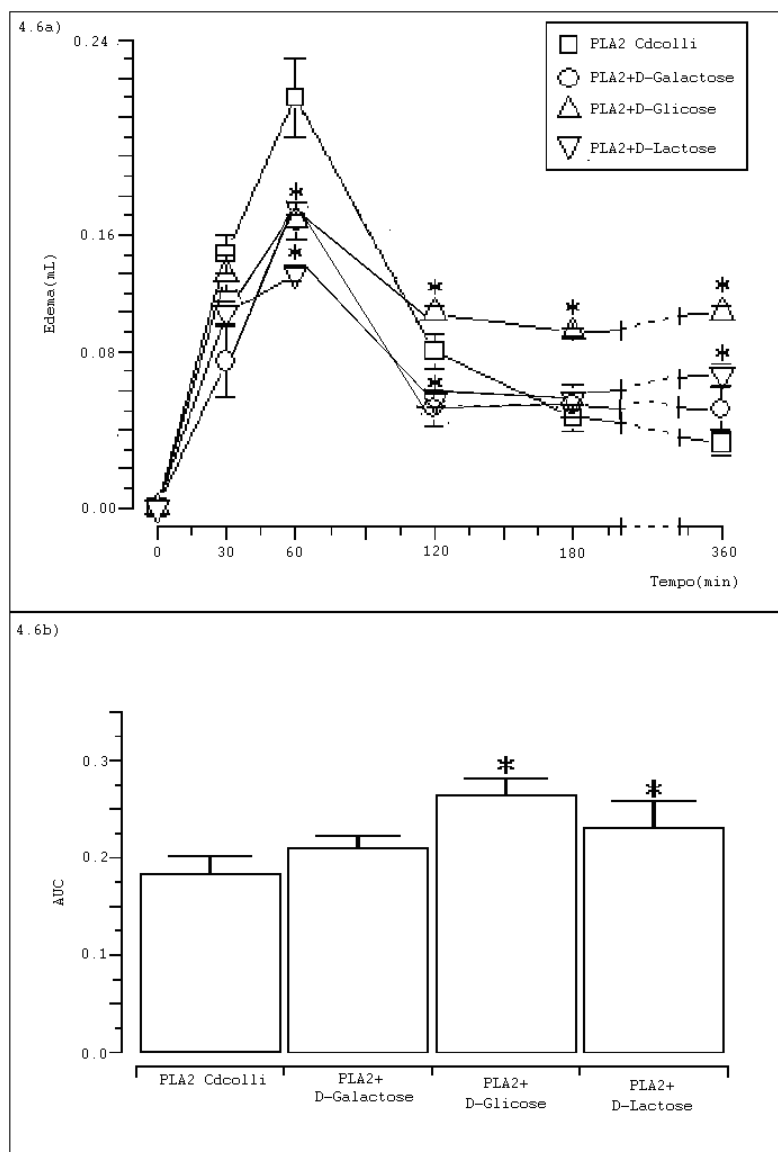


Figura 4.6) Edema em pata de camundongo induzido pela PLA2 de Cdc101 nativa ou glicada **a)** O máximo edema induzido pela PLA2 nativa ocorreu aos 60 minutos após injeção da amostra. As PLA2 glicadas diminuíram o máximo edema, apesar de prolongarem o efeito por um período maior. **b)** O edema total foi calculado pela Área sobre a Curva (AUC). A PLA2 nativa apresentou edema de $0,1768 \pm 0,0195$, a PLA2 sujeita a glicação com D-Galactose $0,2127 \pm 0,0126$, a PLA2 glicada a D-Glucose $0,2687 \pm 0,0172$ e a PLA2 glicada a D-Lactose $0,2379 \pm 0,0251$. Pode-se verificar que o edema foi aumentado significativamente pelas PLA2 glicadas a D-Glucose e D-Lactose quando comparadas a PLA2 nativa (n=5).

A atividade da creatina kinase plasmática (CK) foi mensurada e a PLA2 apresentou alta atividade miotóxica de $582,84 \pm 35,1129$ UL/min, enquanto a proteína glicada com D-Glicose, D-Galactose ou D-Lactose apresentou atividade de, respectivamente, $523,02 \pm 34,1670$ UL/min, $537,52 \pm 44,3449$ UL/min e $471,61 \pm 26,4432$ UL/min (Figura 4.7). Aparentemente, a glicação da enzima diminuiu significativamente o efeito miotóxico induzido pela PLA2, esse efeito é mais evidente para as PLA2 glicadas a D-Glicose e D-Lactose (Figura 4.7).

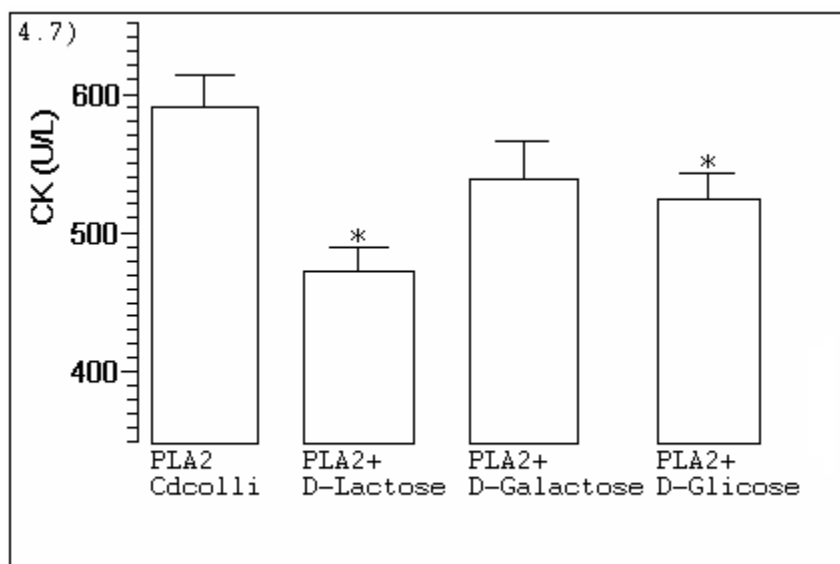


Figura 4.7) Atividade miotóxica da PLA2 de Cdc11i, nativa ou glicada

A PLA2 nativa apresentou forte efeito miotóxico de $582,84 \pm 35,1129$ UL/min, a PLA2 glicada a D-Lactose diminuiu o efeito com $471,61 \pm 26,4432$ UL/min, a PLA2 sujeita a glicação com D-Galactose apresentou efeito de $537,52 \pm 44,3449$ UL/min e a PLA2 glicada a D-Glicose $523,02 \pm 34,1670$ UL/min. As PLA2 glicadas a D-Lactose e D-Glicose diminuíram significativamente a miotoxicidade da PLA2 nativa (n=5).

A atividade citotóxica da PLA2 de Cdcogli foi testada com células neuronais (N2A) , e os resultados mostraram que sua atividade foi anulada pela glicação aos carboidratos (Figura 4.8 a).

Outro ensaio demonstrou a comparação entre a célula pancreática normal e a célula pancreática com superexpressão de enzima catalase (Kat), onde observou-se uma diminuição da viabilidade da célula normal, enquanto na célula que superexpressa a enzima catalase não foi observada. Isso se deve pela superexpressão da enzima catalase estar inibindo um dos modos de ação citotóxica da PLA2 que seria através do estresse oxidativo (Figura 4.8 b).

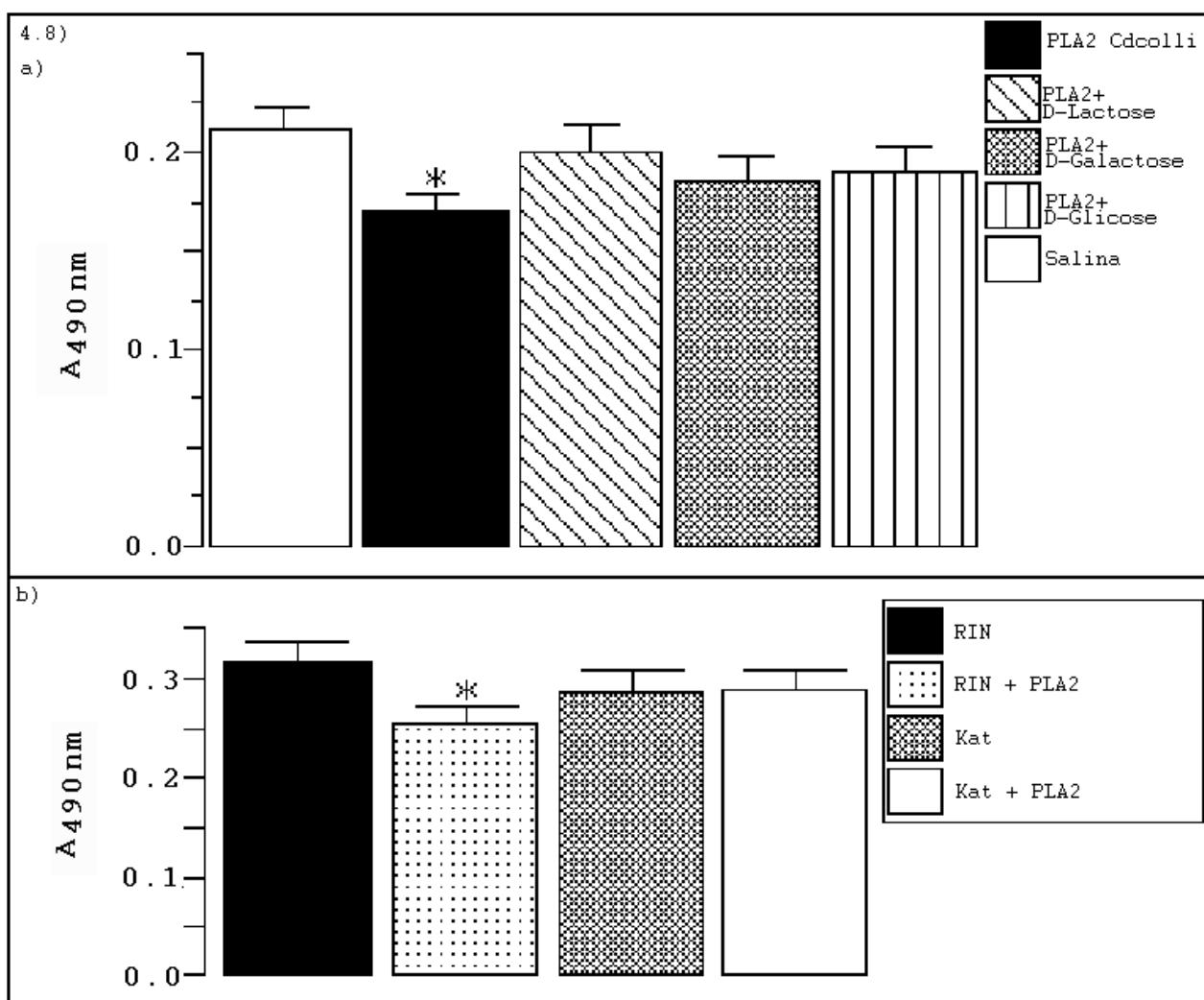


Figura 4.8) Citotoxicidade da PLA2 de Cdc10, nativa ou glicada.

a) A PLA2 de Cdc10 apresentou citotoxicidade quando testada com células neuronais (N2A), embora essa atividade tenha sido anulada pelas PLA2 glicadas aos carboidratos. **b)** Comparando a ação da PLA2 com células produtoras de insulina normais (RIN) ou com superexpressão da enzima catalase (Kat) percebe-se que a ação citotóxica da PLA2 se dá através do estresse oxidativo.

O Dicroísmo Circular foi realizado com o objetivo de se detectar mudanças em nível de estrutura secundária da PLA2 causada pela glicação com os carboidratos D-Glicose e D-Lactose.

No espectro é possível observar bandas características de α -hélice na região próxima a 208-220nm, entretanto, mudanças no perfil após a glicação sugerem que a glicação está causando modificações na estrutura secundária da PLA2 de Cdc10 (Figura 4.9).

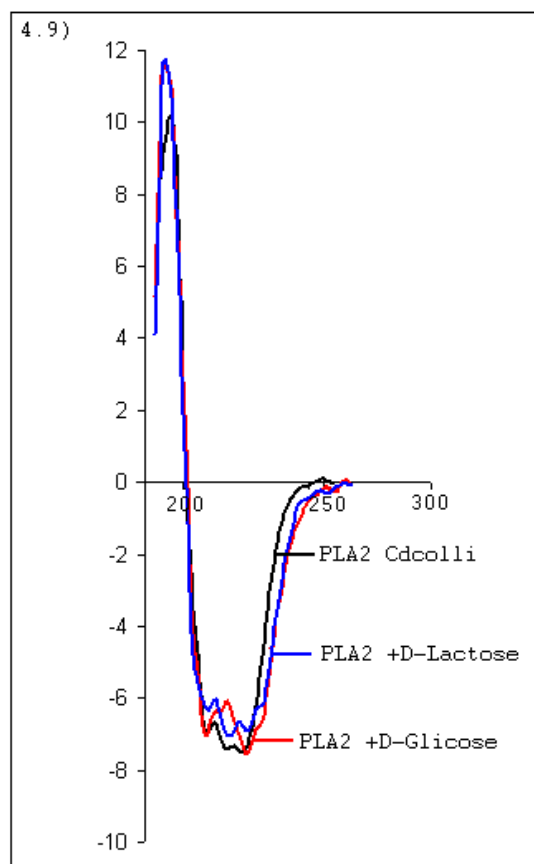


Figura 4.9) Dicroísmo Circular da PLA2 de Cdc11i, nativa ou glicada.

O espectro de Dicroísmo Circular apresentou mudanças entre a PLA2 nativa e as PLA2 glicadas com D-Glicose e D-Lactose, sugerindo modificação na conformação estrutural da proteína em nível de estrutura secundária.

Os estudos de modelação da estrutura utilizando a sequência de aminoácidos da PLA2 de *Crotalus durissus collilineatus* no Protein Data Bank resultou numa estrutura 3D através do modelamento de homologia comparativa. Os gráficos no computador construíram o modelo da Figura 4.10.

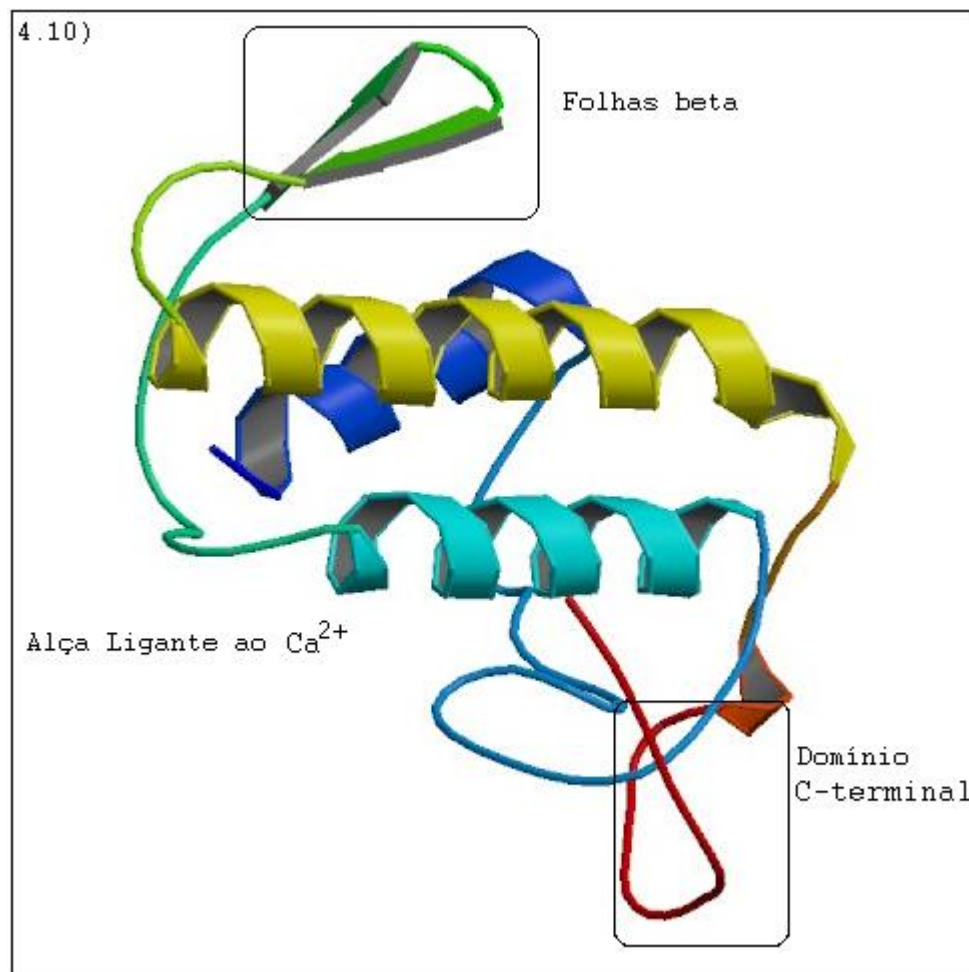


Figura 4.10) Estrutura da PLA2 de Cdculli

A estrutura da PLA2 de *Crotalus durissus collilineatus* foi produzida através de modelação no Protein Data Bank. A sequência de aminoácidos utilizada foi retirada do trabalho de Toyama et al, 2005.

4.2. Experimentos com as PLA2 de *Bothrops jararacussu*

Após o primeiro passo de purificação, no HPLC acoplado a coluna de exclusão molecular (Superdex 75 (1x60 cm)), a fração proteica foi coletada e liofilizada. Uma alta homogeneidade molecular foi obtida após a fração passar pelo HPLC acoplado a coluna de troca iônica (Figura 4.11). As PLA2 BthTX-I e BthTX-II foram sujeitas a glicação com D-Glicose, D-Galactose e D-Lactose durante 15 dias, e após esse período o excesso de carboidratos foi removido.

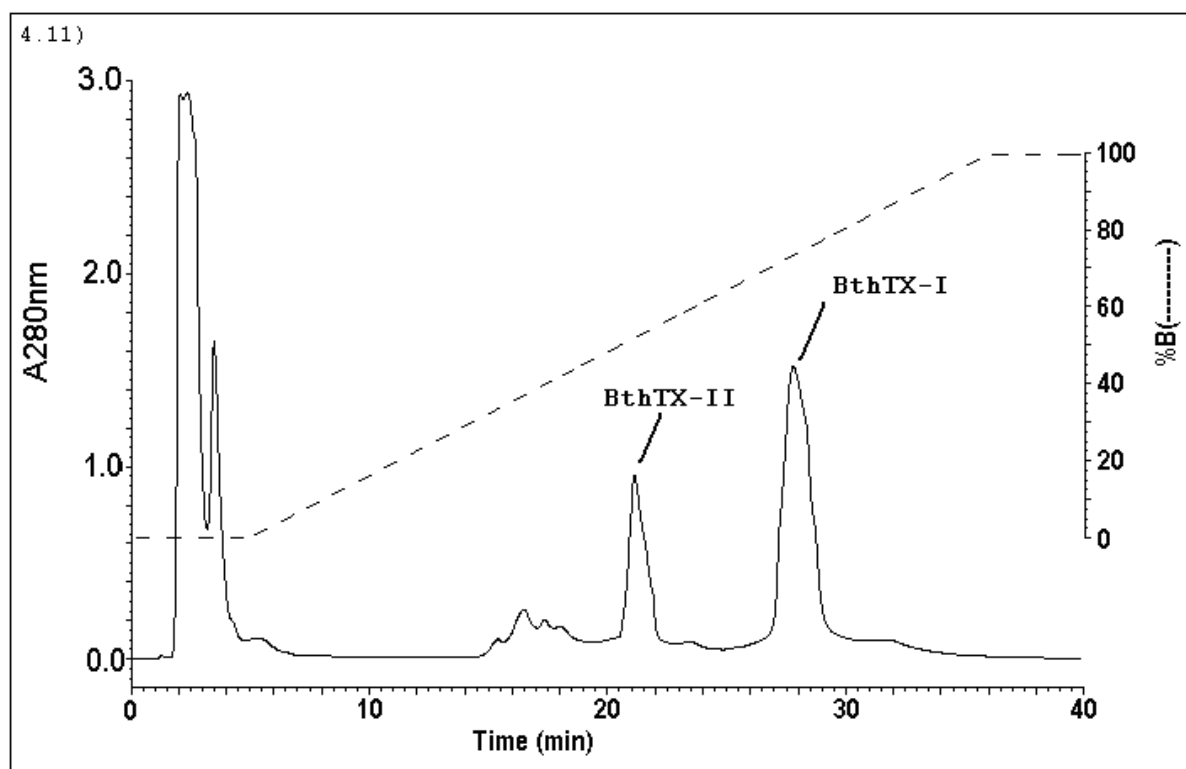


Figura 4.11) Purificação do veneno da serpente *Bothrops jararacussu*

A segunda fase de purificação do veneno de *Bothrops jararacussu* foi feito em HPLC acoplado a coluna de troca iônica, os picos de BthTX-I e BthTX-II foram coletados e armazenados.

Após a indução da glicação das PLA2 com os carboidratos, o excesso de carboidratos foi removido das amostras, e as enzimas resultantes foram guardadas. O MALDI-TOF foi feito para confirmar a glicação das proteínas, os resultados sugerem que BthTX-I apresentou ligação com 5 moléculas de D-Glicose, 1 molécula de D-Galactose e 4 moléculas de D-Lactose (Figura 4.12).

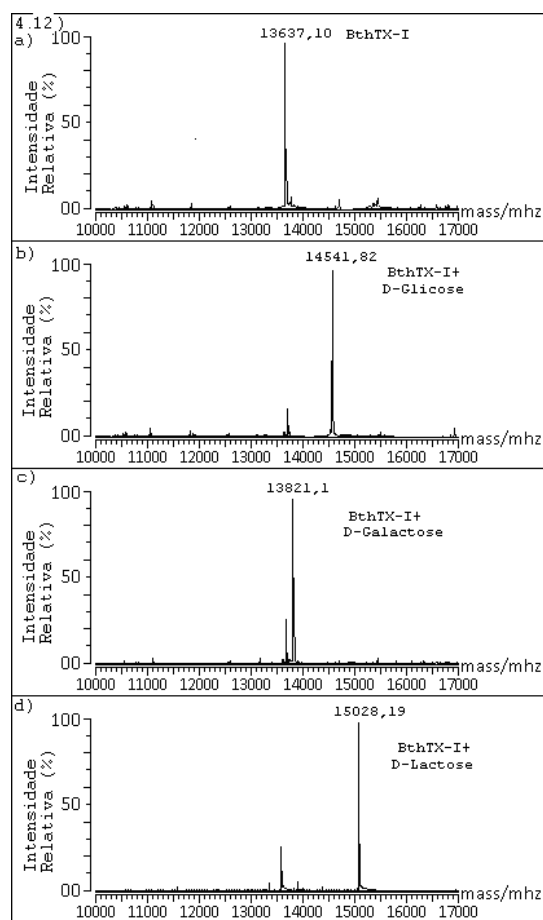


Figura 4.12) Espectrometria de massa da PLA2 de BthTX-I, nativa ou glicada.

a) BthTX-I apresentou um único de pico de 13637,10 kDa. **b)** A BthTX-I glicada a D-Glicose apresentou dois picos, um correspondente a PLA2 nativa, que não foi glicada, e outro pico de 14541,82 correspondente a PLA2 glicada a 5 moléculas de D-Glicose. **c)** A PLA2 de BthTX-I glicada a D-Galactose apresentou dois picos, um correspondente a PLA2 nativa, que não foi glicada, e outro pico de 13821,1 correspondente a PLA2 glicada a 1 molécula de D-Galactose. **d)** A PLA2 de BthTX-I glicada a D-Lactose apresentou dois picos, um correspondente a PLA2 nativa, que não foi glicada, e outro pico de 15028,19 correspondente a PLA2 glicada a 4 moléculas de D-Lactose.

A BthTX-II apresentou ligação a 6 moléculas de D-Glicose, a 1 molécula de D-Galactose ou a 4 moléculas de D-Lactose (Figura 4.13 a, b, c, d).

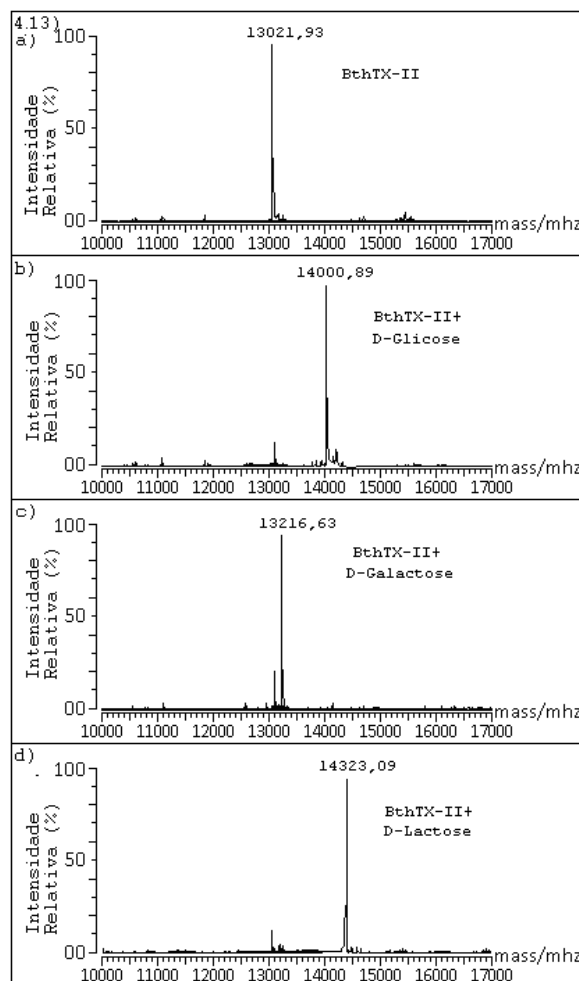


Figura 4.13) Espectrometria de massa da PLA2 de BthTX-II, nativa e glicada.

a) BthTX-II apresentou um único de pico de 13021,93 kDa. **b)** A BthTX-II glicada a D-Glicose apresentou dois picos, um correspondente a PLA2 nativa, que não foi glicada, e outro pico de 14000,89 correspondente a PLA2 glicada a 6 moléculas de D-Glicose. **c)** A PLA2 de BthTX-II glicada a D-Galactose apresentou dois picos, um correspondente a PLA2 nativa, que não foi glicada, e outro pico de 13216,63 correspondente a PLA2 glicada a 1 molécula de D-Galactose. **d)** A PLA2 de BthTX-II glicada a D-Lactose apresentou dois picos, um correspondente a PLA2 nativa,

que não foi glicada, e outro pico de 14323,09 correspondente a PLA₂ glicada a 4 moléculas de D-Lactose.

A atividade enzimática da BthTX-II foi mensurada e a enzima glicada a D-Glicose e D-Lactose tiveram sua atividade diminuída (Figura 4.14), enquanto a glicada a D-Galactose obteve resultado similar a PLA₂ não tratada.

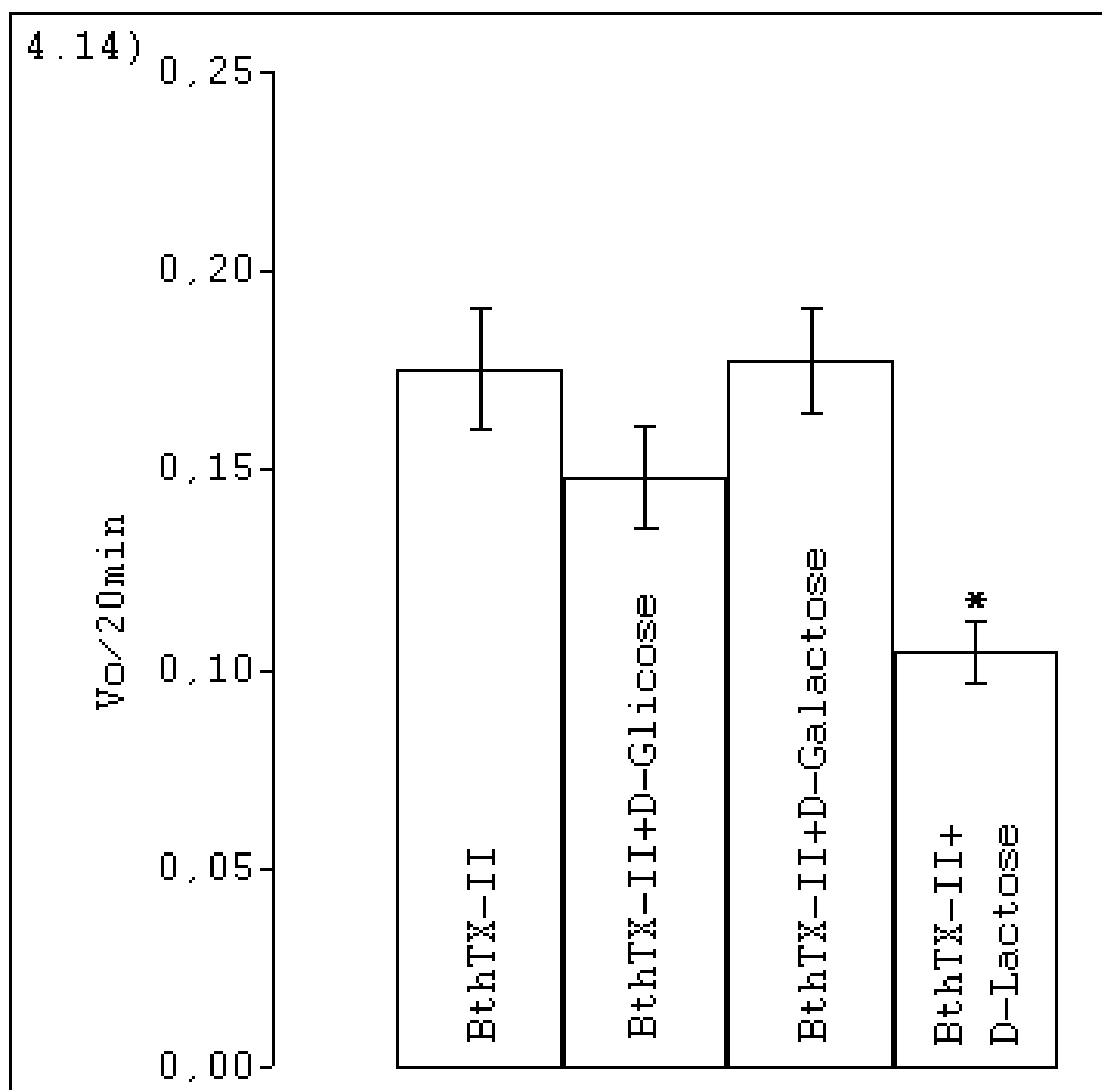
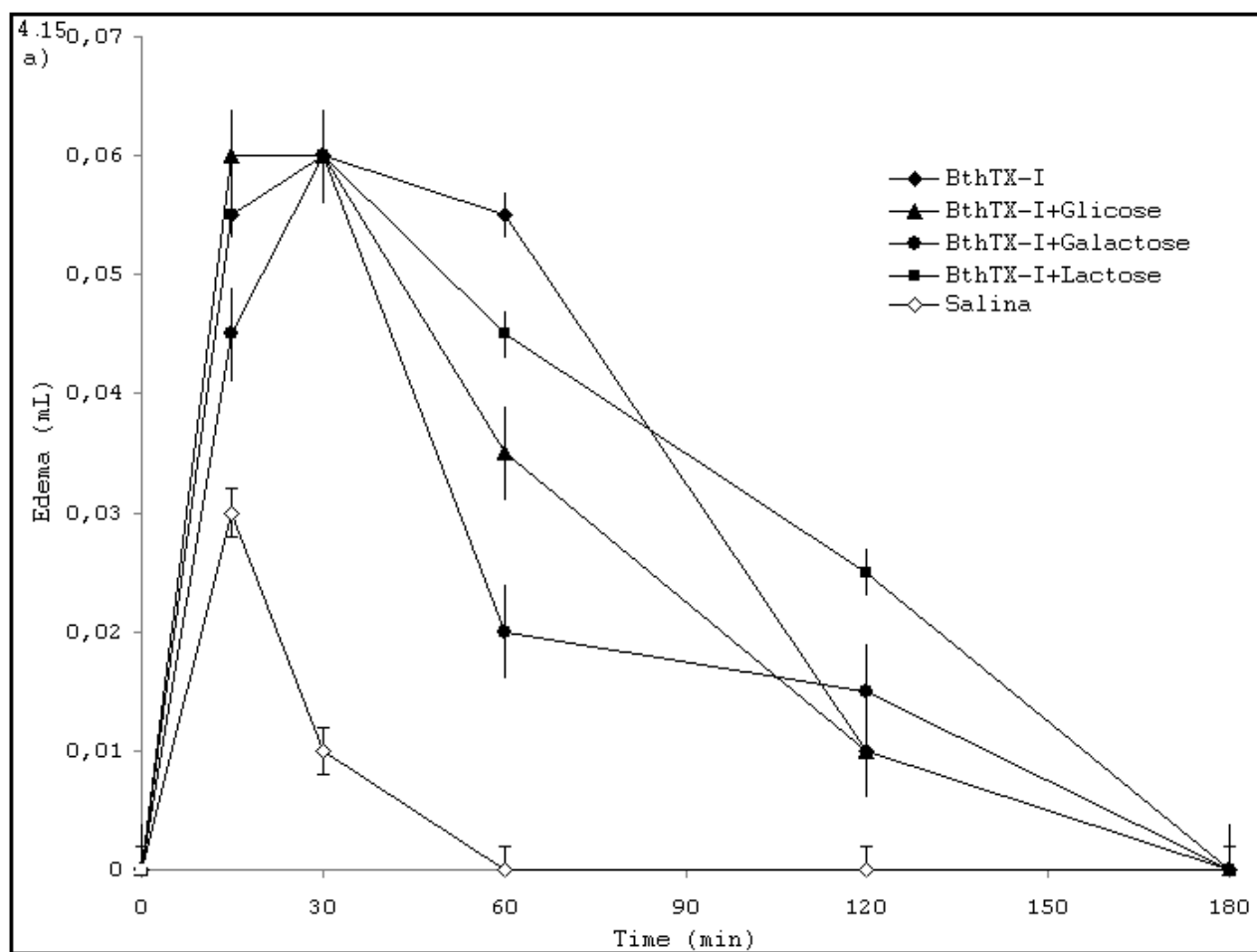


Figura 4.14) Atividade Enzimática da BthTX-II, nativa ou glicada

A PLA₂ de BthTX-II apresentou aos 20 minutos de reação, Vo de $0,1756 \pm 0,0149$ moles, enquanto a PLA₂ glicada a D-Glicose apresentou atividade diminuída de $0,1482 \pm 0,0129$ moles assim como a PLA₂ glicada a D-Lactose com $0,1043 \pm 0,0076$ moles. No entanto a PLA₂ glicada a D-Galactose apresentou atividade de $0,1778 \pm 0,0134$ moles, muito similar a PLA₂ nativa. A PLA₂ glicada a D-Lactose diminuiu significativamente a atividade enzimática da PLA₂ nativa (n=3).

A BthTX-I nativa induziu um edema significante com efeito máximo observado aos 30 minutos depois da injeção da proteína, que diminuiu rapidamente aos 120 minutos (Figura 4.15a). As PLA₂ glicadas com D-Glicose e D-Galactose diminuíram significativamente o edema induzido pela PLA₂ não glicada (Figura 4.15b).



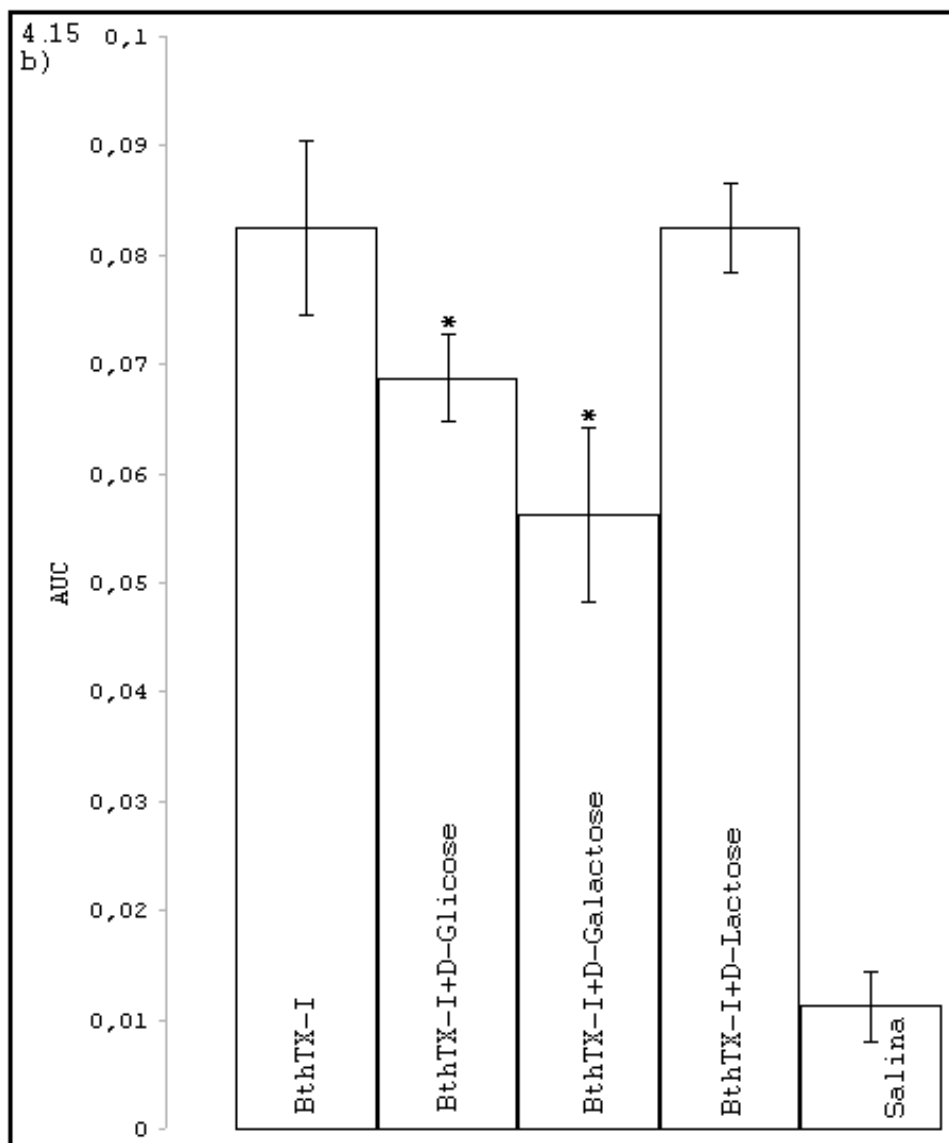
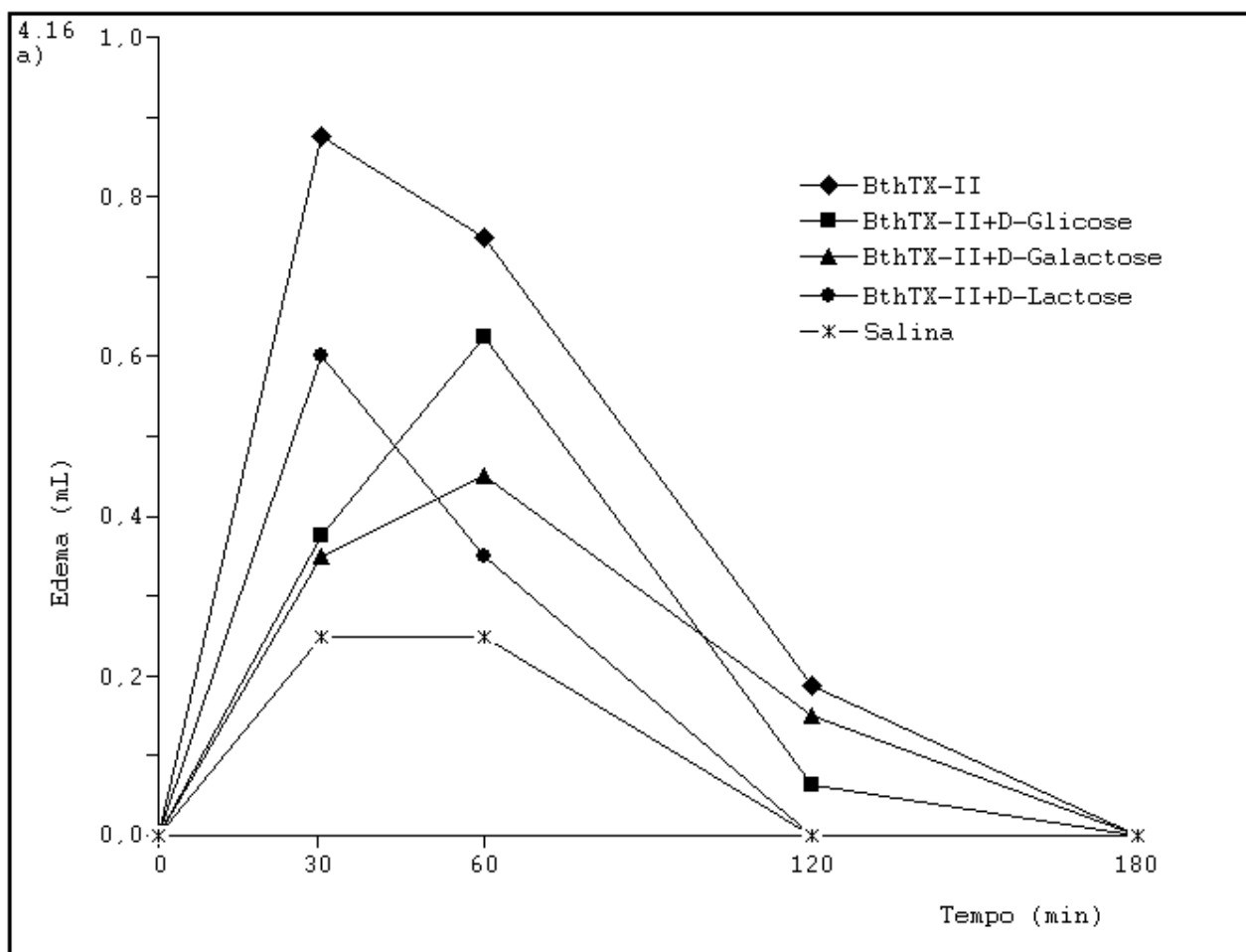


Figura 4.15) Edema induzido pela BthTX-I, nativa ou glicada.

a) O máximo edema induzido pela PLA2 nativa ocorreu aos 30 minutos após injeção da amostra.

b) O edema total foi calculado pela Área sobre a Curva (AUC). A PLA2 nativa apresentou edema de $0,0825 \pm 0,0230$ a PLA2 sujeita a glicação com D-Galactose $0,0562 \pm 0,0185$, a PLA2 glicada a D-Glicose $0,0687 \pm 0,0109$ e a PLA2 glicada a D-Lactose $0,0825 \pm 0,0141$, a Salina $0,0112 \pm 0,0032$. Pode-se verificar que o edema foi diminuído significativamente pelas PLA2 glicadas a D-Glicose e D-Galactose quando comparadas a PLA2 nativa (n=5).

A BthTX-II induziu edema com efeito máximo observado aos 30 minutos depois da injeção da proteína, que diminuiu rapidamente aos 120 minutos (Figura 4.16a). Todas as PLA₂ glicadas diminuíram significativamente o edema induzido pela PLA₂ nativa (Figura 4.16b).



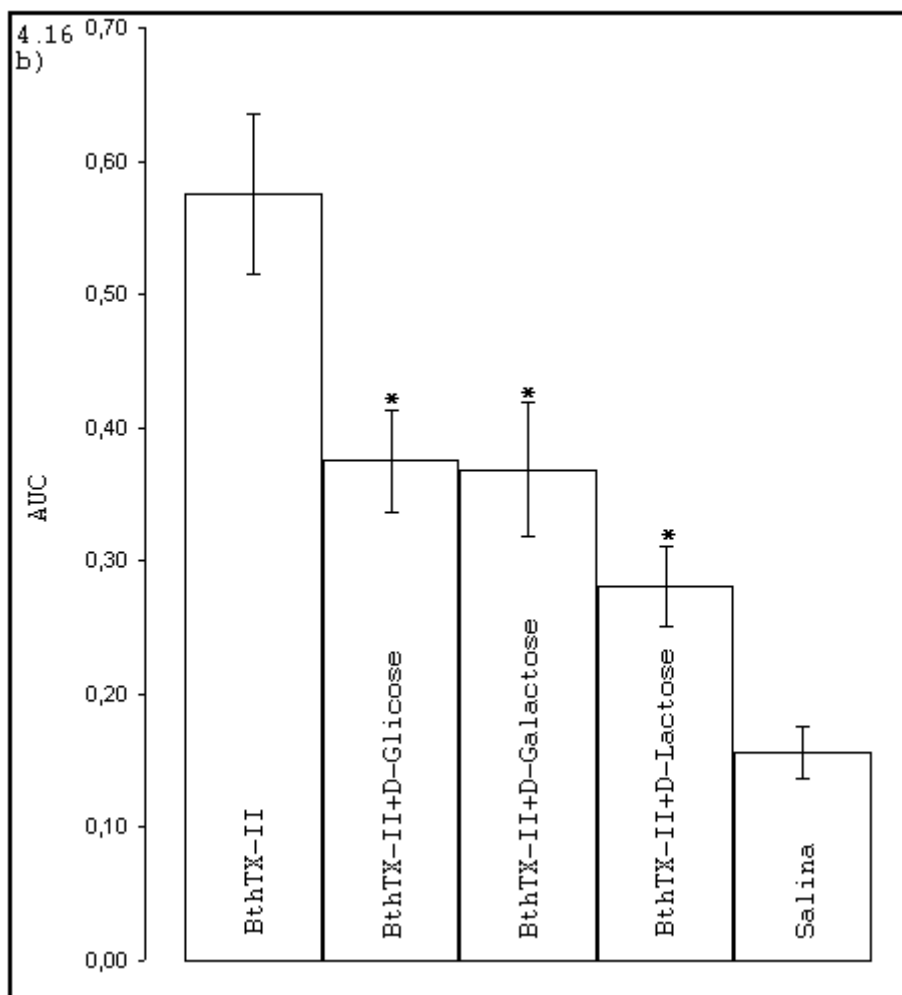


Figura 4.16) Edema induzido pela BthTX-II, nativa ou glicada.

a) O máximo edema induzido pela PLA2 nativa ocorreu aos 30 minutos após injeção da amostra. Todas as PLA2 glicadas diminuíram o máximo edema, as PLA2 glicadas a D-Glicose e D-Galactose apresentaram deslocamento do máximo edema para 60 minutos. **b)** O edema total foi calculado pela Área sobre a Curva (AUC). A PLA2 nativa apresentou edema de $0,5754 \pm 0,0641$ a PLA2 sujeita a glicação com D-Galactose $0,3688 \pm 0,0500$, a PLA2 glicada a D-Glicose $0,3750 \pm 0,0378$ e a PLA2 glicada a D-Lactose $0,2831 \pm 0,0296$, a Salina $0,1563 \pm 0,0267$. Pode-se verificar que o edema foi diminuído significativamente pelas PLA2 glicadas quando comparadas a PLA2 nativa (n=5).

A atividade da creatina kinase plasmática (CK) foi mensurada e a BthTX-I apresentou alta atividade miotóxica de 97,34 UL/min, enquanto a proteína glicada com D-Glicose, D-Galactose ou D-Lactose apresentou atividade de, respectivamente, 79,69 UL/min, 57,20 UL/min e 72,60 UL/min (Figura 4.17). A BthTX-II nativa e a glicada com D-Glicose, D-Galactose e D-Lactose, apresentaram, respectivamente, 1112,523 UL/min, 786,774 UL/min, 772,233 UL/min e 1193,263 UL/min (Figura 4.18).

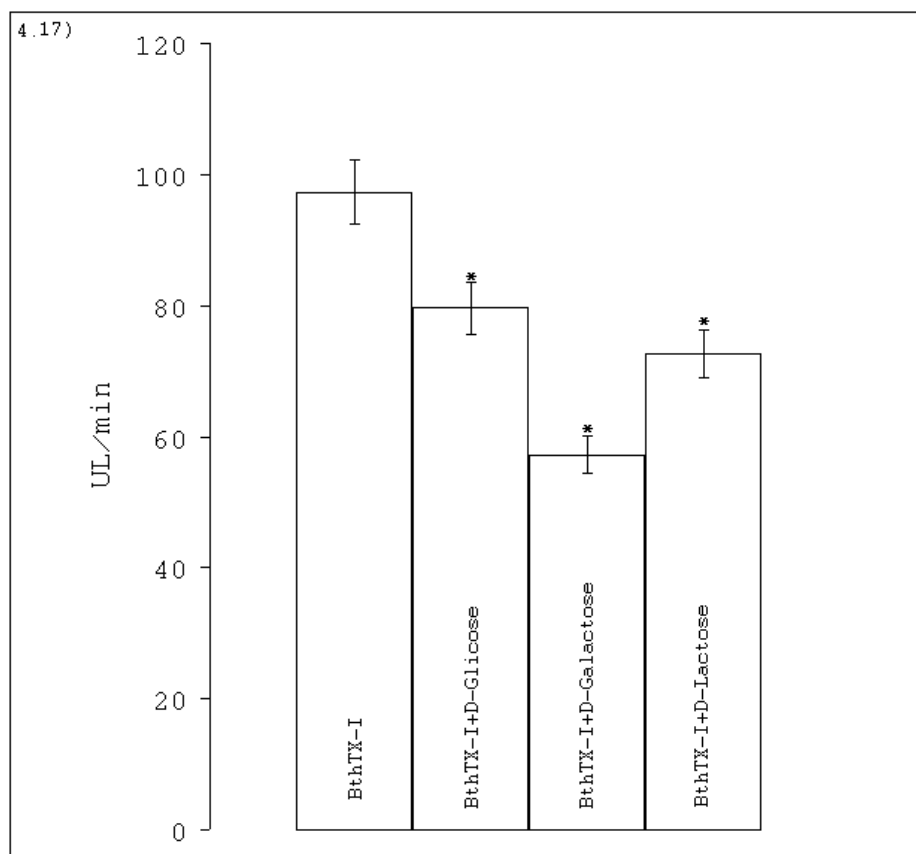


Figura 4.17) Atividade miotóxica da PLA2 de BthTX-I, nativa e glicada

A PLA2 nativa apresentou efeito miotóxico de $97,34 \pm 43,99$ UL/min, a PLA2 glicada a D-Lactose diminuiu o efeito com $72,60 \pm 33,19$ UL/min, a PLA2 sujeita a glicação com D-Galactose apresentou efeito de $57,20 \pm 21,79$ UL/min e a PLA2 glicada a D-Glicose $79,69 \pm 27,93$ UL/min. Todas as PLA2 glicadas diminuíram significativamente a miotoxicidade da PLA2 nativa (n=5).

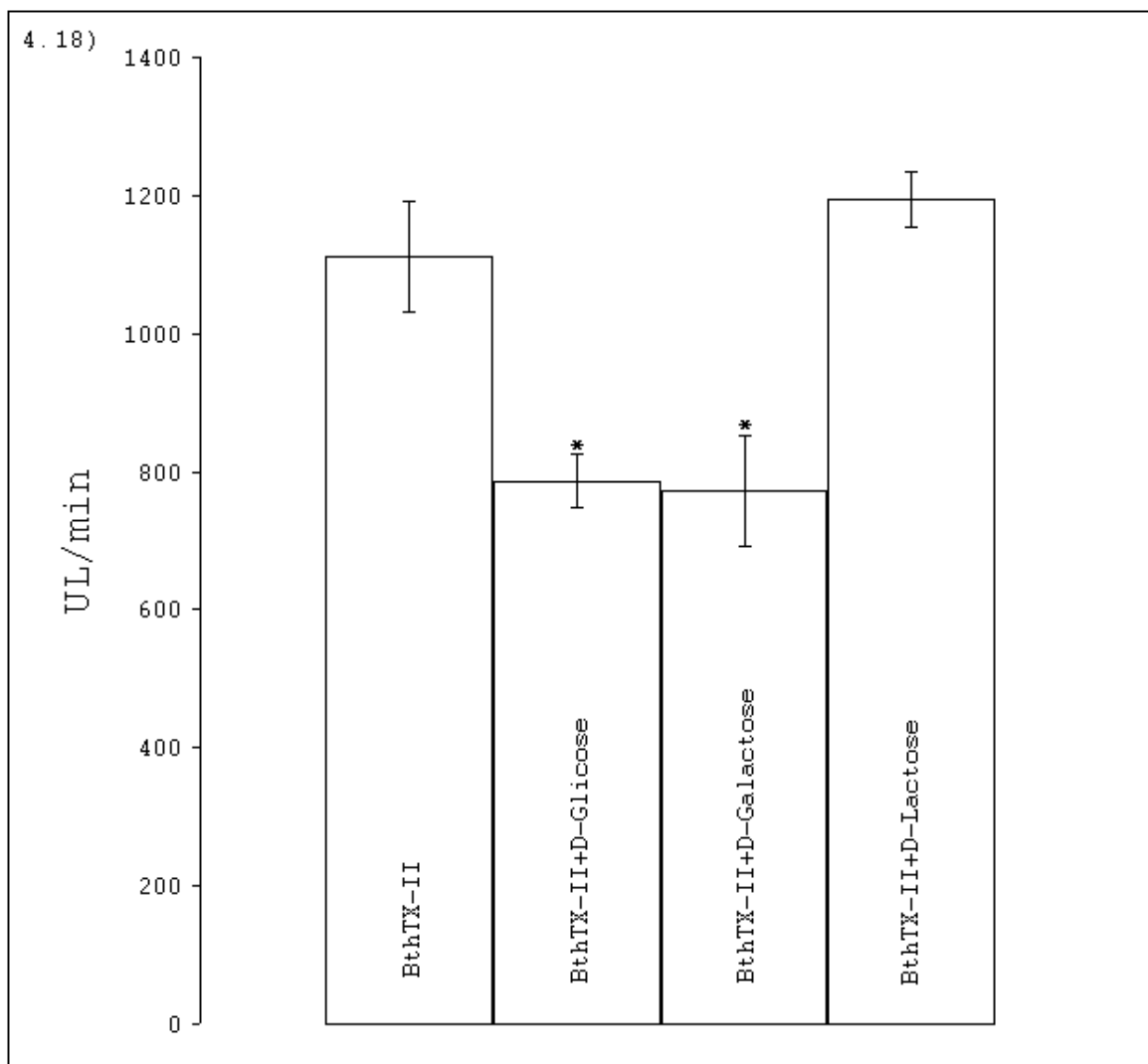


Figura 4.18) Atividade miotóxica da PLA2 de BthTX-II, nativa e glicada

A PLA2 nativa apresentou forte efeito miotóxico de $1112,523 \pm 251,1479$ UL/min, a PLA2 glicada a D-Lactose diminuiu o efeito com $1193,263 \pm 242,8621$ UL/min, a PLA2 sujeita a glicação com D-Galactose apresentou efeito de $786,774 \pm 201,8294$ UL/min e a PLA2 glicada a D-Glicose $772,233 \pm 230,1029$ UL/min. As PLA2 glicadas a D-Galactose e D-Glicose diminuíram significativamente a miotoxicidade da PLA2 nativa (n=5).

As amostras de BthTX-I e BthTX-II foram submetidas ao experimento de fluorescência intrínseca para análise da estrutura terciária da proteína. A BthTX-I apresentou mudança na estrutura quando glicada com carboidratos (Figura 4.19).

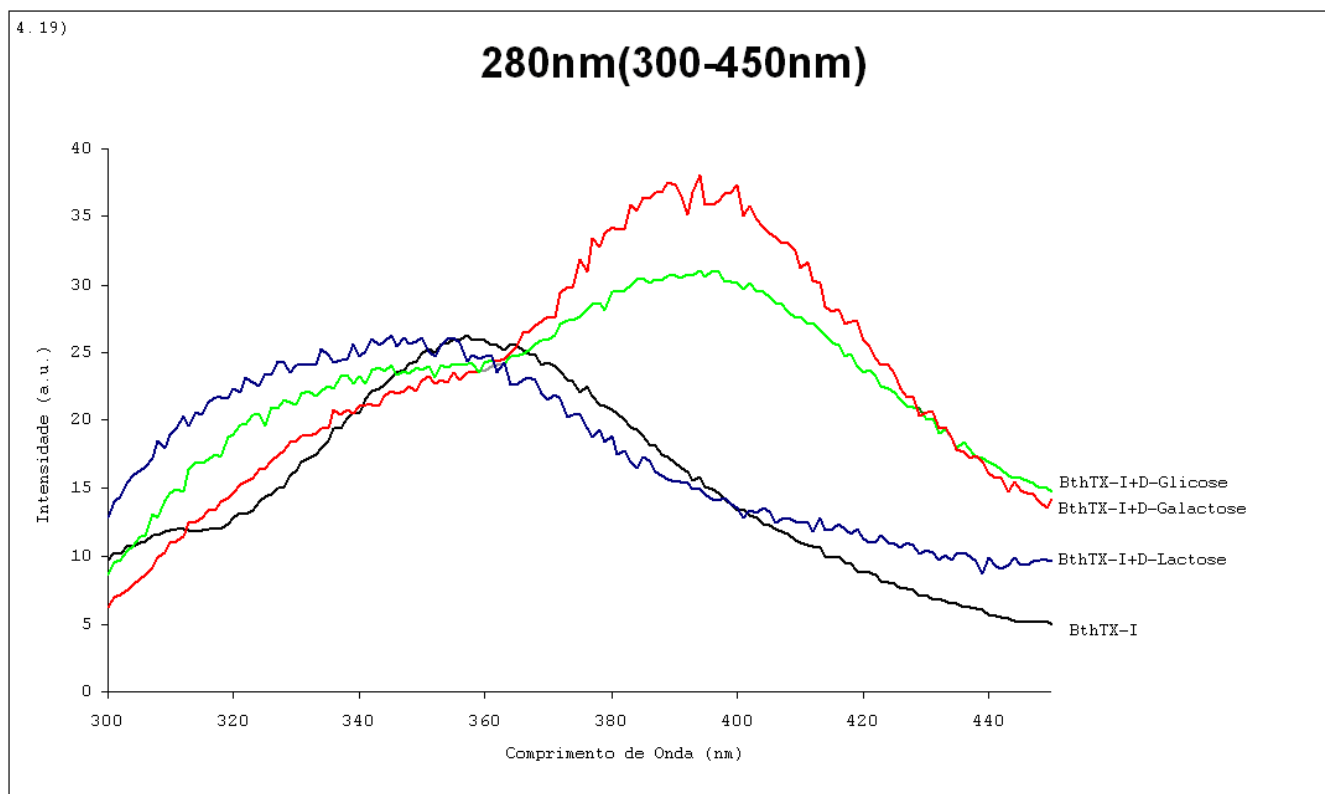


Figura 4.19) Fluorescência Intrínseca da PLA2 BthTX-I

Os espectros de emissão de fluorescência da BthTX-I nativa e glicadas apresentaram grande diferença sugerindo mudanças conformacionais da PLA2 em nível de estrutura terciária pelos carboidratos.

De forma semelhante, BthTX-II também apresentou mudança na estrutura quando glicada com carboidratos (Figura 4.20).

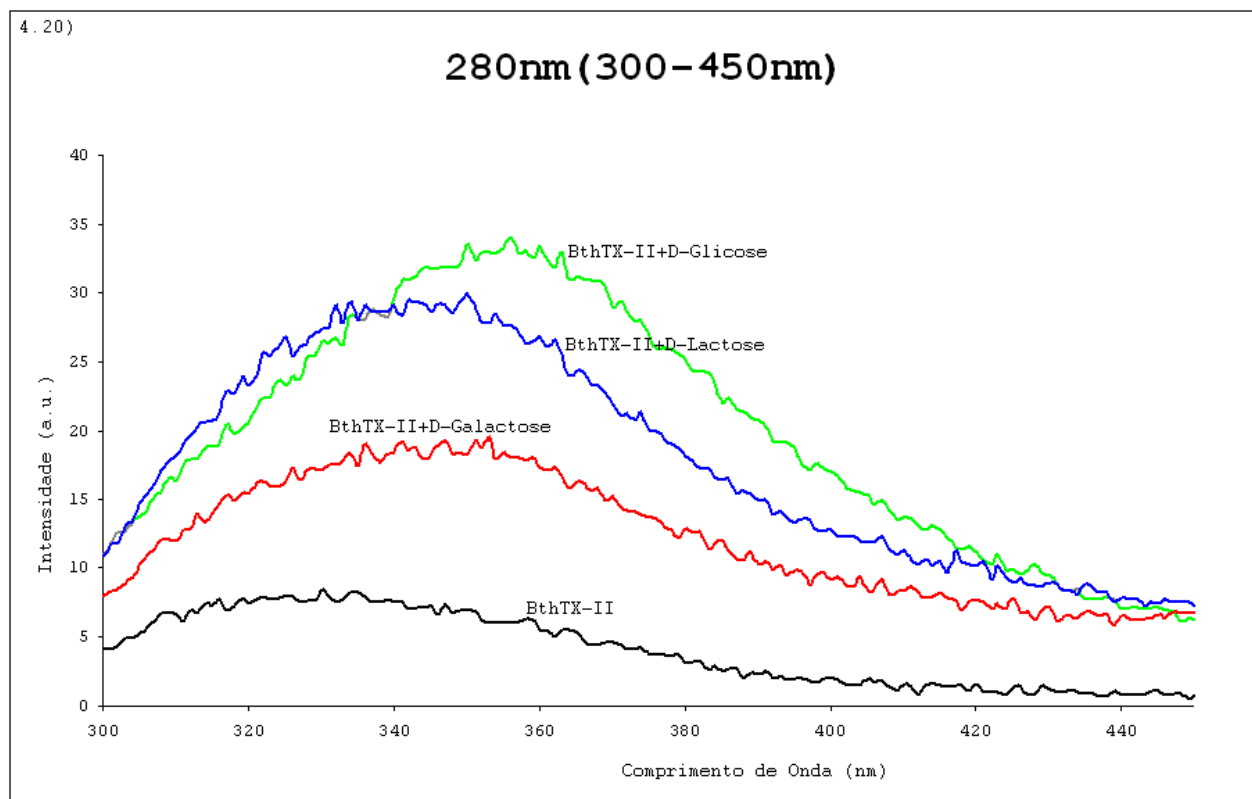


Figura 4.20) Fluorescência Intrínseca da PLA2 BthTX-II

Os espectros de emissão de fluorescência da BthTX-II nativa e glicadas apresentaram grande diferença sugerindo mudanças conformacionais da PLA2 em nível de estrutura terciária pelos carboidratos.

5. Discussão

Maillard foi o primeiro a relatar a associação entre o aumento da taxa de carboidratos e a condensação não enzimáticas de carboidratos simples com os grupos amino livre de proteínas, envolvendo os resíduos de lisina e arginina (Maillard, 1912). Durante muito tempo a glicação foi e ainda é objeto de estudo na indústria de alimentos, contudo, esse assunto também têm sido estudado extensivamente por outro prisma: observou-se que a glicosilação não enzimática de proteínas também ocorre em pacientes diabéticos (Holmquist e Schroeder, 1966). Um conceito mais geral foi descrito devido a evolução nos conhecimentos nesta área: a glicação é qualquer reação de ligação de carboidratos, de forma não enzimática, a uma proteína (Roth, 1983), de forma irreversível, formando os AGEs (Produtos finais da glicação avançada) (Grillo e Colombatto, 2008; Westwood et al, 1997).

Sua relevância em condições patológicas se deve por estar associada a complicações crônicas, já que a glicação pode afetar uma enormidade de proteínas, desde de proteínas estruturais, como o colágeno, até proteínas transportadoras e determinadas enzimas, que, devido presença de glicose ou outros carboidratos redutores, podem sofrer alterações significantes em sua atividade enzimática, modificando os parâmetros de V_{max} e K_m . O significado clínico da glicação de proteínas *in vivo* tem sido descrita: a caracterização das proteínas glicadas presentes em depósitos de β -amilóide e doença de Alzheimer (Vitek et al, 1994; Yan et al, 1994), AGEs em corpos de Lewy na doença de Parkinson (Castellani et al, 1996), em depósitos de amilóide na Polineuropatia amiloidótica familiar (Gomes et al, 2005) e na esclerose lateral amiloidótica (Shibata et al, 2002). Em todas essas patologias

amilóides, a estrutura de folha- β das fibrilas sugerem um possível papel da glicação na formação dos amilóides e sua patogênese.

Na *diabetes mellitus*, a hiperglicemia decorrente da ausência ou da baixa secreção de insulina, ou ainda, da resistência à mesma, é responsável por inúmeros efeitos sobre as células e seus constituintes. Estes processos estão relacionados à produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e a formação de AGEs, que contribuem para a modificação irreversível de proteínas, DNA e lipídios. Desta maneira, a hiperglicemia pode promover sérios danos celulares, induzindo precocemente morte celular.

As PLA2 são moléculas que desempenham um papel central no processo inflamatório, gerando o ácido araquidônico e o lisofosfolipídio (PAF). As PLA2 de venenos tem sido caracterizados como excelentes modelos para o estudo de PLA2. As PLA2 de Cdc10, BthTX-I e BthTX-II são proteínas básicas conhecidas, com massa molecular de aproximadamente 14 kDa (Toyama et al, 2005; Bonfim et al, 2009) e aproximadamente 120 aminoácidos (Cintra et al, 1993; Toyama et al, 2005).

A atividade enzimática de Cdc10 apresentou um comportamento alostérico contra substrato não micelar, como já mostrado por Ponce-Soto et al, 2002. A transição de um simples monômero para homodímero tem sido caracterizada como importante para aumento da atividade enzimática da PLA2 (Toyama et al, 2003), a PLA2 glicada a D-Lactose apresentou no SDS-PAGE presença de homodímeros, o que provavelmente aumentou sua atividade enzimática. Esse aumento da atividade enzimática da PLA2 de Cdc10 glicada a D-Glicose e D-Lactose sugere que a presença de carboidratos na estrutura da PLA2 aumenta a afinidade da enzima pelo substrato 4N3OBA consequentemente aumentando sua capacidade enzimática para catálise do substrato. O K_m de enzima é específico e característico para cada tipo de enzima. Para um

determinado substrato, variações bruscas do K_m podem sugerir perda da especificidade da enzima por este substrato e o aumento de V_{max} sugere fortemente um descontrole da atividade enzimática.

A atividade enzimática alostérica de BthTX-II não foi aumentada pelos carboidratos, pelo contrário, a catálise diminuiu. A dimerização da BthTX-II é a conformação mais comum desta PLA₂, pois estabiliza os contatos hidrofóbicos e pode aumentar sua atividade enzimática (Bonfim et al, 2001). Possivelmente BthTX-II sofre influência dos carboidratos na transição de homodímero para monômero, o que diminui sua atividade enzimática, como foi mostrado pelos resultados.

Por um longo tempo, acreditou-se que a hidrólise dos fosfolipídeos celulares eram causados pelas PLA₂ através de seus efeitos biológicos, mas as tentativas de correlacionar esses efeitos com a atividade catalítica foram infrutíferas (Kini e Evans, 1989). No entanto, apesar da atividade catalítica de BthTX-II ter sido diminuída, a PLA₂ glicada a D-Glicose, D-Galactose e D-Lactose diminuíram significativamente o edema da PLA₂ nativa. Adicionalmente, Cdcogli, que obteve aumento de sua atividade enzimática quando glicada, obteve o mesmo resultado quanto seu efeito edematogênico, ou seja, aumento da indução do edema quando glicada. A BthTX-I apresentou edema diminuído de forma significativa quando glicada a D-Glicose e D-Galactose.

O experimento de miotoxicidade mostrou que BthTx-II possui efeito biológico superior quando comparado com o efeito causado pela BthTx-I e por Cdcogli. Todas as PLA₂ glicadas apresentaram atividade miotóxica diminuída ou igual em comparação a sua correspondente nativa. Alguns autores sugerem que a ligação da PLA₂ ao receptor na membrana celular não é a única causa determinante da miotoxicidade, mas é um fator realmente importante (Mebs e Ownby, 1990). Possivelmente os carboidratos glicados as

PLA2 estão diminuindo sua afinidade aos receptores de membrana, o que explica a diminuição da atividade miotóxica pelas PLA2 glicadas. Tal resultado converge para a atividade citotóxica da PLA2 de Cdc10, cujo efeito é anulado pela glicação aos carboidratos.

Os resultados de miotoxicidade e citotoxicidade sugerem que, apesar da influência dos carboidratos na atividade enzimática, o sítio biológico da proteína também é modificado mesmo estando em região distinta do sítio catalítico (Kini e Evans, 1989). No entanto, podemos observar que o efeito edematogênico da BthTx-II e Cdc10 estão de acordo com os resultados de sua atividade enzimática. Existe controvérsias com relação a atividade catalítica dos venenos associada a eventos como a mionecrose e atividades hidrolíticas do veneno de serpentes. Em relação a tal fato, os resultados obtidos sugeriram que a miotoxicidade induzida por Cdc10 não é causada pela atividade enzimática da PLA2, pois esse efeito é similar ao encontrado pela heparina, um carboidrato complexo, incubada com PLA2 de Cdc10 (Toyama et al, 2005). Tanto a heparina quanto esses carboidratos aumentam a atividade enzimática, sendo que a heparina é acidamente carregada, o que reage com aminoácidos de cargas positivas na PLA2, modificando o sítio biológico. Como a presença do domínio C-terminal básico é crucial para a mionecrose do veneno de serpentes e essa região aparece “livre” nos estudos de modelação da estrutura de Cdc10, é possível que D-Glicose e D-Lactose reajam com esses resíduos de aminoácidos.

Esses resultados de Cdc10 são reforçados pelo resultado de agregação plaquetária. A PLA2 do veneno de serpente pode induzir ou inibir (Lu et al, 2002) a agregação plaquetária, ou mesmo induzir ou prevenir essa agregação, dependendo da concentração usada (Iatridis et al, 1976). No entanto, nossos resultados mostraram que a PLA2 nativa

induziu uma agregação moderada. Na presença do ADP ou outros agonistas, como: epinefrina, trombina ou colágeno, a agregação plaquetária pode ser vista como ocorrendo em duas fases. Nessas condições as plaquetas mudam de forma criando pseudópodos, iniciando a primeira fase reversível da agregação. Com forte estímulo, a secreção plaquetária toma lugar com a liberação de grânulos plaquetários de proteínas e o recrutamento de plaquetas adicionais. Isso culmina na segunda fase irreversível da agregação (Leung et al, 1989). Nossos resultados claramente mostram que a PLA2 de *Crotalus durissus collilineatus* induz um longo período da fase inicial. Esse resultado é discrepante ao apresentado por Santoro et al (1999) com o veneno total, portanto, os resultados não apresentam a PLA2 como o agente coagulante principal do veneno. Os carboidratos D-Glicose e D-Galactose mostram influência no perfil de agregação mas não alteram a agregação plaquetária final induzida pela PLA2. Por outro lado, a D-Lactose, um dissacarídeo, influenciou em ambos os parâmetros. Algumas PLA2 cataliticamente inativas induzem forte agregação plaquetária, provando que o sítio biológico é importante para esse efeito (dos Santos et al, 2007). A ligação dos carboidratos na proteína provavelmente modificou sua estrutura e diminuiu seu efeito agregante, influenciando o perfil de agregação plaquetária, e no caso da D-Lactose, a agregação final também foi alterada. Aparentemente, esses carboidratos parecem estar envolvidos ao “loop” ligante de cálcio que fica exposto quando em monômero, sendo provável que essa região seja necessária para agregação plaquetária. Todos esses resultados sugerem que os carboidratos devem afetar de alguma forma o efeito biológico das PLA2, mas sua modulação não ocorre da mesma forma com a D-Glicose, D-Galactose ou D-Lactose.

A ausência de correlação direta entre a atividade catalítica e os efeitos biológicos levou a uma nova proposta de que as ações da PLA2 ocorrem devido à presença de sítios

biológicos na superfície da proteína que estão separados do sítio catalítico. Esses sítios biológicos permitiriam que a PLA2 se ligasse especificamente a proteínas solúveis ou proteínas de membrana que participam no mecanismo de ação da PLA2 (Jeng et al, 1978; Kini e Evans, 1987). Desde que essa hipótese foi proposta, várias proteínas de ligação começaram a ser identificadas para PLA2 de veneno de serpentes (Lambeau e Lazdunski, 1999; Stefansson et al, 1990; Sribar et al, 2003; Lizano et al, 2003). Estudos com PLA2 neurotóxica da serpente australiana *Oxyuranus cutellatus scutellatus* levaram à identificação de duas famílias de proteínas ligantes chamadas receptores tipo M e N (Lambeau e Lazdunski, 1999; Lambeau et al, 1989).

O receptor do tipo-M de várias espécies já foi clonado, inclusive o de humanos (Lambeau et al, 1994; Ishizaki et al, 1994; Ancian et al, 1995; Higashino et al, 1994). Esses receptores possuem um único domínio transmembrana, uma calda curta citoplasmática, e uma região grande extracelular com domínio rico em cisteína no N-terminal, um domínio tipo fibronectina-like II, e uma repetição de oito a dez domínios de reconhecimento de carboidratos (CRD) (Figura 5.1). Estudos diferentes de estrutura-função dessas proteínas têm sido feitos e indicam que: (1) os CRDs do receptor tipo-M é o elemento chave para a ligação da PLA2 (Nicolas et al, 1997); (2) resíduos próximos ao “loop” de Ca^{2+} da PLA2 estão envolvidos na ligação ao receptor tipo-M (Lambeau et al, 1995; Lambeau e Lazdunski, 1999; Valentin e Lambeau, 2000); (3) a ligação da PLA2 ao receptor leva a uma inibição da atividade catalítica (Ancian et al, 1995); (4) o receptor tipo-M possui propriedades endocitárias e rapidamente internaliza a PLA2 (Gelb et al, 1995).

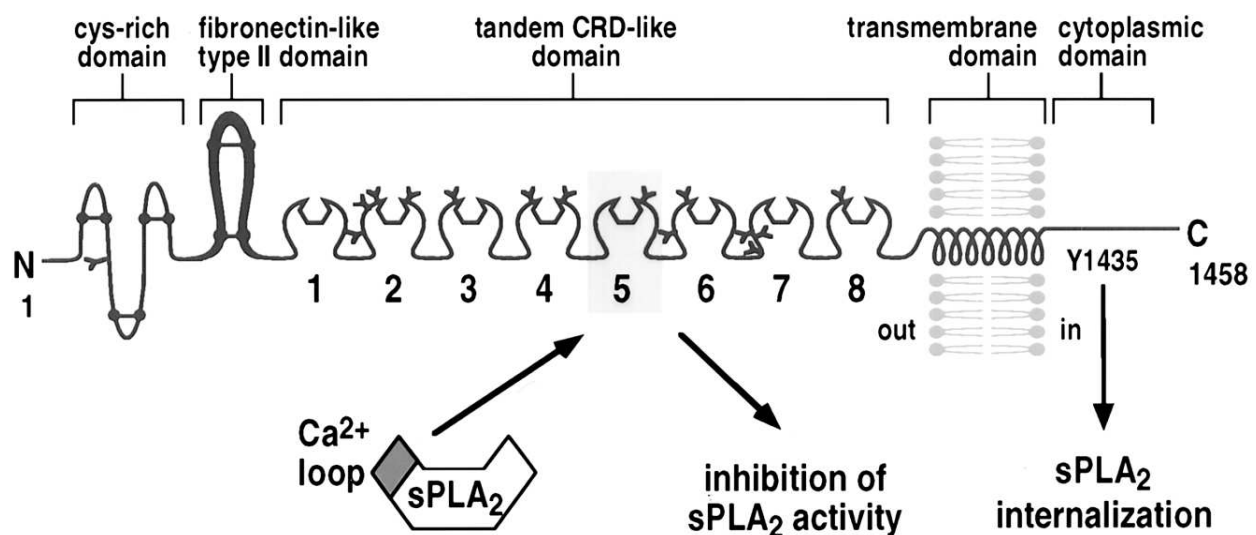


Figura 5.1) Esquema do receptor de sPLA₂, como a visualização do domínio de ligação da sPLA₂ (região 8-10 domínios de CDR) (Reproduzido de Valentin e Lambeau 2000).

O modelo estrutural da PLA₂ de Cdc10 sugere que o “loop” ligante ao cálcio aparece livre para fazer possível as interações moleculares com o receptor, no entanto, é possível que os carboidratos glicosilados à PLA₂ estejam interagindo com os domínios de reconhecimento de carboidratos, impossibilitando a ligação adequada da PLA₂ ao receptor, diminuindo o efeito biológico. No caso do domínio C-terminal, onde está os aminoácidos carregados positivamente, responsáveis pela mionecrose, aparecem expostos ao ambiente molecular.

A estrutura de BthTX-I e BthTX-II também sofreu mudanças após a glicação, isso está evidente nos resultados encontrados na fluorescência; na fluorescência intrínseca podemos analisar a estrutura terciária das PLA₂, já que o triptofano que é detectado entre 330nm-350nm apresentou mudança no perfil, que representa se o aminoácido está mais exposto ou não dentro da proteína, quanto mais exposto maior a fluorescência intrínseca.

Análises estruturais de PLA2 sugerem que o *loop* ligante ao cálcio e o domínio da região C-terminal são regiões topográficas importantes para sua atividade biológica (Toyama et al, 2005; Oliveira et al, 2008). Como o dicroísmo circular de Cdc19 mostra, há mudança em sua estrutura. Essa mudança estrutural que ocorrem em todas as PLA2 testadas está influenciando a interação da PLA2 ao receptor, modificando suas atividades biológicas.

Alguns estudos mostraram que monossacarídeos podem reagir com resíduos de aminoácidos de PLA2, carregados positivamente. Por causa da presença desses aminoácidos básicos no domínio C-terminal das PLA2, acreditamos que os carboidratos estão glicando esta área importante. Há muito se sabe que carboidratos estão entre os constituintes orgânicos de venenos de serpentes, mas apesar desses venenos terem sido extensivamente estudados e sua constituição estar bem estabelecida, a função dessas moléculas ainda não foi compreendida sendo uma área de estudo negligenciada.

A análise do veneno de *Crotalus durissus collilineatus* mostra a presença de hexoses neutras (Santoro et al, 1999). Nos últimos anos a relação da PLA2 com carboidratos, simples ou complexos, tem sido estudada: a estrutura de um cristal de duas moléculas de PLA2 do veneno da serpente de Krait (*Bungarus caeruleus*), e duas manoses, foi induzida (Singh et al, 2005). A presença de outros carboidratos foram observados no cristal de PLA2 de *Naja naja sagittifera*. O N-acetilglucosamina foi encontrado num sítio de ligação ao substrato (Jabeen et al, 2006). Em ambos os cristais os carboidratos estabilizaram a estrutura de homodímero das PLA2. Isso sugere que não somente o carboidrato é importante para preservar a enzima no veneno por um longo período, como participa no número de interações com a enzima e demonstra o potencial de

reconhecimento de carboidratos da PLA2. Desse modo, podemos pensar nos carboidratos como moduladores potenciais da PLA2.

6. Conclusão

Os resultados apresentados sugerem que a glicação de Cdc19 a D-Glicose e D-Lactose aumenta a afinidade da enzima pelo substrato, aumentando sua atividade enzimática; a atividade enzimática de BthTX-II foi diminuída pelos carboidratos, possivelmente a PLA2 sofre influência dos carboidratos na transição de homodímero para monômero, o que diminui sua atividade enzimática. Os efeitos biológicos das PLA2 foram diminuídos, com exceção do efeito edematogênico da Cdc19 que foi aumentado de forma semelhante a uma inflamação crônica. As PLA2s interagem com o receptor do tipo-M, no entanto, é possível que os carboidratos glicosilados à PLA2 estejam interagindo com os domínios de reconhecimento de carboidratos presentes no receptor, impossibilitando a ligação adequada da PLA2, diminuindo seu efeito biológico. As estruturas terciárias de BthTX-I e BthTX-II sofreram mudanças após a glicação, isso está evidente nos resultados encontrados na fluorescência. O dicroísmo circular de Cdc19 mostra que há mudança em sua estrutura secundária. A mudança estrutural que ocorre em todas as PLA2 testadas está influenciando a interação da PLA2 ao receptor, modificando suas atividades biológicas. Os carboidratos participam em interações com a enzima e demonstram o potencial de reconhecimento de carboidratos da PLA2. Os carboidratos podem ser moduladores potenciais da PLA2.

7. Referências Bibliográficas

Aeschbacher HU, Finot PA, Hurrel RF, Liardon R: **Anticarcinogenic effect of browning reaction products. In: *The Maillard Reaction in Food Processing, Human Nutrition and Physiology***. Basel, Switzerland; 1990.

Agranoff D, Monahan I, Mangan J, Butcher P, Krishna S: **Mycobacterium tuberculosis expresses a novel pH-dependent divalent cation transporter belonging to the Nramp family.** *J Exp Med* 1999, **190**(5):717-724.

Ancian P, Lambeau G, Lazdunski M: **Multifunctional activity of the extracellular domain of the M-type (180 kDa) membrane receptor for secretory phospholipases A₂.** *Biochemistry* 1995, **34**(40):13146-13151.

Argirova M, Breipohl W: **Glycated proteins can enhance photooxidative stress in aged and diabetic lenses.** *Free Radic Res* 2002, **36**(12):1251-1259.

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

Beswick H, Harding J: **High-molecular-weight crystallin aggregate formation resulting from non-enzymic carbamylation of lens crystallins: relevance to cataract formation.** *Exp Eye Res* 1987, **45**(4):569-578.

Bitensky M, Kowluru A, Kowluru R: **Non-enzymatic glycation and protein recognition.** *Prog Clin Biol Res* 1989, **304**:185-203.

Bon C, Changeux J, Jeng T, Fraenkel-Conrat H: **Postsynaptic effects of crotoxin and of its isolated subunits.** *Eur J Biochem* 1979, **99**(3):471-481.

Bonfim V, de Carvalho D, Ponce-Soto L, Kassab B, Marangoni S: **Toxicity of phospholipases A(2) D49 (6-1 and 6-2) and K49 (Bj-VII) from *Bothrops jararacussu* venom.** *Cell Biol. and Toxic.* 2009:523-532.

Bonfim V, Toyama M, Novello J, Hyslop S, Oliveira C, Rodrigues-Simioni L, Marangoni S: **Isolation and enzymatic characterization of a basic phospholipase A2 from *Bothrops jararacussu* snake venom.** *J Protein Chem* 2001, **20**(3):239-245.

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

- Burke JE, Dennis EA: **Phospholipase A2 structure/function, mechanism, and signaling.** *J Lipid Res* 2009, **50**:237-242.
- Castellani R, Smith M, Richey P, Perry G: **Glycoxidation and oxidative stress in Parkinson disease and diffuse Lewy body disease.** *Brain Res* 1996, **737**(1-2):195-200.
- Chuyen N, Ijichi K, Umetsu H, Moteki K: **Antioxidative properties of products from amino acids or peptides in the reaction with glucose.** *Adv Exp Med Biol* 1998, **434**:201-212.
- Cintra A, Marangoni S, Oliveira B, Giglio J: **Bothropstoxin-I: amino acid sequence and function.** *J Protein Chem* 1993, **12**(1):57-64.
- Corrêa DHA, Ramos CHI: **The use of circular dichroism spectroscopy to study protein folding, form and function.** In: *Afri. J. of Biochem. Res.* 2009 (3): 164-173.
- Cupo P, Azevedo-Marques M, Hering S: **Clinical and laboratory features of South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*) envenomation in children.** *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1988, **82**(6):924-929.

D'Auria S: **Fluorescence of proteins - Editorial overview.** *J. of Fluoresc.* 2003:1-1.

Dandona P, Aljada A: **A rational approach to pathogenesis and treatment of type 2 diabetes mellitus, insulin resistance, inflammation, and atherosclerosis.** *Am J Cardiol* 2002, **90**(5A):27G-33G.

Dandona P, Aljada A, Bandyopadhyay A: **Inflammation: the link between insulin resistance, obesity and diabetes.** *Trends Immunol* 2004, **25**(1):4-7.

Dandona P, Chaudhuri A, Ghanim H, Mohanty P: **Proinflammatory effects of glucose and anti-inflammatory effect of insulin: relevance to cardiovascular disease.** *Am J Cardiol* 2007, **99**(4A):15B-26B.

Darewicz M, Dziuba J, Mioduszevska H: **Some physico-chemical properties and structural changes of bovine beta-casein upon glycation.** *Nahrung-Food* 1998:213-214.

de Araujo H, White S, Ownby C: **Sequence analysis of Lys49 phospholipase A2 myotoxins: a highly conserved class of proteins.** *Toxicon* 1996, **34**(11-12):1237-1242.

Dennis E: **Diversity of group types, regulation, and function of phospholipase A2.** *J Biol Chem* 1994, **269**(18):13057-13060.

dos Santos J, Marchi-Salvador D, Fernandes C, Silveira L, Soares A, Fontes M: **Preliminary X-ray crystallographic studies of a Lys49-phospholipase A(2) homologue from *Bothrops pirajai* venom complexed with p-bromophenacyl bromide and alpha-tocopherol inhibitors.** *Protein and Peptide Letters* 2007:698-701.

Farooqui A, Horrocks L: **Brain phospholipases A2: a perspective on the history.** *Prostag. Leu. Essent Fat. Acids* 2004, **71**(3):161-169.

Gambero A, Landucci E, Toyama M, Marangoni S, Giglio J, Nader H, Dietrich C, De Nucci G, Antunes E: **Human neutrophil migration in vitro induced by secretory phospholipases A2: a role for cell surface glycosaminoglycans.** *Biochem Pharmacol* 2002, **63**(1):65-72.

Gelb M, Jain M, Hanel A, Berg O: **Interfacial enzymology of glycerolipid hydrolases: lessons from secreted phospholipases A₂**. *Annu Rev Biochem* 1995, **64**:653-688.

Gomes R, Sousa Silva M, Vicente Miranda H, Ferreira A, Cordeiro C, Freire A: **Protein glycation in *Saccharomyces cerevisiae*. Argpyrimidine formation and methylglyoxal catabolism**. *FEBS J* 2005, **272**(17):4521-4531.

Gopalakrishnakone P, Hawgood B, Theakston R: **Specificity of antibodies to the reconstituted crotoxin complex, from the venom of South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*), using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and double immunodiffusion**. *Toxicon* 1981, **19**(1):131-139.

Granger D, Kubes P: **The microcirculation and inflammation: modulation of leukocyte-endothelial cell adhesion**. *J Leukoc Biol* 1994, **55**(5):662-675.

Grillo M, Colombatto S: **Advanced glycation end-products (AGEs): involvement in aging and in neurodegenerative diseases**. *Amino Acids* 2008, **35**(1):29-36.

Gutiérrez J, Lomonte B: **Phospholipase A2 myotoxins from *Bothrops* snake venoms.** *Toxicon* 1995, **33**(11):1405-1424.

Harris L, Franson R: **[1-14C]oleate-labeled autoclaved yeast: a membranous substrate for measuring phospholipase A2 activity in vitro.** *Anal Biochem* 1991, **193**(2):191-196.

Hawgood B, Santana de Sa S: **Changes in spontaneous and evoked release of transmitter induced by the crotoxin complex and its component phospholipase A2 at the frog neuromuscular junction.** *Neuroscience* 1979, **4**(2):293-303.

Higashino K, Ishizaki J, Kishino J, Ohara O, Arita H: **Structural comparison of phospholipase-A2-binding regions in phospholipase-A2 receptors from various mammals.** *Eur J Biochem* 1994, **225**(1):375-382.

Holmquist W, Schroeder W: **A new N-terminal blocking group involving a Schiff base in hemoglobin A1c.** *Biochemistry* 1966, **5**(8):2489-2503.

Holzer M, Mackessy S: **An aqueous endpoint assay of snake venom phospholipase A(2).** *Toxicon* 1996:1149-1155.

Hurrel RF, Finot PA, Aeschbacher HU, Hurrel RF, Liardon R: **Influence of the Maillard reaction on the nutritional value of foods.** In *The Maillard Reaction in Food Processing, Human Nutrition and Physiology*. Basel, Switzerland, 1990.

Iatridis S, Iatridis P, Markidou S, Ragatz B: **Inhibition of human platelet-aggregation by Phospholipase-A.** *Thr. Res.* 1976:335-344.

Iglesias C, Aparicio R, Rodrigues-Simioni L, Camargo E, Antunes E, Marangoni S, de Oliveira Toyama D, Beriam L, Monteiro H, Toyama M: **Effects of morin on snake venom phospholipase A2 (PLA2).** *Toxicon* 2005, **46**(7):751-758.

Ishizaki J, Hanasaki K, Higashino K, Kishino J, Kikuchi N, Ohara O, Arita H: **Molecular cloning of pancreatic group I phospholipase A2 receptor.** *J Biol Chem* 1994, **269**(8):5897-5904.

Jabeen T, Singh N, Singh R, Jasti J, Sharma S, Kaur P, Srinivasan A, Singh T: **Crystal structure of a heterodimer of phospholipase A2 from *Naja naja sagittifera* at 2.3 Å resolution reveals the presence of a new PLA2-like protein with a novel cys 32-Cys**

49 disulphide bridge with a bound sugar at the substrate-binding site. *Proteins* 2006, **62**(2):329-337.

Jeng T, Hendon R, Fraenkelconrat H: **Search for relationships among hemolytic, phospholipolytic, and neyrotoxic activities of snake-venoms.** *Proc. of the Nat. Ac. of Sc. of the USA* 1978:600-604.

Kato A, Minaki K, Kobayashi K: **Improvement of emulsifying properties of egg-white proteins by the attachment of polysaccharide through Maillard reaction in a dry state.** *J. of Agricult. and Food Chem.* 1993:540-543.

Kato Y, Aoki T, Kato N, Nakamura R, Matsuda T: **Modification of ovalbumin with glucose-6-phosphate by amino-carbonyl reaction – improvement of protein heat-stability and emulsifying activity.** *J. of Agricult. and Food Chem.* 1995:301-305.

Kicman A, Parkin M, Iles R: **An introduction to mass spectrometry based proteomics - Detection and characterization of gonadotropins and related molecules.** *Mol. and Cel. Endoc* 2007:212-227.

Kini RM: **Venom Phospholipase A2 Enzymes: Structure, Function and Mechanism.** Wiley, Chichester, England; 1997.

Kini R, Evans H: **Structure-function relationships of phospholipases. The anticoagulant region of phospholipases A2.** *J Biol Chem* 1987, **262**(30):14402-14407.

Kini R, Evans H: **A model to explain the pharmacological effects of snake venom phospholipases A2.** *Toxicon* 1989, **27**(6):613-635.

Kumar M, Reddy P, Kumar P, Surolia I, Reddy G: **Effect of dicarbonyl-induced browning on alpha-crystallin chaperone-like activity: physiological significance and caveats of in vitro aggregation assays.** *Biochem J* 2004, **379** (2):273-282.

Laemmli U: **Cleavage of structural proteins during assembly of head of bacteriophage-T4.** *Nature* 1970:680-&.

Lambeau G, Ancian P, Barhanin J, Lazdunski M: **Cloning and expression of a membrane receptor for secretory phospholipases A2.** *J Biol Chem* 1994, **269**(3):1575-1578.

Lambeau G, Ancian P, Nicolas J, Beiboer S, Moinier D, Verheij H, Lazdunski M: **Structural elements of secretory phospholipases A2**

involved in the binding to M-type receptors. *J Biol Chem* 1995,**270**(10):5534-5540.

Lambeau G, Barhanin J, Schweitz H, Qar J, Lazdunski M: **Identification and properties of very high-affinity brain membrane-binding sites for a neurotoxic phospholipase from the taipan venom.** *J. of Biolog. Chem.* 1989:11503-11510.

Lambeau G, Lazdunski M: **Receptors for a growing family of secreted phospholipases A(2).** *Trends in Pharmac Sc.* 1999:162-170.

Landucci E, Condino-Neto A, Perez A, Hyslop S, Corrado A, Novello J, Marangoni S, Oliveira B, Antunes E, de Nucci G: **Crotoxin induces aggregation of human washed platelets.** *Toxicon* 1994, **32**(2):217-226.

Lee S, Park H, Lee S, Choi M: **Melittin exerts multiple effects on the release of free fatty acids from L1210 cells: lack of selective activation of phospholipase A2 by melittin.** *Arch Biochem Biophys* 2001, **389**(1):57-67.

Leung L, Harpel P, Nachman R: **Platelet histidine-rich glycoprotein.** *Met. in Enzymol.* 1989:268-276.

Liang J, Rossi M: **In vitro non-enzymatic glycation and formation of browning products in the bovine lens alpha-crystallin.** *Exp Eye Res* 1990, **50**(4):367-371.

Lindahl M, Tagesson C: **Flavonoids as phospholipase A2 inhibitors: importance of their structure for selective inhibition of group II phospholipase A2.** *Inflammation* 1997, **21**(3):347-356.

Lizano S, Domont G, Perales J: **Natural phospholipase A(2) myotoxin inhibitor proteins from snakes, mammals and plants.** *Toxicon* 2003, **42**(8):963-977.

Lu Q, Wei Q, Jin Y, Wei J, Wang W, Xiong Y: **L-amino acid oxidase from *Trimeresurus jerdonii* snake venom: purification, characterization, platelet aggregation-inducing and antibacterial effects.** *J Nat Toxins* 2002, **11**(4):345-352.

Maillard L: **The action of amino acids on sugar; The formation of melanoidin by a methodic route.** *Comptes R. Hebdo. Des Seances De L Acad. Des Sc.* 1912:66-68.

Maraganore J, Merutka G, Cho W, Welches W, Kzdy F, Heinrikson R: **A new class of phospholipases A2 with lysine in place of aspartate**

49. Functional consequences for calcium and substrate binding. *J Biol Chem* 1984, **259**(22):13839-13843.

Matsudomi N, Inoue Y, Nakashima H, Kato A, Kobayashi K: **Emulsion stabilization by Maillard-Type covalent complex of plasma-protein with galactomannan.** *J.of Food Sc.*1995: 265.

Mebis D, Ownby C: **Myotoxic components of snake-venoms – their biochemical and biological activities.** *Pharmac. Therap.* 1990:223-236.

Monnier V, Glomb M, Elgawish A, Sell D: **The mechanism of collagen cross-linking in diabetes - A puzzle nearing resolution.** *Diabetes* 1996:S67-S72.

Murakami M, Kudo I: **Phospholipase A2.** *J Biochem* 2002, **131**(3):285-292.

Murakami M, Nakatani Y, Atsumi G, Inoue K, Kudo I: **Regulatory functions of phospholipase A2.** *Crit Rev Immunol* 1997, **17**(3-4):225-283.

Nicolas J, Lin Y, Lambeau G, Ghomashchi F, Lazdunski M, Gelb M: **Localization of structural elements of bee venom**

phospholipase A2 involved in N-type receptor binding and neurotoxicity. *J Biol Chem* 1997, **272**(11):7173-7181.

Oka S, Arita H: **Inflammatory factors stimulate expression of group II phospholipase A2 in rat cultured astrocytes. Two distinct pathways of the gene expression.** *J Biol Chem* 1991, **266**(15):9956-9960.

Oliveira S, Fonseca F, Antunes E, Camargo E, Morganti R, Aparício R, Toyama D, Beriam L, Nunes E, Cavada B *et al*: **Modulation of the pharmacological effects of enzymatically-active PLA2 by BTL-2, an isolectin isolated from the *Bryothamnion triquetrum* red alga.** *BMC Biochem* 2008, **9**:16.

Ponce-Soto L, Toyama M, Hyslop S, Novello J, Marangoni S: **Isolation and preliminary enzymatic characterization of a novel PLA2 from *Crotalus durissus collilineatus* venom.** *J Protein Chem* 2002, **21**(3):131-136.

Radomski M, Moncada S: **An improved method for washing of human-platelets with prostacyclin.** *Thromb. Res.* 1983:383-389.

Raza K, Harding J: **Non-enzymic modification of lens proteins by glucose and fructose: effects of ibuprofen.** *Exp Eye Res* 1991, **52**(2):205-212.

Rigden D, Hwa L, Marangoni S, Toyama M, Polikarpov I: **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 Cryst. D Biol Cryst.* 2003, **59**(2):255-262.

Rosenfeld G: **Symptomatology, pathology and treatment of snake bites in *South America*. In: Venomous animals and their venoms.**, vol. 2. New York: Academic Press; 1971.

Roth M: **"Glycated hemoglobin," not "glycosylated" or "glucosylated".** *Clin Chem* 1983, **29**(11):1991.

Ruggiero-Lopez D, Lecomte M, Moinet G, Patereau G, Lagarde M, Wiernsperger N: **Reaction of metformin with dicarbonyl compounds. Possible implication in the inhibition of advanced glycation end product formation.** *Biochem Pharmacol* 1999, **58**(11):1765-1773.

Saeki H: **Preparation of neoglycoprotein from carp myofibrillar protein by Maillard reaction with glucose: Biochemical properties and emulsifying properties.** *J. of Agricult and Food Chem.* 1997:680-684.

Santoro M, Sousa-e-Silva M, Goncalves L, Almeida-Santos S, Cardoso D, Laporta-Ferreira I, Saiki M, Peres C, Sano-Martins I: **Comparison of the biological activities in venoms from three subspecies of the South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*, *C. durissus cascavella* and *C. durissus collilineatus*)**" *Comp Biochem and Phys C-Toxic & Pharmac* 1999:293-293.

Schaloske R, Dennis E: **The phospholipase A2 superfamily and its group numbering system.** *Biochim Biophys Acta* 2006, **1761**(11):1246-1259.

Scott D, Sigler P: **Structure and catalytic mechanism of secretory phospholipases A2.** *Adv Protein Chem* 1994, **45**:53-88.

Seidler N, Squire T: **A beta-polyacrolein aggregates: Novel mechanism of plastic formation in senile plaques.** *Biochem Bioph Res Com* 2005:501-504.

- Shibata N, Hirano A, Hedley-Whyte E, Dal Canto M, Nagai R, Uchida K, Horiuchi S, Kawaguchi M, Yamamoto T, Kobayashi M: **Selective formation of certain advanced glycation end products in spinal cord astrocytes of humans and mice with superoxide dismutase-1 mutation.** *Acta Neuropathol* 2002, **104**(2):171-178.
- Shu Y, Sahara S, Nakamura S, Kato A: **Effects of the length of polysaccharide chains on the functional properties of the Maillard-type lysozyme-polysaccharide conjugate.** *J of Agricult Food Chem* 1996:2544-2548.
- Singh G, Gourinath S, Sarvanan K, Sharma S, Bhanumathi S, Betzel C, Yadav S, Srinivasan A, Singh T: **Crystal structure of a carbohydrate induced homodimer of phospholipase A2 from *Bungarus caeruleus* at 2.1Å resolution.** *J Struct Biol* 2005, **149**(3):264-272.
- Six D, Dennis E: **The expanding superfamily of phospholipase A(2) enzymes: classification and characterization.** *Biochim Biophys Acta* 2000, **1488**(1-2):1-19.
- Skog K: **Cooking procedures and food mutagens: a literature review.** *Food Chem Toxicol* 1993, **31**(9):655-675.

Soares A, Oshima-Franco Y, Vieira C, Leite G, Fletcher J, Jiang M, Cintra A, Giglio J, Rodrigues-Simioni L: **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* 2002, **34**(6):668-677.

Souza KL, Elsner M, Mathias PC, Lenzen S, Tiedge M: **Cytokines activate genes of the endocytotic pathway in insulin-producing RINm5F cells.** *Diabetologia* 2004, **47**(7):1292-1302.

Sribar J, Sherman N, Prijatelj P, Faure G, Gubensek F, Fox J, Aitken A, Pungercar J, Krizaj I: **The neurotoxic phospholipase A2 associates, through a non-phosphorylated binding motif, with 14-3-3 protein gamma and epsilon isoforms.** *Biochem Biophys Res Commun* 2003, **302**(4):691-696.

Stefansson S, Kini R, Evans H: **The basic phospholipase A2 from *Naja nigricollis* venom inhibits the prothrombinase complex by a novel nonenzymatic mechanism.** *Biochem.* 1990, **29**(33):7742-7746.

Stevens V, Rouzer C, Monnier V, Cerami A: **Diabetic cataract formation: potential role of glycosylation of lens crystallins.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1978, **75**(6):2918-2922.

Sugimura TE, Wakabayashi K: **Mutagens and carcinogens in food.** In: **Mutagens and carcinogens in the diet.** Wiley-Liss, New York; 1990.

Takizawa N, Takada K, Ohkawa K: **Inhibitory effect of nonenzymatic glycation on ubiquitination and ubiquitin-mediated degradation of lysozyme.** *Biochem Biophys Res Commun* 1993, **192**(2):700-706.

Toyama M, de Oliveira D, Beriam L, Novello J, Rodrigues-Simioni L, Marangoni S: **Structural, enzymatic and biological properties of new PLA(2) isoform from *Crotalus durissus terrificus* venom.** *Toxicon* 2003, **41**(8):1033-1038.

Toyama M, Toyama D, Joazeiro P, Carneiro E, Beriam L, Marangoni L, Boschero A: **Biological and structural characterization of a new PLA2 from the *Crotalus durissus collilineatus* venom.** *Protein J* 2005, **24**(2):103-112.

- Valentin E, Lambeau G: **Increasing molecular diversity of secreted phospholipases A(2) and their receptors and binding proteins.** *Biochim Biophys Acta* 2000, **1488**(1-2):59-70.
- Van Heyningen R: **The metabolism of D-glyceraldehyde by the lens.** *Biochem J* 1969, **112**(2):211-220.
- Verheij H, Volwerk J, Jansen E, Puyk W, Dijkstra B, Drenth J, de Haas G: **Methylation of histidine-48 in pancreatic phospholipase A2. Role of histidine and calcium ion in the catalytic mechanism.** *Biochem.* 1980, **19**(4):743-750.
- Vitek M, Bhattacharya K, Glendening J, Stopa E, Vlassara H, Bucala R, Manogue K, Cerami A: **Advanced glycation end products contribute to amyloidosis in Alzheimer disease.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994, **91**(11):4766-4770.
- Vivian J, Callis P: **Mechanisms of tryptophan fluorescence shifts in proteins.** *Biophys J* 2001, **80**(5):2093-2109.
- Westwood M, Argirov O, Abordo E, Thornalley P: **Methylglyoxal-modified arginine residues--a signal for receptor-mediated**

endocytosis and degradation of proteins by monocytic THP-1 cells. *Biochim Biophys Acta* 1997, **1356**(1):84-94.

Yan S, Chen X, Schmidt A, Brett J, Godman G, Zou Y, Scott C, Caputo C, Frappier T, Smith M: **Glycated tau protein in Alzheimer disease: a mechanism for induction of oxidant stress.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994, **91**(16):7787-7791.

Yaylayan V, Huyghues-Despointes A: **Chemistry of Amadori rearrangement products: analysis, synthesis, kinetics, reactions, and spectroscopic properties.** *Crit Rev Food Sci Nutr* 1994, **34**(4):321-369.

8. Apêndices

8.1 Publicações

Chemico Biological Interactions, 2011 – Cotrim, C.A. et al.,

Cotrim, C.A.; Oliveira, S.C.B.; Diz Filho, E.B.S.; Fonseca, F.V.; Baldissera Jr, L.; Antunes, E.; Ximenes, R.M.; Monteiro, H.S.; Rabello, M.M.; Hernandez, M.Z.; Toyama, D.O.; Toyama, M.H.; Quercetin as an inhibitor of snake venom secretory phospholipase A2.

doi:10.1016/j.cbi.2010.10.016

Molecules, 2011 – Santos, M.L. et al.,

Santos, M.L.; Toyama, D.O.; Oliveira, S.C.B.; Cotrim, C.A.; Diz Filho, E.B.S.; Fagundes, F.H.R.; Soares, V.C.G.; Aparício, R.; Toyama, M.H.; Modulation of the Pharmacological Activities of Secretory Phospholipase A2 from *Crotalus durissus cascavella* Induced by Naringin.

doi: 10.3390/molecules16010738

Protein Journal, 2010 – Toyama, M.H. et al.,

Toyama, M.H.; Toyama, D.O.; Torres, V.M.; Pontes, G.C.; Farias, W.R.; Melo, F.R.; Oliveira, S.C.B.; Fagundes, F.H.R.; Diz Filho, E.B.S.; Cavada, B.S.; Effects of low molecular weight sulfated galactan fragments from *Botryocladia occidentalis* on the pharmacological and enzymatic activity of sPLA2 from *Crotalus durissus cascavella*.

doi 10.1007/s10930-010-9294-9

Toxicon, 2009 – Oliveira, D.O. et al.,

Oliveira, D.O.; Marangoni, S.; Diz Filho, E.B.S.; Oliveira, S.C.B.; Toyama, M.H.; Effect of umbeliferone (7-hydroxycoumarin, 7-HOC) on the enzymatic, edematogenic and necrotic activities of secretory phospholipase A2 (PLA2) isolated from *Crotalus durissus collilineatus* venom.

doi:10.1016/j.toxicon.2008.12.018

Toxicon, 2009 – Diz Filho, et al.,

Diz Filho, E.B.S.; Marangoni, S.; Toyama, D.O.; Fagundes, F.H.R.; Oliveira, S.C.B.; Fonseca, F.V.; Carlgarotto, A.K.; Joazeiro, P.P.; Toyama, M.H.; Enzymatic and structural characterization of new PLA2 isoform isolated from white venom of *Crotalus durissus ruruima*. V.53(1),104-114, 2009.

doi:10.1016/j.toxicon.2008.10.021

BMC Biochemistry, 2008 – Oliveira et al.,

Oliveira, S.C.B.; Fonseca, F.V.; Antunes, E.; Camargo, E.A.; Morganti, R.P.; Aparício, R.; Toyama, D.O.; Beriam, L.O.S.; Nunes, E.V.; Cavada, B.S.; Nagano, C.S.; Sampaio, A.H.; Nascimento, K.S.; Toyama, M.H. Modulation of the pharmacological effects of enzymatically-active PLA2 by BTL-2, an isolectin isolated from the *Bryothamnion triquetrum* red alga. BMC Biochemistry (Online), v. 9, p. 16, 2008.

doi:10.1186/1471-2091-9-16

8.2 Congressos

XXXVIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular – SBBq

18 a 22 de Maio - Foz do Iguaçu – Paraná

Rafain Palace, Hotel & Convention Center

Oliveira, S.C.B., Diz Filho, E.B.S., Cotrim, C.A., Toyama, D.O., Toyama, M.H.. Evaluation of enzymatic and pharmacological activities of glycated BthTX-II, a PLA2 from *Bothrops jararacussu*. 2010. (Apresentação de Trabalho/Comunicação).

XXXVIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular – SBBq

18 a 22 de Maio - Foz do Iguaçu – Paraná

Rafain Palace, Hotel & Convention Center

Diz Filho, E.B.S., Oliveira, S.C.B., Cotrim, C.A., Toyama, D.O., Toyama, M.H.. Evaluation of pharmacological effects of glycated BthTX-I, a PLA2 from *Bothrops jararacussu*. 2010. (Apresentação de Trabalho/Comunicação).

XXXVIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular – SBBq

18 a 22 de Maio - Foz do Iguaçu – Paraná

Rafain Palace, Hotel & Convention Center

Cotrim, C.A., Oliveira, S.C.B., Diz Filho, E.B.S., Fonseca, F.V., Baldissera Jr, B., Antunes, E., Ximenes, R.M., Toyama, M.H.. Quercetin as an Inhibitor of Pharmacological Activity of sPLA2. 2010. (Apresentação de Trabalho/Comunicação).

XXXVIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular – SBBq

18 a 22 de Maio - Foz do Iguaçu – Paraná

Rafain Palace, Hotel & Convention Center

Ximenes, R.M., Silveira, E.R., Monteiro, H.S.A., Oliveira, S.C.B., Cotrim, C.A., Toyama, D.O., Gaeta, H.H., Toyama, M.H.. Effect of Harpalycin II in structure and platelet aggregation activity of PrTX-III, a Asp49 phospholipase A2 from *Bothrops pirajai* venom. 2010. (Apresentação de Trabalho/Comunicação).

XXXVIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular – SBBq

18 a 22 de Maio - Foz do Iguaçu – Paraná

Rafain Palace, Hotel & Convention Center

Toyama, D.O., Oliveira, S.C.B., Diz Filho, E.B.S., Toyama, M.H., Pinho, M.V.T., Romoff, P., Ferreira, M.J.P., Fávero, O.A.. Evaluation Of Analgesic Effect From *Baccharis Species*. 2010. (Apresentação de Trabalho/Comunicação).

XVI Congresso Brasileiro de Toxicologia

Minascentro, Belo Horizonte, Minas Gerais, 10 a 14 de outubro de 2009

Cotrim, C.A., Fonseca, F.V., Oliveira, S.C.B., Diz Filho, E.B.S., Toyama, M.H. AVALIAÇÃO DO EFEITO INDUZIDO POR BROMETO DE P-BROMOFENACIL NA ATIVIDADE ENZIMÁTICA E FARMACOLÓGICA DE sPLA₂ EXTRAÍDA DE *Crotalus durissus terrificus*. 2009. (Apresentação de Trabalho/Comunicação).

XXIV Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental

Federação de Sociedades de Biologia Experimental – Fesbe

Àguas de Lindóia – SP – Hotel Monte Real

Oliveira, S.C.B., Diz Filho, E.B.S., Cotrim, C.A., Fagundes, F.H.R., Toyama, D.O., Toyama, M.H. MODULATION OF THE PHARMACOLOGICAL EFFECTS INDUCED BY ENZYMATICALLY NON ACTIVE PLA₂ BY CARBOHYDRATES. 2009. (Apresentação de Trabalho/Comunicação).

XXIV Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental

Federação de Sociedades de Biologia Experimental – Fesbe

Àguas de Lindóia – SP – Hotel Monte Real

Cotrim, C.A., Oliveira, S.C.B., Diz Filho, E.B.S., Toyama, M.H. EVALUATION OF EFFECT INDUCED BY QUERCETIN ON THE ENZYMATIC, BIOLOGICAL AND PHARMACOLOGICAL EFFECTS INDUCED BY sPLA₂ FROM THE *Crotalus durissus terrificus*. 2009. (Apresentação de Trabalho/Comunicação).

XXIV Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental

Federação de Sociedades de Biologia Experimental – Fesbe

Àguas de Lindóia – SP – Hotel Monte Real

Diz Filho, E.B.S., Fagundes, F.H.R., Oliveira, S.C.B., Toyama, D.O., Romoff, P., Favero, O.A., Lago, J.H.G., Toyama, M.H. PRELIMINARY EVALUATION OF ANTIVENOM EFFECT OF A TERPENOID AND A FLAVONOID, ISOLATED FROM THE *BACCHARIS UNCINELLA* EXTRACT AGAINST SECRETORY PHOSPHOLIPASE A2 (PLA2) FROM *Crotalus durissus terrificus* VENOM. 2009. (Apresentação de Trabalho/Comunicação).

XXXVIII Reunião Annual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular – SBBq

Águas de Lindóia – SP – Hotel Monte Real

Oliveira S.C.B., Diz Filho E.B.S., Toyama D.O., Romoff, P., Favero, O.A., Lago, J.H.G., Toyama M.H. THE ANTIVENOM POTENTIAL OF NOVEL FLAVONOID (BUD-7) FROM *Baccharis uncinella* DC, AGAINST SECRETORY PHOSPHOLIPASE A2 (sPLA2) FROM *Crotalus durissus terrificus* VENOM. 2009. (Apresentação de Trabalho/Comunicação).

XXXVIII Reunião Annual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular – SBBq

Águas de Lindóia – SP – Hotel Monte Real

Diz Filho E.B.S., Oliveira S.C.B., Toyama D.O., Romoff, P., Favero, O.A., Lago, J.H.G., Toyama M.H. PRELIMINARY EVALUATION OF ANTIVENOM EFFECT OF TERPENOID ISOLATED FROM THE *Baccharis uncinella* DC. EXTRACT. 2009. (Apresentação de Trabalho/Comunicação).

XXXVIII Reunião Annual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular – SBBq

Águas de Lindóia – SP – Hotel Monte Real

Toyama, D.O, Romoff, P.; Favero, O.A., Oliveira, S.C.B., Diz Filho, E.B.S, Lago, J.H.G., Negro, C.C., Toyama, M.H. EVALUATION OF THE ANTIINFLAMATORY POTENTIAL OF THE ESSENTIAL OIL FROM LEAVES AND α -BISABOLOL ISOLATED OF *Nectandra megapotamica*. 2009. (Apresentação de Trabalho/Comunicação).

XXIII Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental

Federação de Sociedades de Biologia Experimental - Fesbe

Águas de Lindóia-SP – Hotel Monte Real

Oliveira, S.C.B.; Moure, M.C.R.; Fonseca, F.V.; Antunes, E.; Calgarotto, A.K.; Toyama, M.H. Modulation of the pharmacological effects of PLA2 from *Crotalus durissus collilineatus* by glycation. 2008. (Apresentação de Trabalho/Comunicação).

XXXVII Annual Meeting of SBBq and XI Congress of the PABMB

Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular – SBBq

Águas de Lindóia-SP – Hotel Monte Real

Oliveira, S.C.B.; Moure, M.C.R.; Fonseca, F.V.; Antunes, E.; Calgarotto, A.K.; Toyama, M.H. Modulation of the pharmacological effects of enzymatically-active PLA2 by carbohydrates. 2008. (Apresentação de Trabalho/Comunicação).

XXXVII Annual Meeting of SBBq and XI Congress of the PABMB

Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular – SBBq

Águas de Lindóia-SP – Hotel Monte Real

Santos, M.L.; Fagundes, F.H.R.; Teixeira, B.; Oliveira, S.C.B.; Diz Filho, E.B.S.; Toyama, M.H.; Aparício, R. Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of a new basic PLA2 (F17) from *Crotalus durissus terrificus*. 2008. (Apresentação de Trabalho/Comunicação).

XXXVII Annual Meeting of SBBq and XI Congress of the PABMB

Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular – SBBq

Águas de Lindóia-SP – Hotel Monte Real

Toyama, M.H.; Toyama, D.O.; Oliveira, S.C.B.; Boschero, A.C.; Marangoni, S. Characterization of new PLA2 group III from the brazilian sea anemone *Bunodosoma caissarum*. 2008. (Apresentação de Trabalho/Comunicação).

8.3 Comitê de Ética



CEEA/Unicamp

Comissão de Ética na Experimentação Animal
CEEa/Unicamp

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 1321-1, sobre "Avaliação da glicosilação não enzimática (Glicação) sobra a inflamação aguda induzida por fosfolipases A2 secretórias pró-inflamatórias isoladas de venenos de serpentes crotálicas e botrópicas", sob a responsabilidade de Prof. Dr. Marcos Hikari Toyama / Simone Cristina Buzzo, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal – CEEA/Unicamp em **22 de agosto de 2007**.

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº **1321-1**, entitled " _____ ", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - Unicamp) on **august 22, 2007**.

Campañas, 22 de agosto de 2007.

Profa. Dra. Ana Maria A. Guarnido
Presidente

Fátima Alonso
Secretária Executiva

CEEA/IB – Unicamp
Caixa Postal 6109
13083-970 Campinas, SP – Brasil

Telephone: (19) 3521-6359
Telefax: (19) 3521-6356
E-mail: comisib@unicamp.br
<http://www.ib.unicamp.br/institucional/ceea/index.htm>

8.4 Artigo Submetido

5/1/2011

CMS:Author Portal



WELCOME: Mrs. Simone Cristina Oliveira as Author

Protein & Peptide Letters
For support click here

ACTIVITY MENU

- Work Portal
- Author Module
- Submit Tentative Title Only
- New Abstract
- New Manuscript
- Manuscript Status
- Reports
- Support Ticket
- Logout

Content Management System

REGISTER | FAQs | CONTACT US

Welcome to Author Module

General Articles

Hot Topic Articles

Journal/Book Title:

Manuscript Reference#:

Manuscript Title:

Author:

Affiliation:

Country:

Co-Authors:

Protein & Peptide Letters
BSP-PPL-2011-392

Influence of simple saccharides on the pharmacological effects and enzymatic activity of PLA2 isolated from *Crotalus durissus collilineatus* venom.

Mrs. Simone Cristina Oliveira

Biochemistry

Brazil

Andrana K Calgarotto
Mariana CR Moure
Eduardo BS Diz Fiho
Simone Cristina Buzzo Oliveira
Edson Antunes
Lineu Baldissera Jr
camila A Cotrim
Daniela O Toyama
Rsaacute;bio HR Fagundes
marcos h Toyama

Download Files

Original Files

Manuscript FIGURE

- Figure2.tif[Download]
- Figure6.tif[Download]
- Figure5.tif[Download]
- Figure7.TIF[Download]
- Figure1.tif[Download]
- Figure4.tif[Download]
- Figure3.TIF[Download]
- Figure8.TIF[Download]

Manuscript PDF

- PeptidesLetters_OliveiraSCB_2010.doc[Download]

Manuscript TEXT

- PeptidesLetters_OliveiraSCB_2010.doc[Download]

Abstract

In this article, D-Glucose, D-Galactose and D-Lactose were used to determine the influence of glycation on the activity and pharmacological effects of PLA2 from *Crotalus durissus collilineatus*. MALDI-TOF showed that D-Glucose and D-Lactose are glycosylated to the PLA2 while D-Galactose showed any molecule glycosylated to the enzyme. The PLA2 enzymatic activity was tested, and the glycation with D-Lactose had a greater effect than D-Glucose or D-Galactose. PLA2 induced a platelet aggregation of 54.83%, while PLA2 glycosylated with D-Glucose, D-Galactose or D-Lactose induced 55.3%, 53.0% and 24.6% of aggregation, respectively. The total edema induced by glycosylated PLA2 was larger than that induced by non-glycosylated PLA2. Myotoxic activity of PLA2 was increased only by glycation with D-Lactose. The cytotoxic effect of PLA2 was higher than the glycosylated PLA2. The SDS-PAGE showed that only the PLA2 glycosylated to D-Lactose has a discrete band of homodimerization. The Circular dichroism showed significant changes when compared the secondary structure of PLA2 native to the glycosylated PLA2. The 3D prediction structure of PLA2 showed important areas of the protein where possibly the

Influence of simple saccharides on the pharmacological effects and enzymatic activity of PLA2 isolated from *Crotalus durissus collilineatus* venom.

Oliveira, S.C.B.^{1*}; Diz Filho, E.B.S.¹; Moure, M.C.R.¹; Calgarotto, A.K.¹; Fonseca, F.V.¹, Antunes, E.², Baldissera-Jr., L.², Cotrim, C.A.¹, Toyama, D.O.³, Fagundes, F.H.R.¹ and Toyama, M.H.⁴

¹ Departamento de Bioquímica, Instituto de Biologia, UNICAMP, Campinas, São Paulo, Brazil.; ² Departamento de Farmacologia, Faculdade de Ciências Médicas, UNICAMP, Campinas, São Paulo, Brazil; ³ Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Univesidade Presbiteriana Mackenzie, São Paulo, Brazil; ⁴ UNESP, Campus Experimental do Litoral Paulista, São Vicente, São Paulo, Brazil.

*Corresponding author:

Professor Simone C. B. Oliveira

Rua Ottmar Mergenthaler, 15. Apto. 33 – CEP 13077-048

Jd. Bela Vista – Campinas – SP - Brazil

e-mail: simonebuzzo@hotmail.com

FAX: 55-19-3521-6374 PHONE: 55-19-8183-8185

Abstract.

In this article, D-Glucose, D-Galactose and D-Lactose were used to determine the influence of glycation on the activity and pharmacological effects of PLA2 from *Crotalus durissus collilineatus*. MALDI-TOF showed that D-Glucose and D-Lactose are glycated to the PLA2 while D-Galactose showed any molecule glycated to the enzyme. The PLA2 enzymatic activity was tested, and the glycation with D-Lactose had a greater effect than D-Glucose or D-Galactose. PLA2 induced a platelet aggregation of 54.83%, while PLA2 glycated with D-Glucose, D-Galactose or D-Lactose induced 55.3%, 53.0% and 24.6% of aggregation, respectively. The total edema induced by glycated PLA2 was larger than that induced by non-glycated PLA2. Myotoxic activity of PLA2 was increased only by glycation with D-Lactose. The citotoxic effect of PLA2 was higher than the glycated PLA2. The SDS-PAGE showed that only the PLA2 glycated to D-Lactose has a discrete band of homodimerization. The Circular dichroism showed significant changes when compare the secondary structure of PLA2 native to the glycated PLA2. The 3D prediction structure of PLA2 showed important areas of the protein where possibly the carbohydrates can glycate. These results show that the carbohydrates D-Glucose and D-Lactose have an interesting regulatory function for PLA2 through the modulation of its structure as well as its biological activity and pharmacological effects.

Key words: PLA2, platelet aggregation, carbohydrates, myotoxicity, MALDI-TOF, enzyme activity

Abbreviation list: FCS-Fetal Calf Serum; 4N3OBA-4-nitro-3-octanoyloxy-benzoic acid;

1.Introduction.

Phospholipases A₂ (PLA₂) are enzymes that catalyse the hydrolysis of the ester bond at the sn-2 position of glycerophospholipids leading to the release of free fatty acids [1]. Of particular interest in this constantly expanding superfamily, snake venom PLA₂s have several biological and pharmacological activities including cardiotoxicity, myotoxicity, neurotoxicity, and anticoagulant and proinflammatory effects [2]. In the case of mammalian tissues and cells, PLA₂ play other crucial roles in diverse cellular responses such as phospholipid digestion, metabolism, host defence and signal transduction [3]. Some of these roles are fulfilled by the generation of its enzymatic products while others are linked to high-affinity receptors [4].

PLA₂ inhibitors can be divided into two groups based on their structural characteristics. One of these groups contains a segment similar to the carbohydrate recognition domain (CRD) of Ca²⁺-dependent (C-type) lectins [5, 6]. The CRD was originally defined as the functional unit in C-type lectins responsible for binding to carbohydrates [7]. PLA₂ receptors were isolated from various mammalian tissues [8] and their structural similarity to mannose receptors was noted because they have eight tandem repeats of CRDs that involve conserved cysteine and tryptophan residues. PLA₂ receptors can bind pancreatic group I PLA₂ and non-glycosylated secretory group II PLA₂ [9]. Although interactions occur between the CRD-like domain of PLA₂ receptors and PLA₂, little is known about the region of the CRD-like domain that is responsible for binding to PLA₂ [10]. More recently, [11] showed that low molecular lectin of red algae interacted with snake venom PLA₂ and was capable of modulating its biological activity. This result clearly showed that PLA₂ had a high affinity for carbohydrates.

The interactions of PLA₂ with carbohydrates are likely important and are involved in the mode through which PLA₂ bind their specific receptors [8]. On the other hand, binding of heparin, a glycosaminoglycan formed by repeating disaccharide units, to PLA₂ has been shown to inhibit the enzymatic activity of human secretory type II PLA₂ [12]. Binding to heparin also inhibits a major isoform of porcine pancreatic type I PLA₂ [13]. The heparin binding site of these two molecules is located at the amino-terminal α -helix of PLA₂. At this region, there is a consensus heparin binding sequence of xKKxxKKxxKKxx, where K represents cationic amino acid residue and x represents any amino acid. The proposed binding mode is consistent with the role of the amino-terminal region of PLA₂ in interfacial binding to the membrane surface and the associated enzymatic action [14]. Recently, glycosaminoglycans (GAGs) were found to interact selectively with crotoxin and basic PLA₂. GAGs may serve as potential targets of these toxins [15, 16]. Because heparin and glycosaminoglycans consist of variably repeating simple

saccharide units, we evaluated the effect of simple carbohydrates including simple monosaccharides (D-glucose and D-galactose) and one disaccharide (D-lactose) on the enzymatic activity and pharmacological effects of isolated PLA2 from the rattlesnake *Crotalus durissus collilineatus*. We sought to better understand the effects of such compounds on PLA2 structure and conformation as well as to explore how these compounds might affect ligand binding. Finally, we ventured to identify new interactions that might be important in molecular recognition.

2. Materials and Methods.

2.1. Venom and Reagents.

The *Crotalus durissus collilineatus* venom was kindly donated by the Butantan Institute (São Paulo, Brazil). All solvents, chemicals and reagents used in this work were HPLC, sequence grade of the highest purity available from Sigma, Aldrich Chemicals, Merck and Bio-Rad. Male Swiss mice (18–20 g) used in the pharmacological assay were obtained from the University's Central Animal Facility (Cemib – Unicamp, Universidade Estadual de Campinas). All animal experiments were approved by the State University of Campinas Ethics Committee (Protocol number: 1321-1; São Paulo, Brazil).

2.2. PLA2 Purification.

Whole venom was first fractioned as described by [17]. Dried venom (35 mg) was dissolved in ammonium bicarbonate buffer (0.2 M, pH 8.0) for complete dissolution and then the insoluble components were cleared by centrifugation (4500 g for 2 min). The recovered supernatant was applied to a Superdex 75 column (1 x 60 cm, previously equilibrated with the same buffer) for HPLC molecular exclusion chromatography. The main fractions of the venom were eluted at a constant flow rate of 0.3 mL/min. The chromatographic run was monitored by absorbance readings at 280 nm and the eluted PLA2 was pooled and lyophilised. The PLA2 fraction was then subjected to reverse phase HPLC. After complete dissolution in 200 µL of TFA 0.1% (buffer A) followed by insoluble component clearing by high-speed centrifugation (4500 g for 3 min), the supernatant was loaded on a C18 µ-Bondapack column (0.78 cm x 30 cm, Waters 991-PDA system). Elution was performed using a non-linear gradient of buffer B (66.6% of acetonitrile in TFA 0.1%) at a constant flow rate of 1.0 ml/min. The chromatographic run was monitored by absorbance readings at 214 nm. The purified fraction was lyophilised and stored at -20°C.

2.3. PLA2 Glycation With Carbohydrates.

Approximately 8 mg of purified protein and 1 mg of carbohydrate (D-glucose, D-galactose or D-lactose) were dissolved in 5 mL of phosphate buffer (0.1 M, pH 7.0) to yield a molar ratio of protein to carbohydrate of 1:8. The

mixtures were incubated at 35 °C for 15 days in sealed glass flasks covered with aluminium foil to avoid exposure to light. Samples were then submitted to molecular exclusion chromatography to remove buffer and excess unlinked sugar. The collected samples were lyophilised and stored at -20 °C. A solution containing only PLA2 was subjected to the same conditions as a control.

2.4. PLA2 Activity.

PLA2 activity was measured following the protocols described by [18] and modified by [17] for the 96-well plate format. The standard assay mixture contained 200 µL of buffer (10 mM Tris-HCl, 10 mM CaCl₂, 100 mM NaCl, pH 8.0), 20 µL of 2.98 mM substrate (4-nitro-3-octanoyloxy-benzoic acid), 20 µL of water, and 20 µL of PLA2 (1 mg/mL) in a final volume of 260 µL. After the addition of PLA2, the mixture was incubated for 20 min at 37 °C. The increase in absorbance at 425 nm due to product formation was monitored during this period and the activity was expressed as nanomoles of formed product per minute per milligram of enzyme. The effects of D-glucose, D-lactose and D-galactose (mol/mol) on PLA2 activity was investigated prior to assaying the enzyme activity using a SpectraMax 340-multiwell plate reader (Molecular Devices).

2.5. Platelet Aggregation Studies.

The platelet aggregation activities were performed as described by [19]. Briefly, venous blood was collected with informed consent from healthy volunteers who denied taking any medication in the previous 14 days. Collected blood was immediately transferred into polypropylene tubes containing 1/10 of a final volume of 3.8% trisodium citrate. After removing the platelet-rich plasma (PRP), the remaining blood was prepared by centrifugation of the citrated blood at 200 g for 10 min. Washed platelets (WP) were obtained from the residue by centrifugation of the citrated blood at 1500 g for 20 min. The platelets were left for one hour at room temperature to recover their sensitivity to aggregating agents. Platelet counts were performed on a Coulter S Plus (Coulter Electronics, Hialeah, FL) or by phase-contrast microscopy. Platelet aggregation was carried out using 400 µL of the washed platelets solution in a cuvette kept at 37 °C with constant stirring. The desired concentration of protein was added three minutes prior to the addition of platelet aggregation inducers (thrombin for washed platelet). Subsequently, the aggregation was recorded for 5-10 min using an aggregometer (Payton Scientific Instruments, Inc, Buffalo, NY). Aggregation experiments were performed using quantities of 10 µg of native or glycated PLA2.

2.6. Paw Edema Assay.

Paw edema assays were performed using male Swiss mice. The paw edema was induced by a single subplantar injection of 25 μ L of native or glycated PLA2 (25 μ g/paw). Paw volume was measured immediately before the injection of the samples and at selected time intervals thereafter (30, 60, 120, 180 and 360 minutes) using a hydroplethysmometer (model 7150, Ugo Basile, Italy). All samples were dissolved in sterile saline solution (0.9%). Results were expressed as an increase in paw volume (mL) and calculated by subtracting the basal volume. Additionally, the area under the curve was calculated (n = 5).

2.7. Myotoxic Activity.

Plasma creatine kinase (CK) activity was measured using a CK-UV kinetic kit (Sigma Chemical Co). The glycated or non-glycated PLA2 (1 μ g/ μ L) was injected intramuscularly in the gastrocnemius of 18–22 g male Swiss mice (25 μ L, n = 5). Mice used as negative controls were injected with saline. After one hour, a blood sample was collected from the tail in heparinised capillary tubes and centrifuged for plasma separation. CK activity was determined using 4 μ L of plasma according to the manufacturer's instruction. CK activity was expressed in U/L.

2.8. Cell Viability Assay.

The N2A neuronal cells line were cultured as described by [20] in RPMI-1640 medium containing glucose (10 mmol/L), FCS (10%, vol/vol), penicillin and streptomycin at 37 °C and 5% CO₂ saturation. The MTS (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium inner salt) reduction was measured using a spectrophotometric assay (CellTiter 96TM AQueous 5-Assay, Promega, USA) at 490 nm for all viability tests. Neuronal cells (N2As) were cultured in 96-well plates with seed concentrations of 1 x 10⁵ cells/well in 100 μ L of culture medium and glycated for 12 hours at 37 °C before exposed to the PLA2 from *Crotalus durissus collilineatus* (15 μ g/mL). The cells were exposed to native PLA2 and to PLA2 glycated with D-glucose, D-galactose or D-lactose. The mixture of PMS (phenazine methosulfate) and MTS was prepared following the manufacturer's protocols and diluted to 15% Krebs buffer. The viability was expressed as the percent absorption of MTS in the absence of cytotoxic compounds compared between each group (n = 8).

We also performed this assay with two other cells lines, RIN m5F cells (obtained from the American Type Culture Collection, ATCC) and RINm5F cells that had been stably transfected with the catalase (KAT) gene named as RIN-CAT cells [20]. Cells were grown in RPMI-1640 medium containing 1% glucose, 1% sodium pyruvate, 1% nonessential amino acids, and 10% foetal calf serum.

2.10. MALDI-TOF.

Native or glycated PLA2 was mixed with matrix 2,5-dihydroxybenzoic acid (14 mg/mL) in a 1:1 ratio (vol/vol). From each sample, 1- μ l aliquots were deposited on gold-covered steel sample and dried in a vacuum. The molecular masses of native or reduced and alkylated PLA2 were analysed in the positive mode on an LDI-1700XP instrument (Linear Scientific, Inc., Reno, NV) equipped with an N2 laser (339 nm) using 7 μ J of energy.

2.11. Circular Dichroism

The native PLA2 and glycated to D-Glucose and D-Lactose were dissolved in water and the solutions were adjusted to a final concentration of 10mM of protein. The sample was transferred to a 1mm path-length quartz cuvette. Circular dichroism spectra in the wavelength range of 185-300 nm were obtained using a J715 spectropolarimeter (Jasco Corp., Japan) using a bandwidth of 1nm and a response time of 1s. Data collection was performed at room temperature with a scanning speed of 100nm/min; a total of nine scans were accumulated for the sample.

2.12. Prediction of the three-dimensional structure of PLA2

Amino acid sequence similarity and alignment searches were carried out to compare the PLA2 isolated from *Crotalus durissus collilineatus* venom against the Protein Data Bank using BLASTP. The 3D structure of PLA2 was determined by comparative homology modelling. Using computer graphics, the amino acid sequence of PLA2 was fitted to the high-resolution X-ray structure of the homologous 1BJJ_A. This allowed the construction of a model, which was then subjected to energy minimization and molecular dynamic simulations.

2.13. Statistical Analyses.

The results were reported as the mean $\pm$ SEM of n experiments. The significance of differences between means was assessed by analysis of variance followed by a Dunnett's test in which several experimental groups were compared with the control group. The confidence limit for significance was 5% ($p > 0.05$).

3. Results.

After the first purification step by HPLC molecular exclusion chromatography, native crotoxin was subjected to reverse phase HPLC (Fig. 1a). The purified fraction was composed of only one electrophoretic band (Fig. 1b) with a molecular mass of approximately 15 kDa. This fraction, identified as PLA2, was then subjected to a process of

glycation with D-Glucose, D-Galactose and D-Lactose. After incubation with these carbohydrates, samples were cleaned by molecular exclusion chromatography and the resulting glycosylated PLA2 were stored for the experiments.

MALDI-TOF confirmed the PLA2 mass of 14635.67 (Fig. 2a). The PLA2 glycosylated to D-Glucose showed a peak of molecular mass 15726.64, which suggests that six molecules of this carbohydrate are glycosylated in the enzyme (Fig. 2b). The PLA2 glycosylated to D-Galactose showed a peak of 14645.35 that could be attributable any carbohydrate in the enzyme (Fig. 2c). The PLA2 glycosylated to D-Lactose showed a peak of molecular mass of 16373.17, which suggests that five molecules of carbohydrates were glycosylated (Fig. 2d).

Enzymatic activity measurements indicated that glycation with D-Glucose and D-Lactose carbohydrates increased PLA2 activity and affinity for 4N3OBA (Fig. 3a). In the SDS-PAGE the native PLA2 showed only one electrophoretic band of 14kDa, approximately. The PLA2 subjected to glycation with D-Galactose and D-Glucose showed the same result as the native PLA2, while the PLA2 glycosylated to D-Lactose showed a discrete band near 28kDa, an discrete band of homodimerization of PLA2 (Fig. 3b).

In the platelet aggregation assays, non-glycosylated PLA2 induced 54.83% of aggregation. The PLA2 subjected to glycation with D-Galactose, D-Glucose and D-Lactose induced, respectively, 53.0%, 55.3% and 24.6% (Fig. 4a and Fig. 4b).

Native non-glycosylated PLA2 induced a significant edema. The maximum effect was observed at 60 minutes after toxin injection and edema volume decreased after 120 minutes (Fig. 5a). However, compared to non-glycosylated PLA2, edema induction was higher after 180 minutes for PLA2 glycosylated to D-Glucose. The PLA2 that was subjected to glycation with D-Galactose induced a decreasing edema at 60 minutes that remained the same size after 180 minutes. The measured area under the curve (AUC) is presented in Figure 5b.

Plasma creatine kinase (CK) activity was measured using glycosylated or non-glycosylated PLA2. The native PLA2 induced a high CK activity of 582.84 U/Lmin. When PLA2 glycosylated with D-Glucose or D-Lactose were applied, the CK activities were significantly decreased to 523.02 U/Lmin and 471.61 U/Lmin, respectively (Fig. 6a). However, the PLA2 subjected to glycation with D-Galactose showed CK activity of 537.52 U/Lmin, which is similar to the native PLA2. It seems that the glycation of the enzyme significantly decreased the myotoxic effect induced by PLA2 (Fig. 6a).

PLA2 induced a significant cytotoxic effect when incubated with N2A neuronal cell whereas previously glycosylated PLA2 did not induce any effect under our experimental protocols (Fig. 6b). The highly purified non-glycosylated PLA2 did not have any cytotoxic effect in RIN-CAT cells (Fig. 6c).

The Circular dichroism spectra of native and glycosylated PLA2 were obtained in the wavelength region of 190 – 250nm. The native PLA2 spectra revealed a structure rich in α -helices, which had a significant modification of spectra between the 200-230nm wavelength region when the PLA2 is glycosylated to D-Glucose or D-Lactose (Fig. 7). The 3D prediction structure of PLA2 corroborates to this structure rich in α -helices (Fig. 8)

These results suggest that carbohydrates play an important modulation role on the structure and function of PLA2 from venoms.

4. Discussion.

The PLA2 from the *Crotalus durissus collilineatus* venom are the main toxic compounds found in this venom and probably play major roles in its action. These PLA2 have been recently characterised as anti-leishmanic compounds [23, 24] that modulate the metabolic function of pancreatic β -cells by increasing insulin secretion [25]. They are also considered highly neurotoxic [26], highly edematogenic [27], and are partly responsible for the renal toxicity induced by the *Crotalus durissus collilineatus* venom [28]. Despite all of these studies, the effect of the enzymatic strength of these PLA2 and thus the strength of their pharmacological effects remains controversial. The structural analysis of these PLA2 suggest that a calcium binding loop and the C-terminal region domain are important topographical regions implicated in their biological activity [29, 11].

The enzymatic activity of these PLA2 showed an allosteric tendency when compared to non-micellar substrates [26]. Native PLA2 showed a V_{max} of 18.54 and K_M of 7.52 whereas the PLA2 glycosylated with D-Lactose, D-Glucose or D-Galactose exhibited V_{max} s and K_M s of 43.32 and 6.91, 36.09 and 5.02, and 21.4 and 6.93, respectively. Analysis of Figure 3a suggests that native PLA2 has allosteric behaviour and that the glycosylation with D-Glucose or D-Lactose modifies such behaviour. This change suggests that the presence of carbohydrates in the PLA2 structure increases the affinity of PLA2 for 4N3OBA and it increases its enzymatic capacity for substrate catalysis. We observed that glycosylation of PLA2 from the *Crotalus durissus collilineatus* venom had a great influence in the PLA2. The presented results evidenced the influence of carbohydrates on the monomeric to homodimeric transition of PLA2 and suggest that PLA2 from the snake venom had high affinity for sugars similar to the PLA2 isolated from *Bungarus caeruleus* [31]. In the case of PLA2 of *Crotalus durissus collilineatus*, the glycosylation to D-Glucose and D-Lactose (as

can be seen in the MALDI-TOF) increased the enzymatic activity of this protein as expected, while the PLA2 that suffered the process of glycation to D-Galactose showed a similar enzymatic activity to the native enzyme. Besides, the glycation did not induce the PLA2 to a significant homodimerization as we can see in the electrophoresis, where only PLA2 glyated to D-Lactose showed a discrete homodimerization. It has long been believed that the hydrolysis of cellular phospholipids caused by the PLA2 from snake venom was responsible for its pharmacological effects. However, attempts to correlate these effects with catalytic activity had been unsuccessful [32]. By considering myonecrosis, platelet aggregation and cytotoxic effects, demonstrate that this correlation was not present. Furthermore, all carbohydrates assayed here increased paw edema after 120 minutes, which is a much longer time than that needed by isolated native PLA2 to cause the maximum edema induction. These results suggest that carbohydrates may affect some pharmacological effects of PLA2 but that such modulation would not occur in the same way or on the same level for PLA2 glyated to D-glucose or D-lactose.

The PLA2 that was subjected to glycation to D-Galactose seemed to have suffered any influence by the incubation. The enzymatic activity and the pharmacological experiments showed similar results from native PLA2 and the PLA2 incubated to the D-Galactose.

Several catalytically inactive PLA2s which present strong pharmacological effects have been studied [33, 34] and the presence of pharmacological domains distinct from the catalytic site in PLA2s have been suggested [32, 35]. Many studies comparing the structures of active and non-active PLA2 have pointed to two important sites in their structure; the catalytically active site and the pharmacological site, each one responsible for different activities. A possible structure of PLA2 from *Crotalus durissus collilineatus* venom is positioned such that the beta-wing region is exposed to the intramolecular environment. Thus, we can speculate that this region would not have significant importance for the biological activity of these PLA2. A similar attribute is observed in other PLA2 which interact with target cells via membrane peptidoglycans and with specific or promiscuous receptors. Site-specific mutation studies carried out with PLA2 indicated that its binding to a receptor involves specific recognition of the CRD region of this receptor. This region is located near the catalytic site and the calcium binding loop of PLA2 [9, 4]. We suggest that in the PLA2, the calcium binding loop appears free to interact with a receptor. The C-terminal domain, where positively charged amino acids responsible for myonecrosis are located, appears to be exposed to the external environment.

The snake venom PLA2 can induce [11] or inhibit [36] platelet aggregation, or even induce or prevent platelet aggregation depending on the concentration of protein used [37]. The platelet activation may play a role in crotalid

envenomation and the thrombin-like activity of the PLA2 from *C. d. collilineatus* [38] as confirmed in Figure 3. The aggregation of PLA2 subjected to glycation with D-Galactose had a result very similar to the native PLA2 profile. PLA2 glycated to D-Glucose induced 55.3% of aggregation, a similar result to the native enzyme. Glycation with D-Lactose, however, decreased PLA2-induced platelet aggregation resulting in only 24.6% of aggregation (Fig. 4a and 4b). Despite the similar final effect induced by D-Glucose glycated PLA2 (Fig. 4b), there are significant differences between the platelet aggregation profiles (Fig. 4a). In the presence of ADP or other agonists such as epinephrine, thrombin or collagen, platelet aggregation can be viewed as occurring in two phases. First, platelets undergo a shape change with pseudopod formation and initiate the primary reversible phase of aggregation. With a stronger stimulus, secretion takes place with the release of platelet granule proteins and recruitment of additional platelets. This gives rise to the secondary irreversible phase of aggregation [39]. Our results clearly revealed that PLA2 from the *Crotalus durissus collilineatus* solely induced a long lasting initial phase of platelet aggregation. This result differs from those presented by [38] for whole venom. Therefore, PLA2 may not be the main clotting agent of the venom. The glycation of PLA2 with D-glucose showed some influence on the profile of aggregation, but did not alter the platelet aggregation. Glycation with D-lactose, a disaccharide, influenced both parameters. Some non-catalytically active PLA2s induce strong platelet aggregation, proving that the pharmacological sites are important to this effect [40]. We suggest that the glycation of the carbohydrates to PLA2 changed its structure and decreased its pharmacological effects thus influencing the profile of the platelet aggregation. Furthermore, in the case of D-Lactose, the final aggregation was also altered.

The edema induced by PLA2 is clearly characterised as an acute phenomenon with its maximum effects occurring at 60 minutes and significantly reducing after 120 minutes. Interestingly, glycation with carbohydrates delayed this effect by strongly decreasing the initial PLA2 induction of edema, which occurred on a considerably delayed timeline. This observation has important clinical implications for snake bites.

The PLA2 induced a significant cytotoxic effect when incubated with N2A neuronal cell (Fig. 6b). The native PLA2 were also assayed in the RINm5F rat insulinoma cells and in the RINm5F cells that had been stably transfected with the catalase gene (RIN-CAT). The results of these experiments confirmed the cytotoxic effect induced by PLA2 on RINm5F cells in addition to the confirmation of the effects of glycation with D-Glucose or D-Lactose (results not shown).

Some literature suggests that the binding of toxic PLA2s to target cellular membranes may not be the single cause determining the myotoxicity but that it is only an important factor. Our myotoxicity assay results suggest that, in spite of the increase in the enzymatic activity, the pharmacological site of the protein was also modified by the carbohydrates thus altering the protein effect. This is similar to the effects described for PLA2 incubated with heparin [29]. There is a controversy concerning the relationship between the myonecrotic effect and the hydrolytic activity of venom PLA2. Our results suggest that the induced myotoxicity is not caused by the PLA2 enzymatic activity. Heparin is similar to the carbohydrates used here and is known to increase the enzymatic activity. However, heparin has a larger amount of acidic charge that can react with the positively charged amino acids of PLA2. Some studies showed that monosaccharides could react with positively charged amino acid residues of PLA2, particularly in the glycosylated protein. Because the presence of these basic amino acids in the C-terminal domain is crucial for the snake venom myonecrotic effect and this region appears unobstructed in the structure of PLA2 from *Crotalus durissus collilineatus*, it is probable that some sugar units would react with these amino acid residues, changing its secondary structure as showed in the circular dichroism, modulating its functions.

It has been known that carbohydrates are among the organic constituents of venoms. However, despite the fact that the venoms of snakes have been extensively studied and their composition has been quite well established, the function of such molecules in this medium has been neglected. The analysis of the venom from *Crotalus durissus collilineatus* indicated the presence of neutral hexoses [38].

In the last few years, the relationship of PLA2 with carbohydrates, simple or complex, has been revealed; a crystal structure of two molecules of PLA2 from the snake venom of Krait (*Bungarus caeruleus*) and two mannoses has been presented [31]. The presence of another sugar was observed in the crystal structure of PLA2 from *Naja naja sagittifera*; an N-acetylglucosamine in the substrate-binding site [41]. In both crystals, the carbohydrates stabilised the PLA2 in the structure of a homodimer. This suggests that not only are the sugars important in the venom to preserve the enzyme for a long period, but also they participate in a number of molecular interactions with the enzymes that may affect the enzymes' pharmacological effects. Thus, we clearly demonstrate the carbohydrate modulation potential for PLA2.

5. Conclusion.

The results presented here for the PLA2 glycosylated to D-Glucose and D-Lactose suggest that cell lesion events do not involve the same site engaged in edema induction and platelet aggregation. Furthermore, the increase in enzymatic activity is not of great importance for edema induction and platelet aggregation in addition to having no influence on myonecrosis. Therefore, it is promising to speculate on the presence of two pharmacological sites in the PLA2 from *Crotalus durissus collilineatus*; the calcium binding loop, responsible for the edema induction and platelet aggregation, and the C-terminal region, responsible for myonecrosis. In both cases, these pharmacological effects are not dependent on the enzymatic strength of PLA2. The glycation of PLA2 to D-Glucose or D-Lactose modified its secondary structure modulating the enzymatic activity and the pharmacological effects of this protein.

6. Acknowledgments.

The authors are grateful to the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP 07/55509-4; 06/55778-2; 07/ 54714-3), Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) for financial support. We are grateful to Paulo Aparecido Baldasso for technical support.

7. References.

- [1] Van Deenen, L.; de Haas, G.; Heemskerk C. H. Hydrolysis of synthetic mixed-acid phosphatides by phospholipase A from human pancreas. *Biochim Biophys Acta*, **1963**, 67, 295–304.
- [2] Doley, R.; Kini, R.M. Protein complexes in snake venom. *Cell Mol Life Sci.* **2009**, 66(17), 2851-2871.
- [3] Murakami, M.; Nakatani, Y.; Atsumi, G.; Inoue, K.; Kudo, I. Regulatory functions of phospholipase A2. *Crit Rev Immunol.*, **1997**, 17(3-4), 225-283.
- [4] Valentin, E.; Lambeau, G.. What can venom phospholipases A(2) tell us about the functional diversity of mammalian secreted phospholipases A(2)? *Biochimie*, **2000**, 82, 815-831.
- [5] Higashino, K.; Ishizaki, J.; Kishino, J.; Ohara, O.; Arita, H. Structural comparison of phospholipase-A2-binding regions in phospholipase-A2 receptors from various mammals. *Eur J Biochem*, **1994**, 225(1), 375-382.
- [6] Nobuhisa, I.; Chiwata, T.; Fukumaki, Y.; Hattori, S.; Shimohigashi, Y.; Ohno, M. Structural elements of *Trimeresurus flavoviridis* serum inhibitors for recognition of its venom phospholipase A2 isozymes. *FEBS Lett.* **1998**, 429(3), 385-389.

- [7] Siebert, H.C.; von der Lieth, C.W.; Kaptein, R.; Beintema, J.J.; Dijkstra, K.; van Nuland, N.; Soedjanaatmadja, U.M.; Rice, A.; Vliegthart, J.F.; Wright, C.S.; Gabius, H.J. Role of aromatic amino acids in carbohydrate binding of plant lectins: laser photo chemically induced dynamic nuclear polarization study of hevein domain-containing lectins. *Proteins*. **1997**, *28*(2), 268-284.
- [8] Valentin, E.; Lambeau, G. Increasing molecular diversity of secreted phospholipases A(2) and their receptors and binding proteins. *Biochim Biophys Acta*. **2000**, *1488*(1-2), 59-70.
- [9] Lambeau, G.; Lazdunski, M. Receptors for a growing family of secreted phospholipases A2. *Trends Pharmacol Sci*. **1999**, *20*(4), 162-70.
- [10] Boilard, E.; Rouault, M.; Surrel, F.; Le Calvez, C.; Bezzine, S.; Singer, A.; Gelb, M.H.; Lambeau, G. Secreted phospholipase A2 inhibitors are also potent blockers of binding to the M-type receptor. *Biochemistry*, **2006**, *45*(44), 13203-13218.
- [11] Oliveira, S.C.B.; Fonseca, F.V.; Antunes, E.; Camargo, E.A.; Morganti, R.P.; Aparício, R.; Toyama, D.O.; Beriam, L.O.; Nunes, E.V.; Cavada, B.S.; Nagano, C.S.; Sampaio, A.H.; Nascimento, K.S.; Toyama, M.H. Modulation of the pharmacological effects of enzymatically-active PLA2 by BTL-2, an isolectin isolated from the *Bryothamnion triquetrum* red alga. *BMC Biochem*. **2008**, *6*, 9-16.
- [12] Dua, R.; Cho, W. Inhibition of human secretory class II phospholipase A2 by heparin. *Eur J Biochem*, **1994**, *221*(1), 481-490.
- [13] Diccianni, M.B.; McLean, L.R.; Stuart, W.D.; Mistry, M.J.; Gil, C.M.; Harmony, J.A. Porcine pancreatic phospholipase A2 isoforms: differential regulation by heparin. *Biochim Biophys Acta*. **1991**, *1082*(1), 85-93.
- [14] Scott, D.L.; Sigler, P.B. Structure and catalytic mechanism of secretory phospholipases A2. *Adv Protein Chem*. **1994**, *45*, 53-88.
- [15] Patel, H.V.; Vyas, A.A.; Vyas, K.A.; Liu, Y.S.; Chiang, C.M.; Chi, L.M.; Wu, W. Heparin and heparan sulfate bind to snake cardiotoxin sulfated oligosaccharides as a potential target for cardiotoxin action. *J. Biol. Chem*. **1997**, *272*(3), 1484-1492.
- [16] Vyas, A.A.; Pan, J.J.; Patel, H.V.; Vyas, K.A.; Chiang, C.M.; Sheu, Y.C.; Hwang, J.K.; Wu, W. Analysis of binding of cobra cardiotoxins to heparin reveals a new beta-sheet heparin-binding structural motif. *J. Biol. Chem*. **1997**, *272*(15), 9661-9670.

- [17] Toyama, M.H.; de Oliveira, D.G.; Beriam, L.O.S.; Novello, J.C.; Rodrigues-Simioni, L.; Marangoni, S. Structural, enzymatic and biological properties of new PLA(2) isoform from *Crotalus durissus terrificus* venom. *Toxicon*. **2003**, *41*(8), 1033-1038.
- [18] Wen-Hwa, L.; Toyama, M.H.; Soares, A.M.; Giglio, J.R.; Marangoni, S.; Polikarpov, I. Crystallization and preliminary X-ray diffraction studies of piratoxin III, a D-49 phospholipase A(2) from the venom of *Bothrops pirajai*. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallog.* **1999**, *55*, 1229–1230.
- [19] Toyama, M.H.; Toyama, D.O.; Passero, L.F.; Laurenti, M.D.; Corbett, C.E.; Tomokane, T.Y.; Fonseca, F.V.; Antunes, E.; Joazeiro, P.P.; Beriam, L.O.; Martins, M.A.; Monteiro, H.S.; Fonteles, M.C. Isolation of a new L-amino acid oxidase from *Crotalus durissus cascavella* venom. *Toxicon*. **2006**, *47*, 47–57.
- [20] Souza, K.L.A.; Elsner, M.; Mathias, P.C.F.; Lenzen, S.; Tiedge, M. Cytokines activate genes of the endocytotic pathway in insulin-producing RINm5F cells. *Diabetologia*. **2004**, *47*:7, 1292-1302.
- [21] Tiedge, M.; Lortz, S.; Drinkgern, J.; Lenzen, S. Relation between antioxidant enzyme gene expression and antioxidative defense status of insulin-producing cells. *Diabetes*, **1997**, *46*, 1733–1742.
- [22] Henrikson, R. L.; Krueger, E. T.; Keim, P. S. Amino acid sequence of phospholipase A2- α from the venom of *Crotalus adamanteus*: A new classification of phospholipase A2 based upon structural determinants. *J. Biol. Chem.* **1977**, *252*, 4913–4921.
- [23] Passero, L.F.; Tomokane, T.Y.; Corbett, C.E.; Laurenti, M.D.; Toyama, M.H. Comparative studies of the anti-leishmanial activity of three *Crotalus durissus ssp.* venoms. *Parasitol. Res.* **2007**, *101*(5), 1365-1371.
- [24] Passero, L.F.; Laurenti, M.D.; Tomokane, T.Y.; Corbett, C.E.; Toyama, M.H. The effect of phospholipase A2 from *Crotalus durissus collilineatus* on *Leishmania (Leishmania) amazonensis* infection. *Parasitol. Res.* **2008**, *102*(5), 1025-1033.
- [25] Nogueira, T.C.; Ferreira, F.; Toyama, M.H.; Stoppiglia, L.F.; Marangoni, S.; Boschero, A.C.; Carneiro, E.M. Characterization of the insulinotropic action of a phospholipase A2 isolated from *Crotalus durissus collilineatus* rattlesnake venom on rat pancreatic islets. *Toxicon*. **2005**, *45*(2), 243-248.
- [26] Ponce-Soto, L.A.; Toyama, M.H.; Hyslop, S.; Novello, J.C.; Marangoni, S. Isolation and preliminary enzymatic characterization of a novel PLA2 from *Crotalus durissus collilineatus* venom. *J. Protein Chem.* **2002**, *21*(3), 131-136.

- [27] Câmara, P.R.; Esquisatto, L.C.; Camargo, E.A.; Ribela, M.T.; Toyama, M.H.; Marangoni, S.; De Nucci, G.; Antunes, E. Inflammatory oedema induced by phospholipases A₂ isolated from *Crotalus durissus* sp. in the rat dorsal skin: a role for mast cells and sensory C-fibers. *Toxicon*. **2003**, *41*(7), 823-829.
- [28] Amora, D.N.; Sousa, T.M.; Martins, A.M.; Barbosa, P.S.; Magalhães, M.R.; Toyama, M.H.; Fonteles, M.C.; de Menezes, D.B.; Monteiro, H.S. Effects of *Crotalus durissus collilineatus* venom in the isolated rat kidney. *Toxicon* **2006**, *47*(3), 260-264.
- [29] Toyama, M.H.; Toyama, D.O.; Joazeiro, P.P.; Carneiro, E.M.; Beriam, L.O.S.; Marangoni, S.; Boschero, A.C. Biological and structural characterization of a New PLA₂ from the *Crotalus durissus collilineatus* venom. *Protein J.* **2005**, *24*(2), 103-112.
- [30] de Oliveira, A.H.; Giglio, J.R.; Andrião-Escarso, S.H.; Ito, A.S.; Ward, R.J. A pH-induced dissociation of the dimeric form of a lysine 49-phospholipase A₂ abolishes Ca²⁺-independent membrane damaging activity. *Biochemistry*. **2001**, *40*(23), 6912-6920.
- [31] Singh, G.; Gourinath, S.; Sarvanan, K.; Sharma, S.; Bhanumathi, S.; Betzel, Ch.; Yadav, S.; Srinivasan, A.; Singh, T.P. Crystal structure of a carbohydrate induced homodimer of phospholipase A₂ from *Bungarus caeruleus* at 2.1 Å resolution. *J. Struct. Biol.* **2005**, *149*, 264-272.
- [32] Kini, R.M.; Evans, H.J. A model to explain the pharmacological effects of snake venom phospholipases A₂. *Toxicon*. **1989**, *27*, 613-635.
- [33] Gutiérrez, J.M.; Lomonte, B. Phospholipase A₂ myotoxins from *Bothrops* snake venoms. *Toxicon*. **1995**, *33*, 1405-142.
- [34] Ownby, C.L.H.; Selistre de Araujo, S.; White, S. P.; Fletcher, J. E. Lysine 49 phospholipase A₂ proteins. *Toxicon*. **1999**, *37*, 411-445.
- [35] Stiles, B.G.; Choumet, V. Antibody studies with venom phospholipases. In: R.M. Kini, Editor, *Venom Phospholipase A₂ Enzymes: Structure, Function and Mechanism*, Wiley, Chichester, England, **1997**, 223-244.
- [36] Lu, Q.M.; Jin, Y.; Wei, J.F.; Wang, W.Y.; Xiong, Y.L. Biochemical and biological properties of *Trimeresurus jerdonii* venom and characterization of a platelet aggregation-inhibiting acidic phospholipase A₂. *J Nat Toxins*. **2002**, *11*(1), 25-33.
- [37] Iatridis, S.G.; Iatridis, P.G.; Markidou, S.G.; Ragatz, B.H.. Inhibition of human platelet aggregation by phospholipase-A. *Thromb Res*. **1976**, *9*(4), 335-44.

- [38] Santoro, M.L.; Sousa-e-Silva, M.C.C.; Gonçalves, L.R.C.; Santos, S.M.A.; Cardoso, D.F.; Ferreira, I.L.L.; Saiki, M.; Peres, C.A.; Martins, I.S.S. Comparison of the biological activities in venoms from three subspecies of the South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*, *C. durissus cascavella* and *C. durissus collilineatus*). *Comp. Biochem. Physiol. C*. **1999**, 122, 61–73.
- [39] Leung, L.; Nachman, R. Molecular mechanisms of platelet aggregation. *Annu Rev Med*. **1986**, 37, 179-186.
- [40] dos Santos, M.L.; Fagundes, F.H.R.; Teixeira, B.R.F.; Toyama, M.H.; Aparício, R. Purification and Preliminary Crystallographic Analysis of a New Lys49-PLA2 from *B.jararacussu*. *Int J Mol Sci*. **2008**, 9, 736-750.
- [41] Jabeen, T.; Singh, N.; Singh, R.K.; Jasti, J.; Sharma, S.; Kaur, P.; Srinivasan, A.; Singh, T.P. Crystal Structure of a Heterodimer of Phospholipase A2 from *Naja naja sagittifera* at 2.3 Å Resolution Reveals the Presence of a New PLA2-Like Protein with a Novel Cys 32–Cys 49 Disulphide Bridge with a Bound Sugar at the Substrate-Binding Site. *Proteins*. **2006**, 62, 329–337.

8. Figure Legends.

Figure 1. Reverse Phase HPLC profile. The run was monitored by absorbance readings at 280 nm and the elution was conducted using a discontinuous linear gradient of an aqueous solution of 66% acetonitrile at a constant flow rate of 1 mL/min. Samples were previously dissolved in buffer A (0.1% TFA) that was used to equilibrate the column. In the insert (Figure 1b), we observed the SDS-PAGE of the purified fraction.

Figure 2. Mass spectrometry showed that the molecular mass of PLA2 was 14635.67 (a) while the PLA2 glycosylated to D-Glucose, D-Galactose and D-Lactose showed the molecular masses of 15726.64 (b), 14645.35 (c) and 16373.17 (d), respectively.

Figure 3. (a) PLA2 activity was measured (Holzer and Mackessy, 1996). The standard assay mixture contained 200 µL of buffer, 20 µL of substrate, 20 µL of water, and 20 µL of PLA2 (1 mg/mL) in a final volume of 260 µL. After the addition of PLA2, the mixture was incubated for 20 min at 37 °C and monitored by absorbance readings at 425 nm using a SpectraMax 340 multiwell plate reader (Molecular Devices). (b) The SDS-PAGE showed that the samples are pure presenting a band at 14kDa. Only the PLA2 glycosylated to D-Lactose has a discrete band at 28kDa too, probably a homodimerization.

Figure 4. (a) The washed platelets assay was performed with venous blood collected from healthy volunteers. Aggregations were performed in 10 μ g amount (in 20 μ L) of non-glycated or glycated PLA2. (b) PLA2+Lactose induced lower aggregation. Native non-glycated PLA2, PLA2+Galactose and PLA2+Glucose induced high aggregation at the same concentration (n = 5).

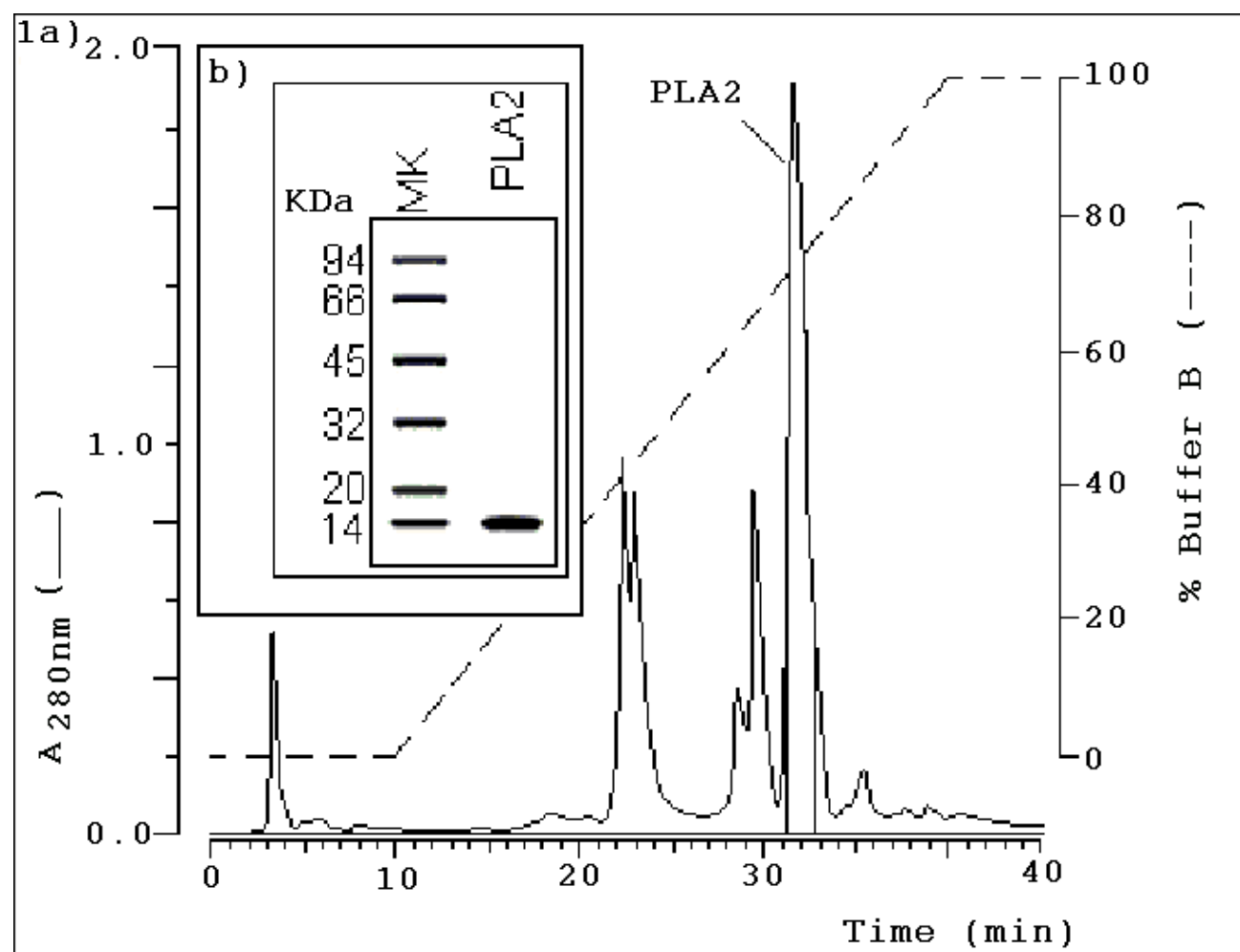
Figure 5. (a),(b) The paw edema was induced by a single subplantar injection of 25 μ L of PLA2 (25 μ g/paw). Paw volume was measured using a hydroplethysmometer (model 7150, Ugo Basile, Italy). Results were expressed as the increase in paw volume (mL) and calculated by subtracting the basal volume. The area under the curve was also calculated (n = 5). The PLA2 induced an evident inflammation, however, the glycated PLA2 showed a higher edematogenic effect indicating that the biological activity of PLA2 was modified by the sugars.

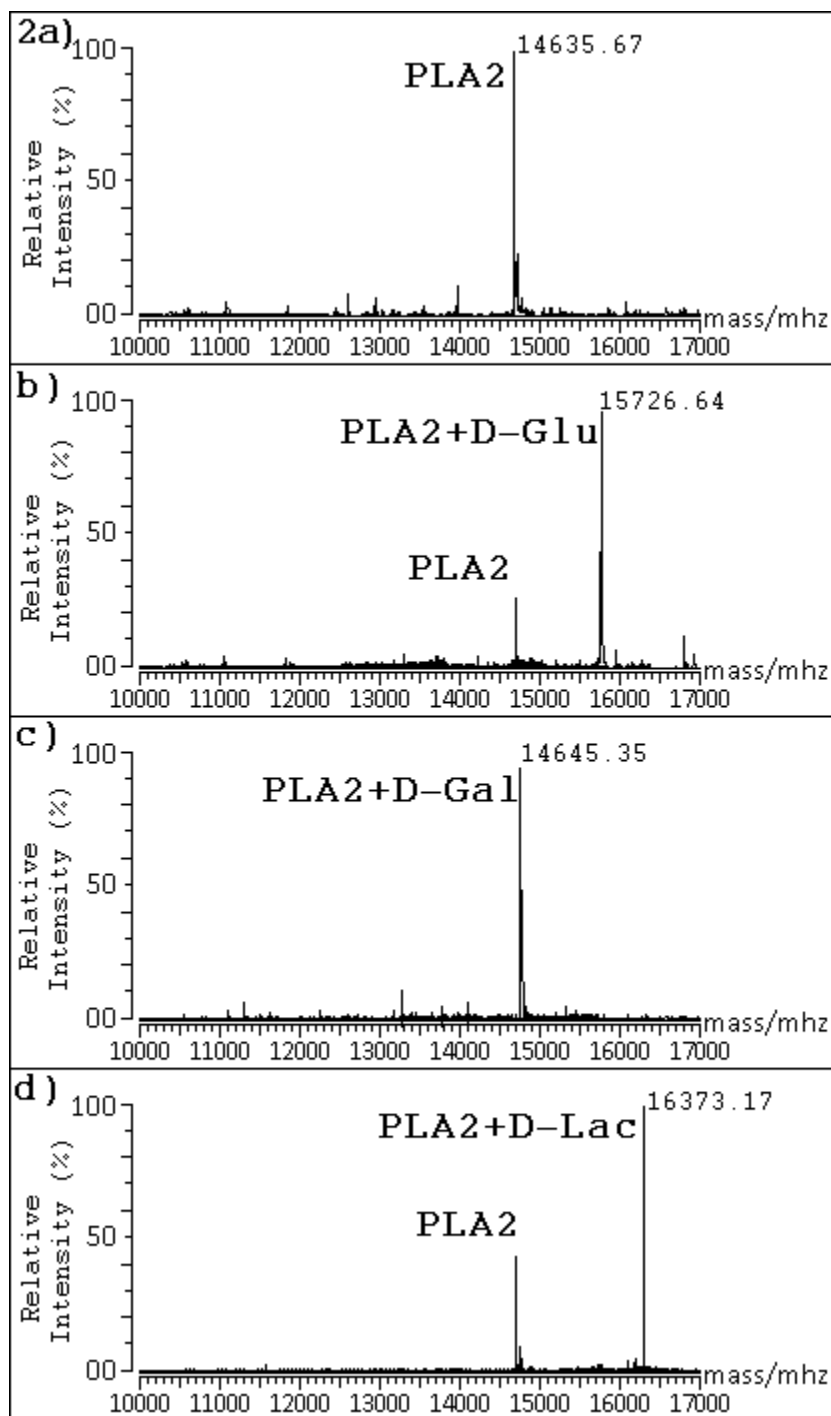
Figure 6. (a) Plasma creatine kinase (CK) activity was measured using a CK-UV kinetic kit (Sigma Chemical Co). The glycated or non-glycated PLA2 (1 μ g/ μ L) was injected intramuscularly (25 μ L, n = 5). After one hour, a blood sample was collected from the tail in heparinised capillary tubes and centrifuged for plasma separation. The myotoxic effect was expressed as U/L and the results were expressed as mean of four experiments with $p < 0.05$. (b) Effect of native or previously glycated PLA2 on the N2A cells line over three days. (c) Cytotoxic effect of non-glycated PLA2 and PLA2 glycated with D-Galactose, D-Glucose and D-Lactose on RIN m5F cells (RIN) and RINm5F cells which have been transfected stably with the catalase gene (Kat). In both assays, the results were expressed as mean of three experiments with $p < 0.05$.

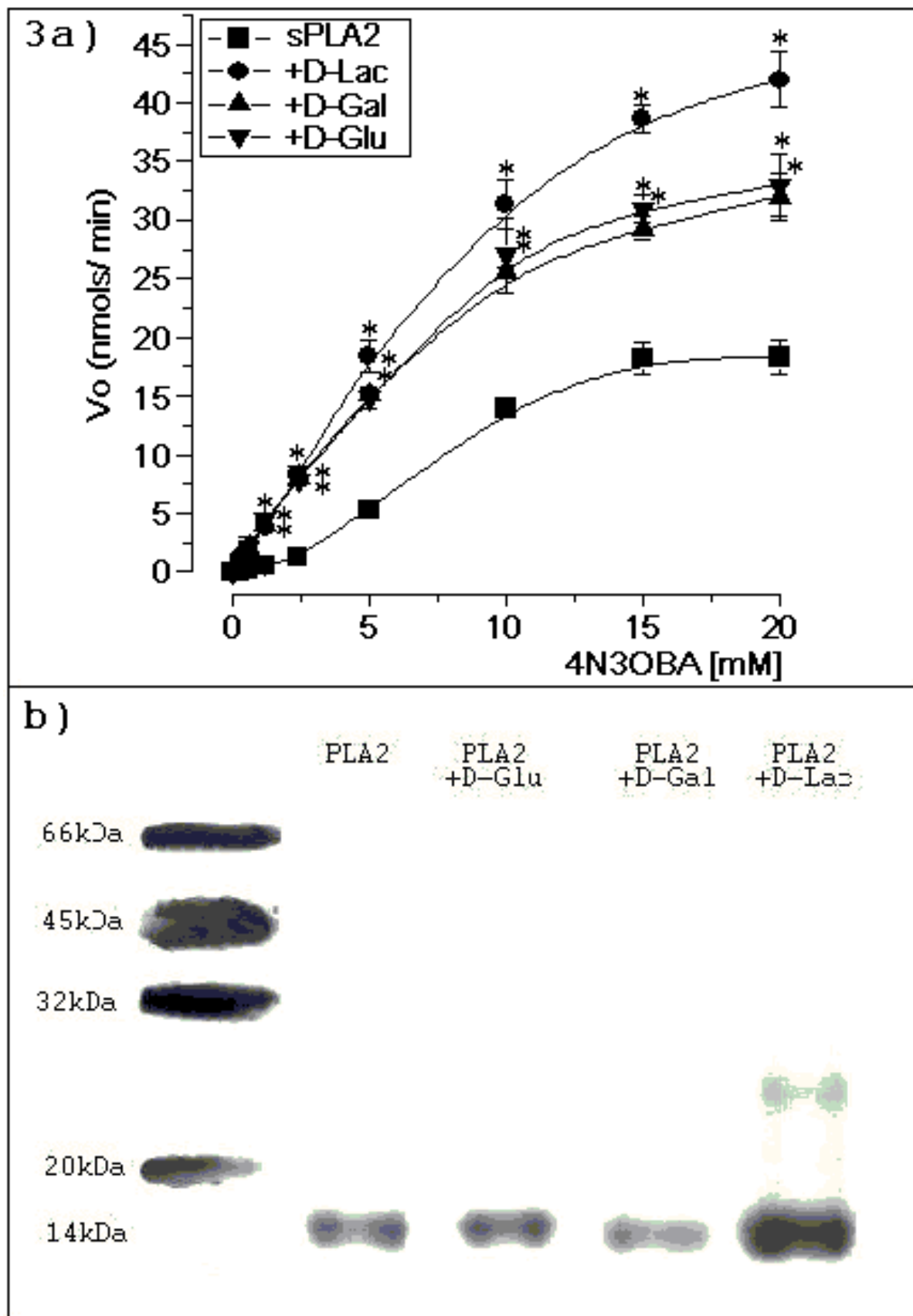
Figure 7. The Circular dichroism analysed the PLA2 in a wavelength range between 190 nm to 250 nm. When compared to the spectra of native PLA2, the spectra of the glycated PLA2 presented differences in the absorbance of the samples around 210 nm to 240 nm, which may indicate a change in the secondary structure of the protein.

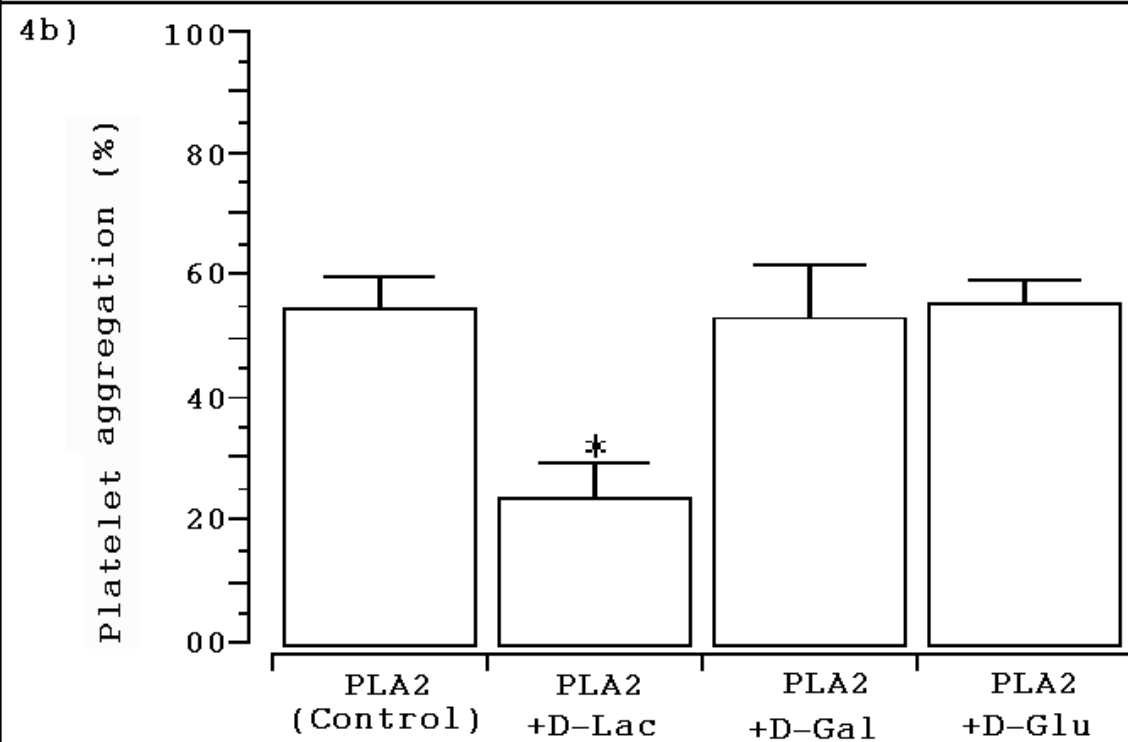
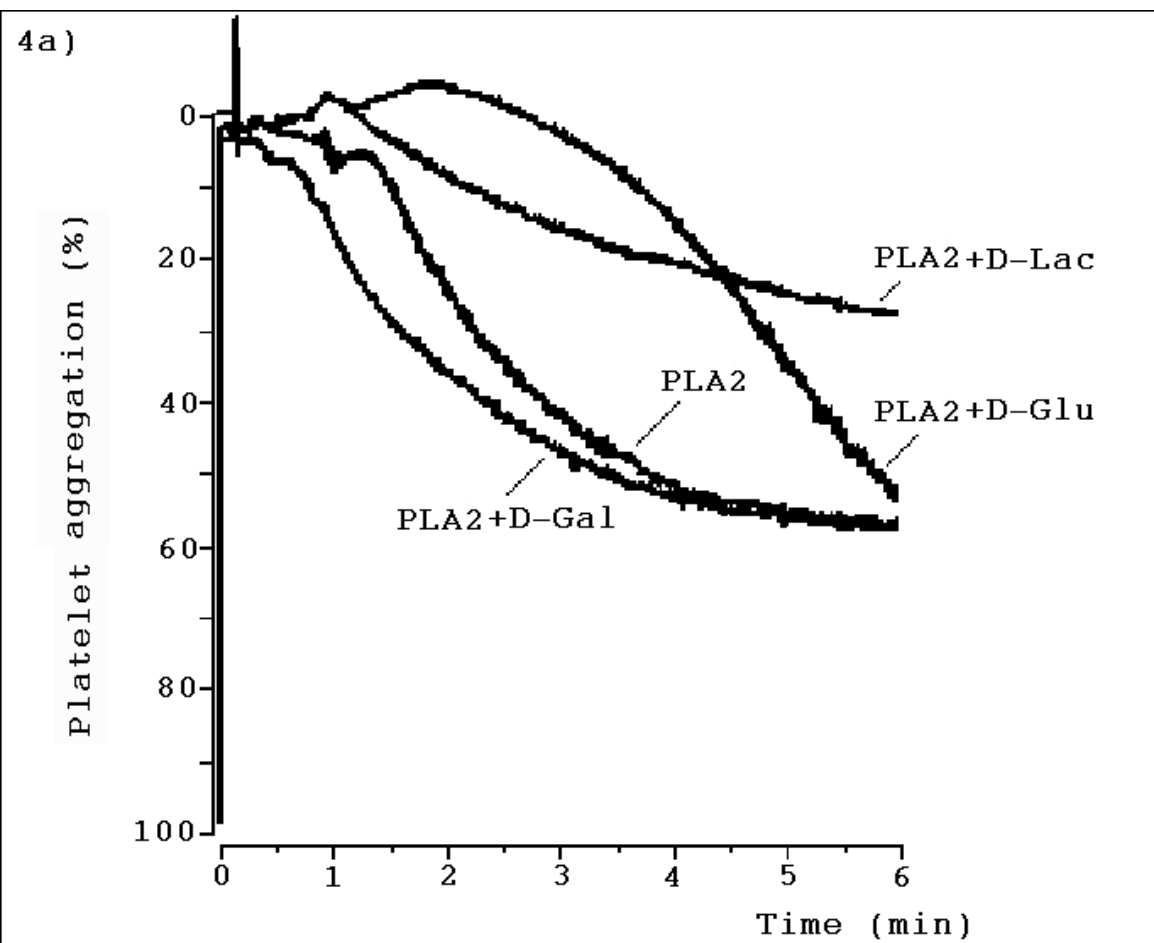
Figure 8. The model of PLA2 from the *Crotalus durissus collilineatus* predicted by energy minimization analysis of its primary fitted onto a high-resolution X-ray structure of the homologous 1BJJ_A.

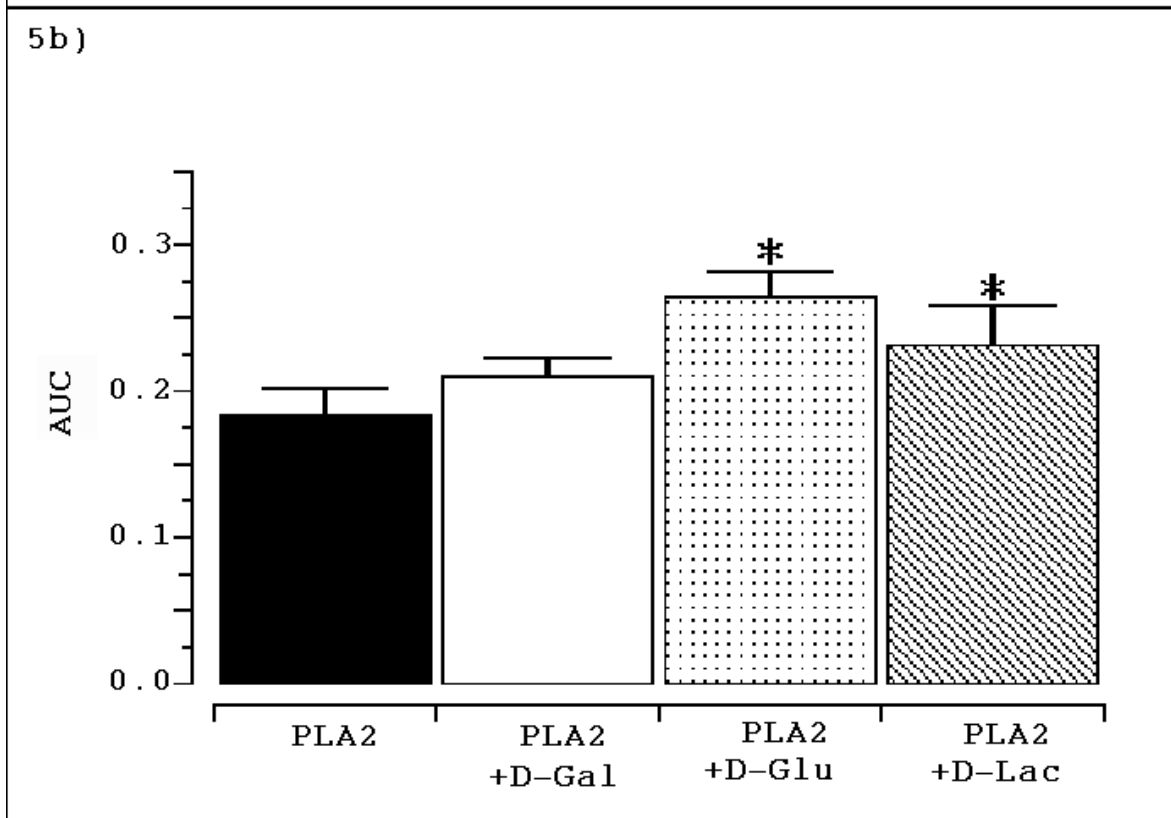
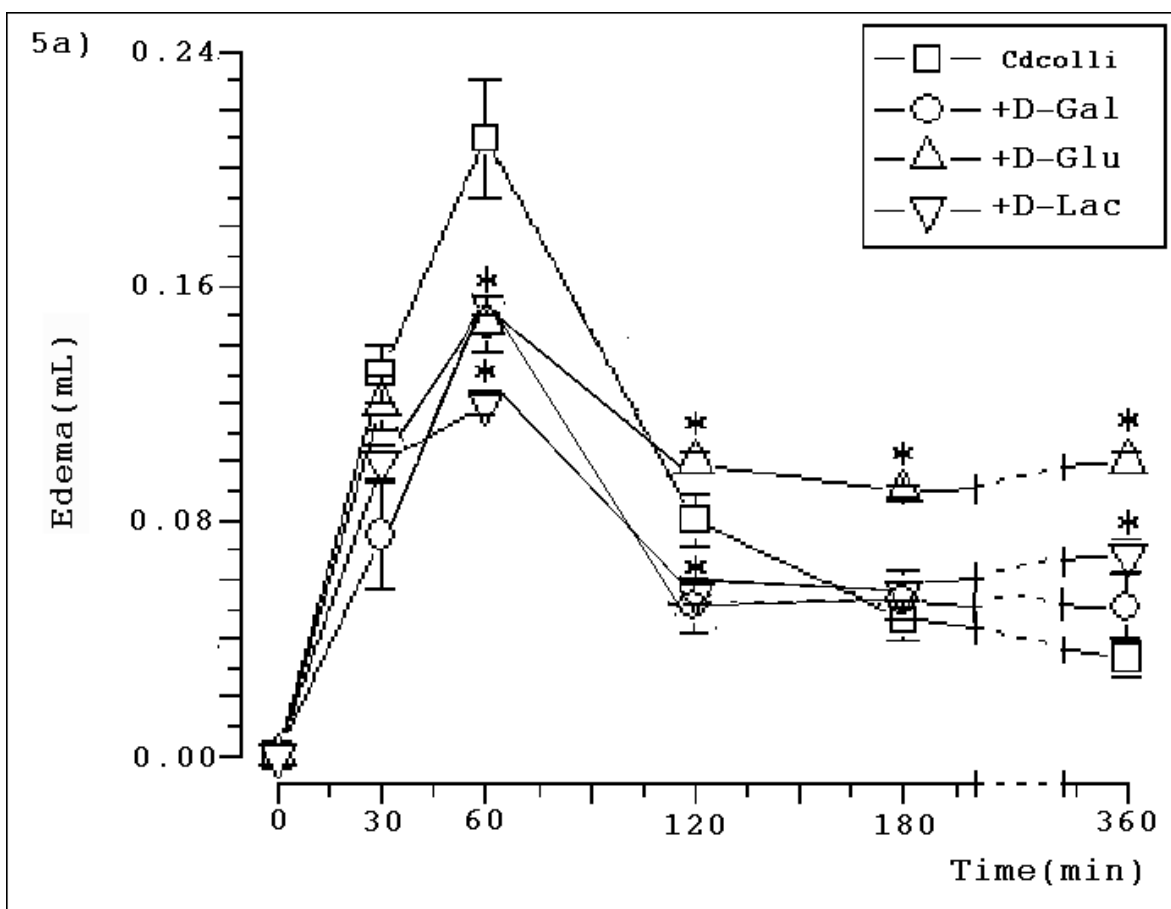
Figures:

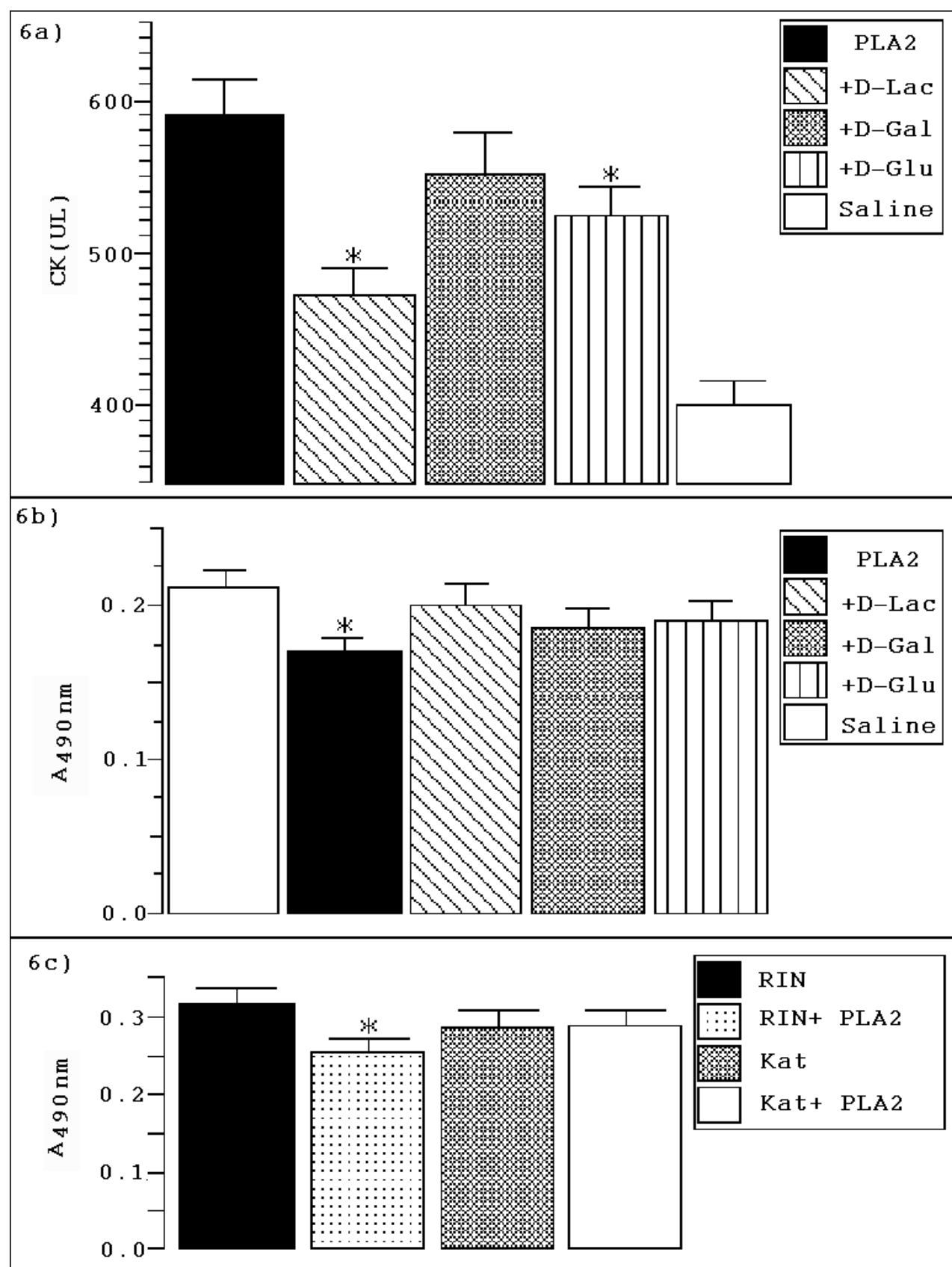




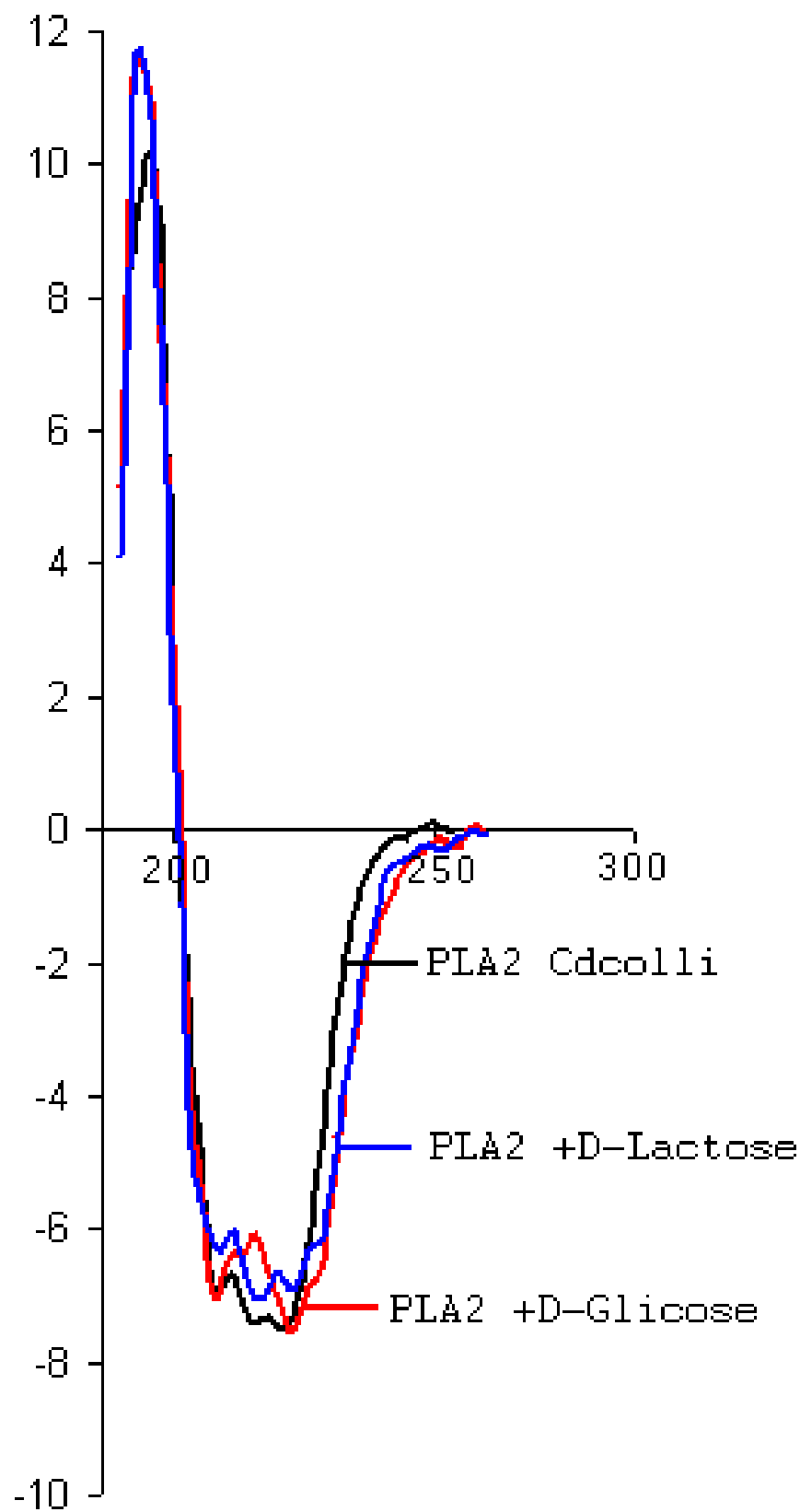








7)



8)

