

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA



VICTOR CORASOLLA CARREGARI

Caracterização bioquímica e estudo da atividade farmacológica na junção neuromuscular de uma fosfolipase A<sub>2</sub> isolada do veneno de

*Bothriopsis bilineata*

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo(a) candidato (a)  
VICTOR CORASOLLA CARREGARI  
e aprovada pela Comissão Julgadora.

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

A handwritten signature in cursive script, reading "Sergio Marangoni".

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Marangoni

Co-orientador: Prof. Dr. Luís Alberto Ponce Soto

Campinas - SP

2011

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP

C232c

Carregari, Victor Corasolla  
Caracterização bioquímica e estudo da atividade  
farmacológica na junção neuromuscular de uma fosfolipase  
A2 isolada do veneno de *Bothriopsis bilineata* / Victor  
Corasolla Carregari. – Campinas, SP: [s.n.], 2011.

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

1. *Bothriopsis bilineata*. 2. Fosfolipase A2. 3.  
Neurotoxicologia. 4. Edema. I. Marangoni, Sérgio. II.  
Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia.  
III. Título.

(rcdt/ib)

**Título em inglês:** Biochemical characterization and study of the pharmacological activity in the junction neuromuscular of an isolated miotoxina from the *Bothriopsis bilineata* venom.

**Palavras-chave em inglês:** *Bothriopsis bilineata*; Phospholipase A2; Neurotoxicology; Edema.

**Área de concentração:** Bioquímica.

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

**Banca examinadora:** Sérgio Marangoni, Marcelo Lancelloti, Celene Fernandes Bernardes.

**Data da defesa:** 10/02/2011.

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

Campinas, 10 de fevereiro de 2011

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Marcelo Lancellotti

  
Assinatura

Prof. Dr. Sérgio Marangoni

  
Assinatura

Profa. Dra. Celene Fernandes Bernardes

  
Assinatura

Profa. Dra. Léa Rodrigues Simioni

Assinatura

Profa. Dra. Daniela Carla da Silva Damico

Assinatura

## **Agradecimentos**

Agradeço ao Prof.Dr. Sergio Marangoni pela oportunidade e acolhimento no laboratório de química de proteínas, que me permitiu desenvolver este projeto, pela orientação e ensinamentos ao longo do meu desenvolvimento acadêmico e pela amizade ao longo destes anos de convívio.

Agradeço ao Prof.Dr. Luis Alberto Ponce Soto, pelo auxílio e co-orientação neste trabalho.

Agradeço ao técnico Paulo Aparecido Baldasso, pelo auxílio, ensinamentos, e colaboração na execução deste trabalho, além da amizade conquistada.

Agradeço aos colegas do LAOUIP, que sempre se puseram dispostos a me ajudar a realizar experimentos e tirar dúvidas em relações ao tema deste trabalho.

Agradeço à minha família por todo o apoio e entrega para que eu pudesse alcançar as minhas conquistas, me oferecendo educação de qualidade, respeito e toda a base de caráter que hoje possuo e que me permitiram realizar este trabalho.

Agradeço à minha namorada Alessandra Cristina Jorge da Silva pelo apoio nas horas difíceis, na paciência e no carinho durante o período da confecção deste trabalho.

Agradeço aos prof(a)s, Celene Fernandes Bernardes, Marcelo Lancellotti e Léa Rodrigues Simioni, por serem parte da minha qualificação e da minha defesa da dissertação, onde suas correções enriqueceram o trabalho, e proporcionaram a confecção final da dissertação.

Agradeço aos amigos, que sempre estiveram ao meu lado, e sempre foi parte da minha vida, ajudando a enfrentar as dificuldades e a dividir as alegrias.

Agradeço à FAPESP pelo apoio financeiro.

## Índice

Resumo.....	x
Abstract .....	xi
1. INTRODUÇÃO .....	1
1.1 Acidentes Ofídicos.....	1
1.2 Aspectos gerais dos venenos .....	1
1.3 Fosfolipase A <sub>2</sub> .....	4
1.5 Miotoxinas.....	10
1.6 Neurotoxinas.....	11
1.14 <i>Bothriopsis bilineata</i> .....	21
2. OBJETIVOS.....	22
3. MATERIAIS E MÉTODOS .....	23
3.1 Veneno .....	23
3.2 Animais.....	23
3.2 Purificação das toxinas de <i>Bothriopsis bilineata</i> .....	23
3.2.1 Cromatografia de Exclusão Molecular Sephadex G-75.....	23
3.2.2 HPLC de fase reversa .....	23
3.3 Eletroforese em PAGE-SDS.....	24
3.4 Análise de aminoácidos .....	24
3.5 Seqüenciamento N-terminal .....	24
3.6 Análise por Espectrometria de Massas Maldi-Tof (MS).....	25
3.7 Atividade Fosfolipásica A <sub>2</sub> .....	25
3.8 Efeito da concentração de substrato na atividade PLA <sub>2</sub> .....	25
3.9 Efeito do pH na atividade PLA <sub>2</sub> .....	25
3.10 Efeito da temperatura na atividade PLA <sub>2</sub> .....	25
3.11 Efeito dos íons divalentes na atividade PL A <sub>2</sub> . .....	26
3.12 Efeito inibitório por crotapotinas crotálicas .....	26
3.13 Medida da atividade neurotóxica em músculo biventer cervicis de pintainho .....	26
3.14 Determinação do efeito citotóxico em cultura celular de mioblastos e miotubos (C2C12) da PLA <sub>2</sub> BbilTX isolada a partir do veneno de <i>Bothriopsis bilineata</i> . .....	27
3.15 Determinação da atividade inflamatória (Edema de pata). .....	27
3.16 Avaliação do efeito inibitório do fator anti-hemorrágicos DA2-II isolado do soro de <i>Didelphis albiventris</i> sobre as atividades biológicas da miotoxina isolada. ....	28

4. RESULTADOS.....	29
4.1 Perfil cromatográfico de exclusão molecular em uma coluna de Sephadex G-75.....	29
4.2 Perfil cromatográfico em HPLC de fase reversa.....	30
4.3 Eletroforese em SDS-PAGE da fracção BbilTX-I.....	31
4.4 Avaliação da atividade PLA <sub>2</sub> .....	32
4.5 Estudos da atividade cinética da PLA <sub>2</sub> BbilTX-I.....	33
4.5.1 Efeito da concentração de substrato na atividade PLA <sub>2</sub> BbilTX-I .....	33
4.5.2 Efeito do pH na atividade da PLA <sub>2</sub> BbilTX-I.....	34
4.5.3 Efeito da Temperatura na Atividade da PLA <sub>2</sub> BbilTX-I.....	35
4.5.4 Efeito de alguns íons na atividade PLA <sub>2</sub> BbilTX-I.....	36
4.5.5 Medida da atividade inibitória da isoforma de crotapotina (F3) de <i>Crotalus durissus cascavella</i> e do fator anti-hemorragico DA2-II isolado do soro de <i>Didelphis albiventris</i> sobre a atividade PLA <sub>2</sub> da BbilTX-I.....	37
4.6. Análise Estrutural .....	38
4.6.1 Análise de Composição de Aminoácidos.....	38
4.6.2 Estudo de homologia seqüencial da região N-terminal .....	39
4.6.3 Espectro de massa da fracção BbilTX-I .....	40
4.7 Estudo da atividade neurotóxica na preparação biventer cervicis de pintainho da Fracção BbilTX-I de <i>Bothriopsis bilineata</i> .....	41
4.8 Contraturas induzidas por Acetilcolina (ACh) e Potássio (KCl) em preparações biventer cervicis de pintainho (BCD) antes e após a adição da PLA <sub>2</sub> BilTX-I.....	43
4.9 Determinação da atividade inflamatória (Edema de pata) induzida pela fracção BilTX-I.....	44
4.10 Medida da atividade inibitória da isoforma de crotapotina (F3) de <i>Crotalus durissus cascavella</i> e do fator anti-hemorragico isolado de soro de <i>Didelphis albiventris</i> (DA2-II) sobre a atividade edematizante (inflamatória) da PLA <sub>2</sub> BbilTX-I.....	45
4.10 Estudo do efeito citotóxico através dos níveis de LDH em cultura celular de mioblastos e miotubos (C2C12).....	46
5. DISCUSSÃO.....	47
6. CONCLUSÕES .....	57
7. BIBLIOGRAFIA.....	58

## Lista de Abreviações

### Lista de Abreviações – Cromatografias.

Sephadex G-75	Coluna de exclusão molecular com matriz composta de dextrano
HPLC	High (Pressure/ Performace) Liquid Chromatographv
RP HPLC	Reverse Phase HPLC (HPLC de Fase Reversa)
C18	18 High Carbon Load. High activitv silica
u-Bondapack C18	Coluna de HPLC com n-octadecvl como base da fase estacionária

### Lista de Abreviações - Reagentes. Sais. Tampões.

AMBIC	Bicarbonato de Amônio
DTT	Ditiotreitol
PAGE	Eletroforese em Gel de poliacrilamida
PBS	Tampão fosfato em salina
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio. Lauril Sulfato de Sódio
Tampão A	TFA 0.1% utilizado para cromatografia de HPLC-RP
Tampão B	Acetonitrila 66% utilizado em cromatografia de HPLC-RP
TCA	Ácido Tricloroacético
TFA	Ácido trifluoracético
Tris	TrisHidroximetilaminometano

## Lista de Abreviações – Símbolos e siglas

280nm	Absorbância no comprimento de onda de 280nm
pmol	Picomol ( $10^{-12}$ moles)
µg	Micrôgrama ( $10^{-6}$ gramas)
µL	Micrôlitro ( $10^{-6}$ litros)
Cm	Centímetro
Da	Dalton – unidade de peso – aproximadamente o peso molecular de um átomo de Hidrogênio.
M	Molar – unidade de concentração (mole/litro)
mM	Milimolar ( $10^{-6}$ Molar)
MALDI-TOF	Dessorção a laser assistida por matriz
m/v	Porcentagem ou Proporção de massa/volume.
PAGE	Eletroforese em Gel de poliacrilamida.
Pico-Tag	Sistema Geral de análise de aminoácidos composto por uma estação de trabalho para hidrólise e derivatização de aminoácidos e por um sistema cromatográfico HPLC de separação, detecção e análise dos aminoácidos derivatizados.
RPM	Rotacões por minuto
BbitX-I	PLA <sub>2</sub> isolada do veneno de serpente <i>Bothrops bilineata</i>
v/v	Porcentagem ou Proporção de volume/volume



## Lista de Abreviações – aminoácidos

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

## Resumo

O presente trabalho apresenta a purificação e caracterização bioquímica de uma nova PLA<sub>2</sub> neurotóxica nomeada BbilTX-I isolada do veneno da serpente *Bothriopsis bilineata*. Esta proteína foi purificada através de dois passos cromatográficos, em Sephadex G75 e HPLC de fase reversa C18 (µBondapak Waters). A BbilTX-I é uma PLA<sub>2</sub>D49, com elevada atividade catalítica, massa molecular de 14185,48 Da, e alta similaridade na sua sequência N-terminal com outras PLA<sub>2</sub> de veneno de serpentes.

A temperatura ótima para a atividade enzimática da BbilTX-I está entre 25°C e 37°C. A fração BbilTX-I é cálcio dependente e tem a atividade enzimática bastante diminuída quando testada com íons divalentes. Da mesma forma como outras PLA<sub>2</sub> descritas na literatura, a BbilTX-I mostra o pH ótimo em torno de 8. A fração F3 isoladas de crotapotinas crotálicas e a fração DA2-II extraída do soro de *Didelphis albiventris* apresentaram um efeito inibitório de mais de 50% sobre a atividade enzimática da toxina BbilTX-I.

O efeito da concentração do substrato 4-nitro-3-(octanoiloxi) ácido benzóico sobre a atividade enzimática da BbilTX-I demonstrou que a toxina é uma enzima monomérica com tendência alostérica sugerindo provavelmente um mecanismo de cooperatividade positiva mnemônica.

A PLA<sub>2</sub> BbilTX-I inserida em preparação isolada de biverter cervicis de pintainho apresentou um efeito bloqueador da transmissão nervosa na junção neuromuscular, em doses de 10, 20, 30 e 50 µg/ml e causou 50% de bloqueio em 20 minutos com 10 µg/ml, 30 minutos com 20 µg/ml, 22 minutos com 30 µg/ml e 20 minutos com 50 µg/ml. Como não houve alteração significativa na resposta ao KCl (usado para detectar danos na membrana celular) e à Acetilcolina (usada para identificar atividade sobre os receptores colinérgicos nicotínicos) podemos dizer que a PLA<sub>2</sub> BbilTX-I é uma neurotoxina pré-sináptica não miotóxica, que atua no terminal nervoso da sinapse neuromuscular interferindo sobre a liberação da ACh.

A crotapotina F3 isolada do veneno da serpente *Crotalus durissus cascavella* e o fator anti-hemorrágico DA2-II isolado do soro de *Didelphis albiventris* inibiram em 64% e 57% respectivamente a atividade edematizante da fração BbilTX-I demonstrando que a ação inflamatória desta proteína é dependente de sua ação catalítica.

## Abstract

In this present work we described the purification and functional characterization of a new neurotoxic PLA<sub>2</sub>, named BbilTX-I from *Bothrops bilineata* snake venom. This protein was purified by the combination of two chromatographic steps. Molecular Exclusion on a Sephadex G-75 column and Reverse Phase HPLC (RP-HPLC) on a C18  $\mu$ -Bondapak (Waters) column. BbilTX-I is a monomeric PLA<sub>2</sub>-D49 showing high purity degree in SDS-PAGE in both reducing and non-reducing conditions. The purity of the toxin was confirmed by MALDI-TOF mass spectrometry and shows a molecular mass of 14185.48 Da.

BbilTX-I posses a high catalytic activity upon 4-nitro-3-(octanoiloxi) benzoic acid as a substrate compare with other bothropic PLA<sub>2</sub>. The optimal temperature and pH for BbilTX-I catalytic activity was determinate between 25-37 °C and around 8, respectively. This PLA<sub>2</sub> is Ca<sup>+2</sup> dependent but others divalent ions significantly reduce its catalytic activity, when pre-incubated with the protein. Also were tested the effects of fraction F3, crotaoetin from *Crotalus durrisus cascavela*, and anti-hemorrhagic factor DA2-II from *Didelphis albiventris* opossum sera under optimal conditions: both fraction showed an inhibitory effect over the BbilTX-I catalytic activity.

At different concentrations of the substrate this monomeric PLA<sub>2</sub> show an allosteric behavior suggesting a positive cooperative mnemonical enzyme mechanism in the catalysis.

BbilTX-I showed an inhibitor effect on neuromuscular nerve transmissions on the isolated chick muscle biventer cervicis. At doses at 10, 20, 30 and 50 $\mu$ g/ml it elicited a blockade of 50% at times of 20, 30, 22 and 20 minutes, respectively. The effect displayed by BbilTX-I did not interfere with the responses evoked by the addition of KCl (cell membrane damage) and Ach (functionality of cholinergic receptors), thus, we can argue that BbliTX-I is a pre-synaptic neurotoxin impairing the Ach liberation.

BbilTX-I shows itself as an edematogenic PLA<sub>2</sub> when injected in the mouse right footpad. it elicited a 70% higher than of edema when compare with the control. The edematogenic activity of this PLA<sub>2</sub> is related to its catalytic activity since both are inhibited by F3 crotaoetin and DA2-II, 64 and 57% respectively.

The reproducibility of biological activity, through the pharmacologic effects, only is possible by the use of chemically homogeneous fractions that hold biological function integrity. This fraction was obtain with high efficiency methodologies like HPLC, mass spectrometry, this

result can be associated with the biological activity, disregarding the subjectivity caused by the whole venom or by impure fractions.

This kind of methodologies can be applied to biochemical, structure and function, physiological and pharmacological studies, which can reveal unknown mechanism in the function-structure relationship of snake venom PLA<sub>2</sub>.

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 Acidentes Ofídicos

Os acidentes ofídicos constituem-se em um problema de saúde pública principalmente na Ásia, África e em regiões da América Latina. Na América latina, o envenenamento por viperídeos é relevante, não tanto pela sua letalidade mais sim pelos seus efeitos locais, tais como: mionecrose, dermonecrose, hemorragia, edema, dor e em casos moderados e severos levam a alterações sistêmicas como coagulopatias, sangria, choque cardiovascular e insuficiência renal aguda (Gutiérrez e Lomonte, 2003).

O envenenamento ofídico é um evento comum em países tropicais e subtropicais, onde não existe a devida atenção e não há um registro epidemiológico adequado. Recentemente tem sido valorizado o uso de venenos como ferramentas moleculares para o desenvolvimento de pesquisas ou agentes terapêuticos como o Captopril, que foi sintetizado a partir do modelo molecular da toxina isolada do veneno de *Bothrops jararaca* (Harvey *et al.*, 1998).

## 1.2 Aspectos gerais dos venenos

Os venenos de serpentes são misturas complexas de substâncias bioquímicas e farmacologicamente ativas, sendo 90 à 95% do peso seco, compostos protéicos e o restante compreende carboidratos, cátions metálicos, nucleotídeos, aminas biogênicas (bradicinina, histamina, 4-hidroxitriptamina) e níveis menores de aminoácidos livres e lípidios (Kini, 2003).

Dentre os íons, podemos destacar o Cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) que é um importante co-fator da ação de algumas enzimas proteolíticas e das fosfolipases  $A_2$ . O magnésio e o zinco também são importantes íons para a ação das principais metaloproteases do veneno como as “trombina-simile” (Tu, 1991).

Embora serpentes da mesma espécie possam apresentar diferenças em relação à composição de seu veneno, seus componentes parecem ter proporções comuns e similares dentro de uma mesma família, isto é, neurotoxinas são geralmente encontradas no veneno das serpentes pertencentes às famílias Hydrophidae e Elapidae, enquanto que toxinas hemorrágicas e mionecróticas são encontradas no veneno da família Viperidae (Matsui, *et al.*, 2000).

As principais enzimas presentes em venenos de serpentes são classificadas nos seguintes grupos: oxidoredutases, glicosidases, hidrolases, proteases e lipases, sendo, as lipases e proteases alvos da maioria dos estudos. No conjunto das proteases, tem sido isolado

e caracterizado metaloproteases chamadas hemorraginas, abundantes em venenos de serpentes Viperidae principalmente nos gêneros *Bothrops*, que causam lesões do tipo hemorrágicas (Sanches, *et al.* 1987).

No grupo das lipases, as acetilcolinesterases e fosfolipases são as enzimas mais comumente encontradas, sendo as fosfolipases A<sub>2</sub> as enzimas mais estudadas, não somente pelas suas propriedades químicas, mas também por sua importância biológica (Tu, 1991).

Além das enzimas hidrolíticas citadas, o veneno total também possui outras moléculas importantes sem atividade enzimática, como as desintegrinas e as lectinas. As desintegrinas possuem baixo peso molecular, e são ricas em resíduos de cisteínas. Elas contêm uma seqüência de aminoácidos Arg-Gly-Asp reconhecida pelas integrinas que inibem a interação do fibrinogênio com seus receptores. As lectinas possuem a capacidade de aglutinar células, precipitar polissacarídeos e glicoproteínas, pelo fato de se ligarem específica e reversivelmente a determinados carboidratos (Kamiguti *et al.* 1998).

No Brasil, a maioria das serpentes venenosas pertence à família Viperidae (subfamília Crotalinae) e Elapidae. No Brasil, a família Viperidae é representada por 3 gêneros principais: *Crotalus* (cascavéis), *Bothrops* (iararacas) e *Lachesis* (surucucu). O envenenamento por cascavéis frequentemente causa insuficiência respiratória aguda, relacionada à paralisia neuromuscular (Vital Brazil, 1972; Pellegrini Filho e Vital Brazil, 1976).

Desde 1986, o ministério da Saúde tornou obrigatório a notificação dos acidentes ofídicos em todas as unidades da Federação, apesar disso a maior parte dos dados disponíveis sobre a epidemiologia do acidente ofídico é oriundo de sub-notificações, que não refletem o verdadeiro quadro epidemiológico do país. De junho de 2007 à dezembro de 2008 foram notificado ao ministério da Saúde 26.905 casos de acidentes ofídicos. Deste total, 86 % foram causados por serpentes do gênero *Bothrops*, 8% *Crotalus*, 3% *Lachesis*, 1% *Micrurus* e 3% não reconhecidos. A maior parte dos acidentes registrados no ministério da Saúde está na região Sudeste (42.62 %), seguido do Nordeste (16.99%), Centro-Oeste (15.76%), Sul (15.27%) e Norte (9.36%) (Ministério da Saúde, 2008).

As serpentes do gênero *Bothrops*, responsáveis por 70% dos acidentes ofídicos, habitam preferencialmente ambientes úmidos como matas, áreas cultivadas, locais de proliferação de roedores (baióis, celeiros e depósito para ração), em zonas rurais. São animais de hábito crepuscular a noturno onde se tornam mais ativas. As serpentes do gênero *Bothrops* caracterizam-se pela sua agressividade. Possuem uma ampla distribuição geográfica, ocupando diversos ambientes desde os de clima frio (como a Serra da Mantiqueira) até ilhas

isoladas do litoral. No Brasil, conhecem-se cerca de 32 espécies de serpentes do gênero *Bothrops*, destacando-se:

*Bothrops ijararaca*, mais conhecida como ijararaca, é encontrado em todo o território nacional, sendo responsável pela maior parte dos casos ofídicos.

*Bothrops ijararacussu*, conhecida popularmente como ijararacussu, é encontrada principalmente em regiões alagadas (margens de rios, lagoas, brejos), é o maior exemplar de seu gênero e principalmente encontrada na região litorânea do Espírito Santo até Santa Catarina.

*Bothrops alternatus* é também conhecida como urutu cruzeiro, vive preferencialmente em regiões altas e secas, distribuída pelos estados de Minas Gerais até o sul do país.

*Bothrops neuwiedi* é mais conhecida como ijararaca-dintada ou ijararaca do rabo branco sendo encontrada nas regiões secas e se distribui em grande parte do território nacional.

*Bothrops cotiara* conhecida por ijararaca, ijararaca preta e coitiara, distribuída desde de São Paulo até o Rio Grande do Sul.

*Bothrops mooieni* popularmente conhecida como caicara, é encontrada principalmente em regiões secas e quentes, é encontrado nas regiões Sudeste, Centro-Oeste e Nordeste do país.

*Bothrops pradoi* é conhecida nos Estados do Espírito Santo ou da Bahia como ijararaca é a espécie predominante nestes estados.

*Bothrops viraiaí*, tem uma distribuição restrita no sul da Bahia e Norte de Minas Gerais.

*Bothrops erithomelas* é distribuída desde os estados da Bahia até o Estado do Ceará, sendo conhecida nestas regiões como ijararaca da seca.

*Bothrops atrox* conhecida como ijararaca ou como surucucu dependendo da região, tem como habitat regiões quentes e úmidas (florestas) ou em regiões desérticas, possuem uma plasticidade adaptativa muito grande, é o principal causador de acidentes no Norte do Brasil.

O veneno botrópico pode ter ações: hemorrágica, edematogênica, proteolítica, fosfolipásica, necrosante, miotóxica e coagulante. As principais toxinas presentes em venenos botrópico não são igualmente distribuídas entre as diferentes espécies (Ferreira *et al.*, 1992). As duas principais ações são: coagulante e necrosante. A primeira é devido a determinadas frações do veneno total capazes de transformar diretamente fibrinogênio em fibrina (ação coagulante do tipo trombina), mas a maioria dos venenos botrópicos induz a coagulação por

via indireta, ativando o fator X e a protrombina da cascata da coagulação sangüínea (Denson, *et al.* 1972).

### 1.3 Fosfolipase A<sub>2</sub>

As fosfolipases A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) hidrolisam fosfolipídios de membrana na posição *sn*2 liberando lisofosfolipídios e ácidos graxos. O ácido graxo é chamado de ácido araquidônico que uma vez liberado da posição *sn*2 dos fosfolipídios de membrana pela ação da PLA<sub>2</sub>, pode ser metabolizado tanto pela lipooxigenase como por uma das isoformas da ciclooxigenase formando leucotrienos e prostaglandinas respectivamente (Dennis, 2000). A família das fosfolipases A<sub>2</sub> ocorre amplamente na natureza tanto na forma intracelular quanto extracelular.

Historicamente, as primeiras PLA<sub>2</sub>s caracterizadas em detalhes foram as pancreáticas (mamíferos), e as de venenos de serpentes. Essas PLA<sub>2</sub> apresentam alta homologia seqüencial e são evolutivamente relacionadas, formando a superfamília das PLA<sub>2</sub>s de baixo peso molecular divididas nos grupos I e II (Dennis, 1994).

Estudos com mais de 50 PLA<sub>2</sub>s de diferentes filos revelaram características em comum: baixa massa molecular (14 kDa), uma  $\alpha$ -hélice amino terminal anfipática, um “loop” para ligação de Ca<sup>2+</sup>, um sítio ativo e um grande número de pontes de dissulfeto intramolecular (geralmente sete mas existem variações). Estas PLA<sub>2</sub>s são geralmente termoestáveis e requerem íons Ca<sup>2+</sup> para sua atividade.

Apesar destas similaridades, certas diferenças estruturais permitem a classificação destas enzimas em dois diferentes grupos: o Grupo I que compreende as enzimas encontradas principalmente no pâncreas de mamíferos e nos venenos Elapídicos e Hidrofídicos e o Grupo II, no qual se encontram as enzimas dos venenos Viperídicos (Davidson e Dennis, 1990).

Fosfolipases A<sub>2</sub> em mamíferos além da transmissão de sinais através da síntese de prostaglandinas e leucotrienos possuem outras funções celulares como homeostasia da membrana, manutenção de fosfolipídios de membrana e reparo de membrana através de deacilação e reacilação (Dennis, 1994; Winstead, 2000). Também possuem papeis importante na fertilização, proliferação celular, contração celular, hipersensibilização e doenças inflamatórias crônicas (Kini, 2003).

As fosfolipases A<sub>2</sub> de mamíferos geralmente não são tóxicas e falham para induzir efeitos farmacológicos potentes. Já as fosfolipases A<sub>2</sub> de serpentes por possuírem papel na digestão de suas presas exibem uma ampla variedade de efeitos farmacológicos interferindo



em processos fisiológicos normais (Kini, 1997). Alguns dos componentes mais tóxicos e farmacologicamente ativos presentes nos venenos de serpentes ou são fosfolipases  $A_2$  ou são proteínas complexas. Por exemplo, todas as neurotoxinas pré-sinápticas conhecidas de venenos de serpentes são fosfolipases  $A_2$  ou contém fosfolipase  $A_2$  como parte integral. A habilidade em induzir efeitos farmacológicos com alta potência evidencia a importância da fosfolipase  $A_2$  na toxicidade dos venenos de serpentes.

Embora uma variedade de efeitos farmacológicos seja induzida por fosfolipases  $A_2$ , nem todos os efeitos são causados por todas as fosfolipases  $A_2$ . Cada enzima exibe um efeito farmacológico específico. As  $\beta$ -bungarotoxinas contém fosfolipase  $A_2$  que induz efeito pré-sináptico, mas não apresenta atividade pós-sináptica, miotóxica nem anticoagulante (Gutierrez e Lomonte, 1997).

Para explicar a suscetibilidade de um tecido por uma fosfolipase  $A_2$  em particular na superfície de células e tecidos alvos foi proposto a presença de um sítio alvo específico na superfície de células ou tecidos alvos. Esses sítios alvos são reconhecidos por sítios farmacológicos específicos na fosfolipase  $A_2$  (Figura 1). O sítio alvo e o sítio farmacológico são complementares entre si através de complementaridade de cargas, hidrofobicidade e interações de Van der Waals (Kini 2003). A alta afinidade entre os sítios alvo e farmacológico determina a especificidade dos efeitos farmacológicos da fosfolipase  $A_2$ .

Através da ligação com a proteína alvo, a fosfolipase  $A_2$  pode induzir seus efeitos farmacológicos através de mecanismos dependentes ou independentes da sua atividade enzimática. Nos mecanismos em que são dependentes da atividade enzimática, realizando a hidrólise de fosfolípidos e a liberação de lisofosfolípidos e ácidos graxos podem causar o efeito farmacológico. Nos mecanismos que são independentes da atividade catalítica, a ligação com a proteína alvo causa o efeito farmacológico por agir como um agonista ou um antagonista, ou por interferir na interação da proteína alvo com seus ligantes fisiológicos (Kini e Evans, 1989).

As fosfolipases  $A_2$  de veneno de serpentes exibem uma ampla variedade de efeitos farmacológicos entre eles a ação neurotóxica tanto pré quanto pós-sináptica, miotóxica local e sistêmica, cardiotoxica, efeito anticoagulante, atividade hemolítica, atividade edematogênica entre outras (Kini 2003).

Segundo Kini (2003), as  $PLA_2$  procedentes de veneno de serpentes compartilham uma similaridade em estrutura e função com as enzimas de mamífero. No entanto, dentre as  $PLA_2$  de veneno de serpente, muitas são tóxicas e induzem um amplo espectro de efeitos

farmacológicos. Propõe-se que as PLA<sub>2</sub> procedentes de veneno de serpentes possuam uma habilidade de se unir a um “sítio específico”, devido à sua alta afinidade de se ligar a proteínas específicas que atuam como receptores. Essa ligação específica de PLA<sub>2</sub> se dispõe pela presença de um sítio “farmacológico” em sua superfície, que é independente do sítio catalítico.

A interação da alta afinidade da PLA<sub>2</sub> com seu receptor (proteína alvo) devem-se provavelmente à complementaridade de carga, hidrofobicidade e forças de Van der Waals, que se dá entre o sítio farmacológico e o sítio alvo na superfície do receptor protéico.

A identificação dos sítios farmacológicos tem o potencial para a exploração no desenvolvimento de novos sistemas úteis, devido ao amplo espectro de especificidade em tecidos e órgãos, para o “direcionamento” de proteínas específicas a um tecido alvo particular ou órgão.

Assim, a Figura 1 representa a hipótese apresentada por Kini, (2003):

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

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

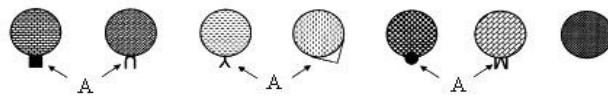
3 – Quando se administra a PLA<sub>2</sub>, através da via intraperitoneal ou intravenoso, as PLA<sub>2</sub> específicas procuram e se ligam às células alvos, devido à sua afinidade alta pelo sítio alvo. Esta ligação específica, assim como a acessibilidade do sítio alvo, dependeria da acessibilidade da célula. De outro lado, uma PLA<sub>2</sub> não específica vai se ligar a muitos tipos diferentes de células. As PLA<sub>2</sub> não específicas, assim, não vão lesar a célula alvo eficazmente como a PLA<sub>2</sub> específica.

4 – Um sistema *in vitro* ou *ex vivo*, uma célula, tecido ou órgão incuba-se com a PLA<sub>2</sub>. As PLA<sub>2</sub> específicas e não específicas podem lesar a célula alvo e poderiam exibir “Efeitos farmacológicos”. Isto é particularmente verdade quando a atividade enzimática desempenha um papel maior, induzindo o efeito farmacológico, embora sejam necessárias quantidades mais altas (ou cataliticamente as quantidades muito eficazes) de enzimas não específicas para induzirem os efeitos similares das PLA<sub>2</sub> específica.

5 – As PLA<sub>2</sub> específicas se ligam ao alvo (ou aceptor), a proteína na membrana plasmática (MP) com uma alta afinidade ( $10^{-9}$  M). No entanto, também ocorre uma afinidade baixa ( $10^{-4}$  à  $10^{-6}$  M) quando se liga a fosfolipídios. Os estudos de ligação específica sempre indicam a afinidade alta e baixa aos sítios alvos. A afinidade é alta ao sítio alvo, e baixa comparada a sítios de ligação de baixa afinidade. Os tratamentos para destruir as proteínas alvo produzem a perda da alta afinidade de se ligar, mas não baixa a afinidade dos sítios alvos. Assim, as PLA<sub>2</sub> não específicas ligam-se aos fosfolipídios com a afinidade baixa e não se liga ao sítio alvo.

6 – Vemos que o sítio alvo é um “bom encaixe” para o sítio farmacológico em espécies de células ou tecidos susceptíveis. Nas espécies não susceptíveis, aquelas que têm sofrido processos de mutações (M) ou modificações pós-traducionais (MPT) como glicosilações, células ou tecidos susceptíveis são suficientes para alterar a afinidade específica da PLA<sub>2</sub> com a célula alvo. Isso explica a especificidade das espécies observadas, na habilidade das PLA<sub>2</sub> de exibir seus efeitos farmacológicos (Kini, 2003).

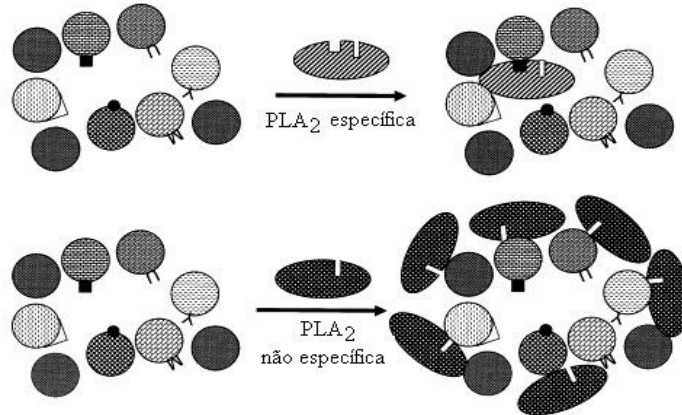
1. Sítios alvo na superfície celular



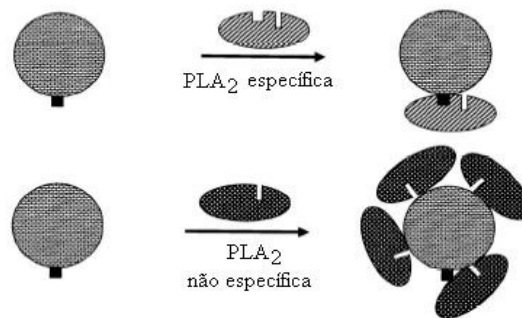
2. Sítio farmacológico das PLA<sub>2</sub>



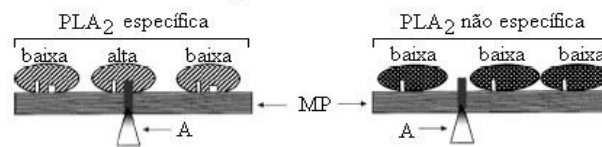
3. Administração *in vivo* das PLA<sub>2</sub>



4. Estudos de PLA<sub>2</sub> *in vitro* ou *ex vivo*



4. Ligação de afinidade de PLA<sub>2</sub>



5. Espécies específicas



**Figura 1:** Modelo para explicar os efeitos farmacológicos das PLA<sub>2</sub> (Kini, 2003).

#### 1.4 Função da atividade enzimática nos efeitos farmacológicos das PLA<sub>2</sub>

As enzimas PLA<sub>2</sub> provenientes de veneno podem induzir efeitos farmacológicos, os quais podem ser dependentes ou independentes da atividade hidrolítica de fosfolípidios. No caso das atividades farmacológicas dependentes da atividade catalítica, muito dos efeitos podem ser causados pela hidrólise total de fosfolípidios ou pela liberação de lisofosfolípidios e ácidos graxos.

A hidrólise total de fosfolípidios de membrana tem registrado alguns efeitos, tais como: 1) Mudanças na conformação biológica das membranas; 2) Alterações no comportamento da molécula alvo, devido a mudanças em seu micro ambiente; 3) Mudanças na permeabilidade seletiva a íons e drogas; 4) Alterações na função do sistema receptor-ligante, o qual depende muito do acoplamento de fosfolípidios ao sistema (Rosemberg, 1986).

Os mecanismos de indução dos efeitos farmacológicos, os quais são dependentes da ação enzimática, são detalhados na Figura 1. Ao contrário, os efeitos farmacológicos podem ser induzidos pela união física da enzima PLA<sub>2</sub> à molécula alvo, sendo independentes da atividade catalítica. A união física pode interferir de alguma forma, impedindo a união de metabólitos aos segundos mensageiros. As PLA<sub>2</sub> podem também evidenciar estes efeitos pela ação de agonistas. A união das PLA<sub>2</sub> a receptores específicos pode ser fundamental e contribuir com a alteração do estado metabólico das células alvo. Nesta alteração do estado metabólico das células alvo, pode haver liberação de mensageiros primários, que proporcionam os efeitos farmacológicos observados.

São dois mecanismos principais que podem desencadear os efeitos farmacológicos (catalítico e farmacológico). Estes são provavelmente os mais importantes, nos quais as enzimas PLA<sub>2</sub> induzem efeitos farmacológicos em adição àqueles que foram citados aqui (Figura 1).

No caso dos efeitos farmacológicos, estes podem estar envolvidos (sem dependência) da atividade enzimática e assim potencializar a sua atividade farmacológica, que pode ser determinada pela afinidade entre a molécula alvo, o sítio farmacológico e a eficiência enzimática. As neurotoxinas pré-sinápticas, crotoxina e taipoxina, que se unem à membrana sinaptosomal com alta afinidade, são exemplos de toxinas altamente específicas. (Tzeng, *et al.*, 1986).

As diferenças na potência farmacológica estão provavelmente relacionadas com a eficiência enzimática e a preferência por substrato da toxina. No caso dos efeitos farmacológicos independentes da atividade catalítica, existe uma absoluta afinidade com os

receptores do tecido, sendo este um fator primário que determina a potência farmacológica. No entanto, a hidrólise de fosfolípidios pode intensificar os efeitos farmacológicos (Kini e Evans, 1989a, b e c).

### 1.5 Miotoxinas

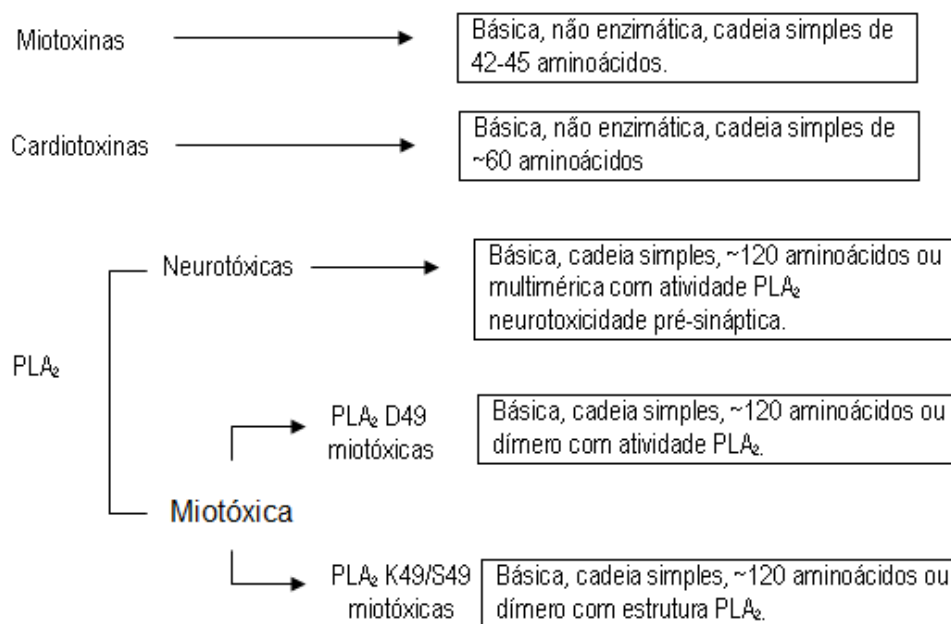
As miotoxinas podem ser definidas como componentes naturais (usualmente pequenas proteínas ou peptídeos) do veneno de serpentes que induzem prejuízos irreversíveis na fibra muscular após injeção em animais. Elas são particularmente abundantes e amplamente distribuídas nos venenos de serpentes, porém podem ser encontradas nos venenos de outros organismos. Algumas toxinas agem localmente lesando a fibra muscular no local da injeção, entretanto outras agem sistemicamente, causando prejuízos musculares em sítios distantes. Mionecrose é uma importante complicação médica da picada de serpente. Em vários casos a mionecrose pode provocar seqüelas drásticas como perda tecidual permanente, incapacidade ou amputação (Gutierrez e Onwbv, 2003). Por outro lado, miotoxicidade sistêmica pode provocar mioglobinúria e insuficiência renal severa, uma causa freqüente de morte por picada de serpente (Azevedo-Marques *et al.*, 1985).

A rápida ruptura das células musculares é seguida por uma série de eventos degenerativos os quais são similares para várias PLA<sub>2</sub> miotóxicas, independentemente de sua fonte e da presença ou ausência de atividade enzimática. Ocorre um rápido efluxo de moléculas citosólicas tais como creatina cinase (CK), lactato desidrogenase, aspartato amino transferase, mioglobina e creatina.

As neurotoxinas são comumente encontradas em venenos Elapídicos, as quais possuem um papel importante no efeito letal. A dose letal de 50% (DL<sub>50</sub>) possui valores extremamente baixos, devido a potentes efeitos pré-sinápticos na junção neuromuscular.

Já as miotoxinas não neurotóxicas são mais comumente encontradas em venenos Viperídeos. Em contraste com as neurotóxicas possuem valores de DL<sub>50</sub> altos por isso seu efeito letal é de pouca relevância (Soares *et al.*, 2000).

Entre as miotoxinas não neurotóxicas ocorre a presença de dois tipos: PLA<sub>2</sub> D49 (Aspartato na posição 49 responsável pelo mecanismo catalítico) a qual catalisa ligações éster na posição *sn*-2 de glicerofosfolípidios e as PLA<sub>2</sub> K49 as quais são desprovidas de atividade enzimática devida a troca do aminoácido aspartato na posição 49 pela Lisina (Lomonte, *et al.*, 2003) (Figura 2).



**Figura 2:** Classificação e características gerais de miotoxinas de veneno de serpentes modificada de Lomonte *et al.*, 2003.

Para as miotoxinas PLA<sub>2</sub> K49 a forma pela qual essas miotoxinas afetam a membrana plasmática das células musculares parece não ser devida à ação enzimática sobre os fosfolípidos, já que elas não apresentam atividade fosfolipásica (Mebs e Owby, 1980).

Várias evidências experimentais indicam que a toxina pode atuar através da interação e desorganização das bicamadas fosfolipídicas. Uma evidência experimental é que a miotoxina quebra lipossomas feitos de fosfolípidos, indicando que a toxina atua sobre as membranas sem requerer a presença de proteínas de membrana. O modo de ação destas miotoxinas indica que ela pode penetrar na membrana através de seus sítios hidrofóbicos que poderiam interagir com a membrana plasmática do músculo esquelético levando a desorganização e ruptura da estrutura molecular da membrana. Outro fato importante que vem de encontro com o proposto acima é que as miotoxinas possuem regiões catiônicas e hidrofóbicas localizadas em um segmento "miotóxico" anfifílico (Kini e Iwanaga, 1986).

## 1.6 Neurotoxinas

As neurotoxinas provenientes do veneno de serpentes são componentes clássicos deste e afetam particularmente a junção neuromuscular, produzindo uma paralisia flácida. No

entanto, nem todas as neurotoxinas têm o mesmo sítio, modo de ação ou produzem efeitos clínicos similares (Rodriguez-Acosta, A. 2001).

Com respeito aos componentes neurotóxicos dos venenos de serpentes – sendo os mais bem descritos os da subfamília Crotalinae, sabe-se que muitos deles, em condições naturais não são capazes de penetrar a barreira hematoencefálica, em condições profundas de alterações, podem alcançar o sistema nervoso central (SNC) e originar quadros patológicos até agora pouco descritos (Monterrey, 2001).

Um dos maiores alvos do veneno das serpentes é o sistema nervoso somático, em particular a junção neuromuscular do músculo esquelético. A inibição da transmissão neuromuscular neste lugar produz paralisia da musculatura respiratória, como o diafragma, por exemplo, o que leva à morte. Por conseguinte, muitas das pesquisas têm sido dirigidas com o intuito de aumentar nossa compreensão sobre a ação do veneno das serpentes e das toxinas isoladas que agem na junção neuromuscular (Hodgson W., e Wickramaratna 2002).

### **Transmissão Neuromuscular**

A ação da maioria das neurotoxinas tem seu efeito revelado no sistema nervoso periférico, devido ao fato de não atravessarem a barreira hematoencefálica. No entanto, a ação do veneno e de suas toxinas na junção neuromuscular pode ser discutida. A acetilcolina é o principal neurotransmissor da união neuromuscular esquelética, sendo sintetizada e armazenada no terminal nervoso. A maior parte da acetilcolina empacota-se em vesículas (aproximadamente 80%) e difunde-se espontaneamente com a membrana pré-sináptica, ficando o restante em solução no axoplasma.

As serpentes desenvolveram através de diferentes mecanismos genéticos evolutivos, a capacidade de expressar potentes toxinas, capazes de inibir a transmissão neuromuscular pré-sináptica ( $\beta$ -neurotoxinas) e pós-sináptica ( $\alpha$ -neurotoxinas) em determinados sítios específicos. A neurotoxicidade pré-sináptica está associada muitas vezes a fosfolipases  $A_2$  encontradas nos venenos das serpentes (Hodgson W., e Wickramaratna 2002).

Um estudo dos detalhes da estrutura química tem revelado uma inesperada inter-relação entre estrutura e função. O bloqueio do processo fisiológico é uma questão crucial a ser examinada, assim como o conhecimento do sítio responsável e o mecanismo de ação a nível molecular. A ação neurotóxica não se dá apenas no nervo motor terminal, pois, isso também ocorre em preparações nervosas diferentes, por exemplo, em mamíferos e aves (Tu, A. 1991).



### **Inibidores da Condução**

O axônio motor, ao ser estimulado, responde com a respectiva despolarização, que envolve uma mudança na condução de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  e  $\text{Ca}^{2+}$ . Deste modo que qualquer substância capaz de alterar o movimento normal dos íons de  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$  pode ser considerada como sendo neurotóxica. Um dos exemplos mais conhecidos é a tetrodotoxina, uma neurotoxina obtida do “puffer fish”, conhecido como baiacu, e que tem a capacidade de bloquear os canais de  $\text{Na}^+$  (Narahashi e Hass, 1967). Toxinas do veneno de escorpiões também podem afetar a condutividade do axônio, devido à sua atuação sobre os canais de sódio (Rochart *et al.*, 1970, Zlotkin *et al.*, 1971, Strichartz *et al.*, 1986).

### **Inibidores da Transmissão Sináptica**

A placa motora na junção neuromuscular é uma região especializada da fibra muscular, onde o impulso nervoso ao atingir a terminação nervosa pré-sináptica, determina a sua despolarização ativando a entrada de cálcio para dentro da membrana, que sinaliza a liberação do neurotransmissor, a acetilcolina. A acetilcolina é então liberada e combina-se com os receptores nicotínicos pós-sinápticos. Esta ligação está relacionada ao potencial de placa terminal que, ao atingir o limiar de excitabilidade, desencadeia o potencial de ação muscular que se propaga ao longo dos túbulos “T”, induzindo a contração muscular. As toxinas que causam alteração ao nível da transmissão sináptica podem ser divididas em dois grandes grupos: as neurotoxinas pré-sinápticas e as pós-sinápticas.

#### **Toxinas Pré-sinápticas:**

Denominadas como  $\beta$ -neurotoxinas, estas toxinas inibem o processo de liberação da acetilcolina. Como exemplo, citamos a toxina  $\beta$ -bungarotoxina, uma toxina composta por duas subunidades de 8800 e 12400 daltons, interligadas por pontes dissulfeto (Chang *et al.*, 1977, Kelly, 1979).

Dois tipos de neurotoxinas pré-sinápticas provenientes de veneno de serpentes têm sido reconhecidos: 1) as  $\beta$ -neurotoxinas, caracterizadas pela presença da atividade catalítica  $\text{PLA}_2$  e estabelecidas nos venenos de serpentes das famílias Elapidae e Viperidae; e 2) as  $\beta$ -neurotoxinas pré-sinápticas facilitatórias, incluindo a dendrotoxina, com bloqueio do canal de potássio voltagem-dependente e a toxina antiacetilcolinesterase, o fasciculins. As toxinas do segundo grupo são próprias de veneno de *Dendroaspis*. São polipeptídios com seqüências

homólogas aos inibidores de proteinases tipo Kunitz e com as “curare-like” pós-sinápticas que são  $\alpha$ -neurotoxinas e cardiotoxinas respectivamente (Harvey, et al., 1998).

Várias neurotoxinas pré-sinápticas de veneno de serpentes têm sido isoladas. Elas vêm sendo identificadas nos venenos das maiores famílias de serpentes peçonhentas: Elapidae, Hydrophidae e Viperidae, o que indica a importância de sua atividade. Muitas delas possuem atividade fosfolipase  $A_2$ , cuja função provavelmente tem evoluído. Acredita que, além da digestão da presa, haja outros papéis desta proteína, como, por exemplo, uma que inclui a imobilização e morte da presa. No entanto, sua atividade neurotóxica não tem relação direta com sua atividade fosfolipase  $A_2$ . Nos seres humanos, a paralisia associada com estas toxinas pode durar por muito tempo, chegando até a três semanas. Em alguns pacientes envenenados, há a necessidade de uma prolongada ajuda na ventilação para sua sobrevivência.

As neurotoxinas pré-sinápticas podem ser polipeptídios de cadeia única – como, por exemplo, notexin – ou toxinas que consistem em subunidades múltiplas, como, por exemplo: crotoxina, Taiboxina e Textilotoxina que consistem em dois, três e cinco subunidades, respectivamente. Mas os venenos de serpente contêm múltiplas isoformas de uma neurotoxina em particular que difere na seqüência de um aminoácido na estrutura primária. No entanto, a aparente correlação direta entre estrutura da cadeia e potência torna-se matéria de discussão, pois parece existir uma correlação entre a estrutura da cadeia e sua união com as subunidades (Hodgson e Wickramaratna 2002).

No entanto, sua atividade geralmente se caracteriza por um efeito trifásico na liberação da acetilcolina (uma diminuição, seguida por um aumento transitório e depois um bloqueio completo). Estes dois passos iniciais parecem ser independentes da atividade fosfolipase  $A_2$  e são particularmente evidentes quando o fator na transmissão é diminuído, reduzindo assim os níveis de  $Ca^{2+}$  e aumentando  $Mg^{2+}$  contidas no meio.

A atividade trifásica, quando observada em preparações de diferentes músculos apresentam diferentes formas de liberação da acetilcolina. Por exemplo, embora a Paradoxin produza uma marcada facilitação na altura da tensão, a fase inibitória inicial parece estar ausente na preparação nervo frênico-diafragma isolado de camundongo. Esta atividade é similar a Notexin, onde a fase de inibição inicial também está ausente na mesma preparação nervo frênico-diafragma isolado de camundongo. Mas a Taiboxin encontra-se estritamente relacionada com a inibição, embora seja registrado na literatura que a fase inibitória na Taiboxin e  $\beta$ -bungarotoxina seie notavelmente menos pronunciadas na preparação do nervo frênico-diafragma isolado de camundongo.

A diferença em relação à sensibilidade das preparações nervo-músculo das espécies no bloqueio neuromuscular por ação pré-sináptica das neurotoxinas com estrutura fosfolipase A<sub>2</sub>, tem sido bem documentada evidenciando que a preparação nervo frênico-diafragma isolado de camundongo é notavelmente mais sensível a Paradoxin (Quadro 1), quando comparada à preparação biventer cervicis de pintainho. E a mesma ordem de sensibilidade tem sido mostrada para Taipoxin, Textilotoxin e Notexin (Quadro 1), as quais são todas neurotoxinas de elapídeos asiáticos. Em contraste, a crotoxina e a β-bungarotoxina são muito mais potentes na preparação biventer cervicis de pintainho. Textilotoxin é considerada como a mais potente neurotoxina pré-sináptica isolada de veneno de serpente.

Su. *et al.* (1984) tem evidenciado que a Textilotoxin (0.3μg/ml) é capaz de diminuir a resposta contrátil do nervo na preparação nervo frênico-diafragma isolado de camundongo: em 194 minutos a uma concentração de 0.3μg/ml e em 110 minutos na concentração de 1μg/ml. Embora tenha sido evidenciado que 0.3μg/ml de Paradoxin são capazes de diminuir a resposta contrátil em 110 minutos, indicando assim que este tipo de tecido para Paradoxin é muito mais sensível. Um tempo semelhante (103 minutos) para a inibição completa na preparação nervo frênico-diafragma isolado de camundongo, tem sido reportado para Taipoxin, embora a concentração fosse de 1μg/ml. Apesar dessa clara diferença na preparação nervo frênico-diafragma isolado de camundongo, a ação do bloqueio da tensão neuromuscular produzida por Paradoxin (3μg/ml) e Taipoxin (3μg/ml) na preparação biventer cervicis de pintainho se mostrou quase idêntica (160 minutos).

Existem registros de que aumentando a concentração de Paradoxin em 10 vezes, na preparação nervo frênico-diafragma isolado de camundongo, não produziu um efeito significativo no tempo considerado para diminuir a resposta contrátil, o que sugere que exista uma saturação dos sítios específicos para a neurotoxina. Dessa forma, devido ao mecanismo de ação da toxina, não é possível produzir uma inibição completa em um tempo mais curto.

É de interesse clínico saber se as neurotoxinas agem em um tempo relativamente curto (30 minutos aproximadamente), pois assim, pode-se concluir que seu efeito não pode ser revertido mesmo com a ação dos antivenenos, se este for administrado posteriormente. É conhecido que antivenenos testados *in vitro* podem prevenir a inibição causada por Paradoxin e Taipoxin quando os dois são colocados juntos com os antivenenos.

Tem-se discutido a identificação do sítio específico no terminal nervoso pré-sináptico para estas fosfolipases A<sub>2</sub> neurotóxicas (Igor Krizai e Frane Gubensek, 2000). Sítios seletivos de interação, que parecem ser comuns à maioria das fosfolipases A<sub>2</sub>, têm sido identificados

em vários tecidos, inclusive em sinaptosomas de cérebro de rato (Tipo-N) e em cultura de células de músculo esquelético (Tipo-M). A afinidade das neurotoxinas para estes sítios específicos mostra uma boa correlação com sua toxicidade, embora sejam identificadas sérias e marcadas diferenças entre os sítios específicos nos tecidos diferentes, levando a pensar na existência de uma família de receptores para estas fosfolipases  $A_2$  neurotóxicas. De forma adicional, tem sido demonstrado que a interação de notexin com o sítio receptor específico na preparação nervo frênico-diafragma isolado de camundongo era substancialmente reversível. Já a união da crotoxina foi ligeiramente reversível, enquanto a da  $\beta$ -bungarotoxina, taipoxin e textilotoxin, foi escassamente reversível.

Estudos anteriores sugerem que as neurotoxinas não são internalizadas, embora se acredite que haja uma ação interna das neurotoxinas dentro das vesículas sinápticas, sugerindo uma endocitose e uma hidrólise de fosfolipídios no interior da membrana. Esta hipótese parece ter sido aceita para a maioria das toxinas já estudadas. E isto se apóia em trabalhos que mostram a presença de calmodulina: uma proteína intracelular que age como um aceptor/receptor para a ammodytoxin, uma toxina pré-sináptica (Montecucco e Rossetto 2000).

Recentemente os resultados de um estudo que analisa uma faixa de neurotoxinas pré-sinápticas –usando a técnica de patch clamping e alguns tipos de canais de  $K^+$  clonados voltagem-dependentes estavam expressos em linhas celulares de mamíferos – sugerem que a facilitação observada é diferente, devido a um bloqueio dos canais de  $K^+$ . No entanto, os autores indicaram que eles não poderiam excluir a possibilidade de que os canais de  $K^+$  voltagem dependentes clonados, usados em seus estudos, não foram capazes de expressar o sítio ou domínio específico para as fosfolipases  $A_2$  neurotóxicas ou não se encontraram proteínas reguladoras importantes.

Alguns estudos analisaram os efeitos neuropatológicos de Notexin e Taipoxin em membros posteriores de rato, evidenciado que, depois de produzir uma depleção do neurotransmissor no terminal nervoso motor, estas toxinas causam uma degeneração deste terminal e do citoesqueleto axonal. Este fato foi constatado devido 70% das fibras musculares se encontrarem completamente desenergizadas dentro de 24 horas, com a regeneração quase completa dentro de cinco dias. Dentro de nove meses, ocorre, na inervação co-lateral, a regeneração da musculatura, sendo que resultados similares têm sido previamente reportados para  $\beta$ -bungarotoxina (Hodgson e Wickramaratna 2002).

Ouadro 1 Algumas  $\beta$ -neurotoxinas pré-sinápticas isoladas de veneno de serpentes representativas (Hodgson e Wickramaratna 2002).

<i>Toxina</i>	<i>Composição de Subunidades</i>	<i>Nome comum</i>	<i>Nome científico</i>
Notexin	Cadeia simples	Serpente tigre	<i>Notechis scutatus</i>
Taipoxin	Três subunidades	Serpente da costa Taipán	<i>Oxvuranus scutellatus</i>
Paradoxin	Três subunidades	Serpente Taipán	<i>Oxvuranus microlepidotus</i>
Crotoxina	Duas subunidades	Cascavel	<i>Crotalus durissus terrificus</i>
Textilotoxin	Quatro subunidades	Serpente marron	<i>Pseudonaia textilis</i>
$\beta$ -Bungarotoxina	Duas subunidades	Serpente marina da Ásia	<i>Bungarus multicinctus</i>

### **Estrutura Molecular das $\beta$ -neurotoxinas**

As  $\beta$ -neurotoxinas são caracterizadas pela presença de uma fosfolipase  $A_2$  ativa (EC 3.1.1.4) e, portanto, são enzimas que catalisam a hidrólise acil éster na posição 2 de um 3-sn-fosfogliceráldeído. As formas de  $PLA_2$  extracelulares são extremamente abundantes nas secreções de glândulas exócrinas, elas são armazenadas geralmente em glândulas de veneno de serpentes, abelhas e escorpiões e são semelhantes as  $PLA_2$  de pâncreas de mamíferos. No entanto, muitas diferenças na atividade catalítica e estrutural podem ser importantes (Kini, 2003).

As  $PLA_2$  mostram um maior grau de similaridade na seqüência de aminoácidos, o que indica uma alta conservação na posição de pontes dissulfeto e da estrutura tridimensional. A função primária destas  $PLA_2$  é digestiva. No entanto, um pequeno grupo de  $PLA_2$  provenientes de veneno de serpentes, as  $\beta$ -neurotoxinas, têm evoluído como potentes neurotoxinas no bloqueio da transmissão neuromuscular, primeiramente pela modificação na liberação do neuro transmissor Ach (Tu, 1991).

Três classes de neurotoxinas têm sido registradas basicamente pela sua estrutura molecular:

1)  $\beta$ -Neurotoxinas Monoméricas: compostas unicamente por  $PLA_2$ . Um exemplo desta classe é a Notexin de *Notechis s. scutatus* (Bon, 1997 e Kini, 1997).

2)  $\beta$ -Neurotoxinas Multiméricas: compostas por uma molécula de  $PLA_2$  associada, sem a presença de pontes de dissulfeto, com uma outra molécula sem atividade enzimática. Como exemplo destas neurotoxinas, pode-se citar a crotoxina isolada de *Crotalus durissus terrificus* (Bon, 1997).

3)  $\beta$ -Bungarotoxinas: as primeiras neurotoxinas pré-sinápticas caracterizadas farmacologicamente foram as  $\beta$ -Bungarotoxinas purificadas de veneno de *Bungarus multicinctus* (Chang e Lee, 1977). Mais tarde algumas outras foram purificadas de amostras

de venenos (Abe et al., 1977; Kondo et al., 1989) e outras  $\beta$ - Bungarotoxinas de venenos de várias espécies de *Bungarus*.

As  $\beta$ -Bungarotoxinas são compostas de associação covalente, por uma ponte dissulfeto, sendo dois diferentes polipeptídios de cadeia A e B. O polipeptídio A consiste de 120 resíduos aminoacídicos e a seqüência da PLA<sub>2</sub> é homóloga às PLA<sub>2</sub> de pâncreas de mamífero. O polipeptídio contém 60 resíduos aminoacídicos, a seqüência é homóloga com os inibidores de proteinases tipo Kunitz de pâncreas de mamífero, venenos de serpentes e caramujo (Tu, 1991).

Alguns exemplos de toxinas pré-sinápticas são também as neurotoxinas do veneno de escorpiões que atuam sobre os canais de sódio e de potássio (Rochart *et al.*, 1970 e Marangoni *et al.*, 1995). Estas neurotoxinas também são encontradas em peconhas de serpentes elapídicas e crotálicas. São exemplos de neurotoxinas elapídicas: as  $\beta$ -bungarotoxina, como a notexina (Karlsson et al., 1979); e as crotálicas, como a crotoxina (Breithaupt, 1976, Faure e Bon, 1988 e Faure et al., 1991).

### **Toxinas Pós-sinápticas:**

As neurotoxinas pós-sinápticas são de baixo peso molecular (7 a 8 kDa) e são desprovidas de atividade enzimática (Karlsson et al., 1979). As neurotoxinas pós-sinápticas ou  $\alpha$ -neurotoxinas são antagonistas dos receptores nicotínicos no músculo esquelético. Elas são também chamadas de toxinas curare miméticas, devido à sua similaridade na ação antagonista do receptor nicotínico competitivamente com a tubocurarina, mas sua combinação com estes receptores se faz de forma não covalente (Tu, 1991).

O receptor nicotínico do músculo esquelético é uma proteína heteropentamérica, formada por cinco subunidades, com dois sítios específicos de ligação para a acetilcolina, localizados na interfase entre as subunidades. Estes sítios específicos de ligação interagem reciprocamente de forma cooperativa para ocupar um dos sítios específicos semelhantes para as  $\alpha$ -neurotoxinas de veneno de serpente, inibindo a abertura dos canais iônicos associados com o receptor em resposta aos agonistas colinérgicos. Assim, as  $\alpha$ -neurotoxinas bloqueiam a transmissão nicotínica no músculo esquelético, causando a paralisia da presa.

Em contraste com as  $\beta$ -neurotoxinas, as  $\alpha$ -neurotoxinas só se encontram nos venenos das serpentes das famílias Elapidae e Hydrophiidae. Até o presente, cerca de 100 neurotoxinas tem sido isoladas e seqüenciadas. Dependendo da sua seqüência, as neurotoxinas pós-sinápticas se subdividem em neurotoxinas de cadeia curta, que consiste de 60 a 62

aminoácidos ao longo da estrutura primária e quatro pontes dissulfeto; e de cadeia longa, que possuem 66 a 74 resíduos de aminoácidos e usualmente cinco pontes dissulfeto. No entanto, as posições das quatro pontes dissulfeto são comuns para tais neurotoxinas, tanto de cadeias curtas quanto de cadeias longas: estas pontes na cadeia longa encontram-se localizadas entre as posições Cys30 e Cys34. Até recentemente se pensava que a maior diferença funcional entre estes dois tipos de  $\alpha$ -neurotoxinas estava na cinética de associação e dissociação com os receptores nicotínicos do músculo esquelético.

Foi demonstrado que as neurotoxinas de cadeia curta tendem a se associar com o receptor aproximadamente seis vezes mais rápido e se dissociar cinco vezes mais rápido que as neurotoxinas de cadeia longa. Tem também sido mostrado que as neurotoxinas de cadeia longa ligam-se aos receptores neuronais nicotínicos com afinidade muito mais alta do que as neurotoxinas de cadeia curta. A toxina de *Laticauda colubrina* (serpente Elapidae Asiática) tem sido considerada como uma toxina de cadeia longa, sendo este dado baseado na seqüência de aminoácidos (estrutura primária) e nos respectivos estudos de homologia seqüencial, faltando, porém, algumas pontes dissulfeto nesta. Embora funcionalmente elas se comportem como neurotoxinas de cadeia curta com união aos receptores nicotínicos, esta classificação funcional das  $\alpha$ -neurotoxinas ainda requer uma caracterização farmacológica mais detalhada, apesar destas serem semelhantes no músculo esquelético e nos receptores neuronais nicotínicos (Hodgson e Wickramaratna 2002).

### **Neurotoxinas: Ferramentas Moleculares**

Péptídeos com atividade tóxica proveniente do veneno de origem animal, de microorganismos ou vegetais, têm sido largamente utilizados no estudo dos mecanismos de ação e dos processos metabólicos, pois estes péptídeos interagem especificamente com receptores, inibindo ou estimulando várias funções celulares, constituindo-se, portanto, como ferramentas moleculares valiosas dentro da fisiologia e farmacologia.

As toxinas em geral, bem como as neurotoxinas em particular, também têm sido utilizadas como sondas com diferentes finalidades, por exemplo, a síntese de novas drogas, agentes terapêuticos (tubocurarina e a toxina botulínica) ou na forma de medicamentos como o Captopril, sintetizado a partir do modelo molecular da toxina isolada do veneno de *Bothrops jararaca* (Harvey et al., 1998).

Atualmente, sabe-se que as neurotoxinas provenientes da peçonha de *Crotalus durissus terrificus* poderiam atuar não somente na junção neuromuscular, mas também em células  $\beta$  de

ilhas de Langerhans isoladas de ratos, estimulando-se em condições experimentais a potência da secreção de insulina. Assim, descobriu-se que os isômeros de crotamina podem potencializar a secreção de insulina, provavelmente utilizando-se de sua interação específica com os canais de sódio.

Existem neurotoxinas – tais como a crotamina, miotoxina, cardiotoxinas, melitina e as fosfolipases A<sub>2</sub> – que são toxinas que exibem grande potencial para sua utilização como ferramentas moleculares no estudo de determinadas patologias, como a mionecrose. Estudos realizados por Rodrigues-Simioni *et al.* (1995) e Prado-Franceschi (1998) mostraram que a Bothrosptoxina-I é uma miotoxina com estrutura de PLA<sub>2</sub> (Cintra, et al., 1993), mas sem atividade catalítica. Esta toxina pode interagir com canais de sódio tetrodoxina dependentes, para provocar o efeito biológico, a mionecrose, sendo que esta toxina também é capaz de promover a liberação de Ca<sup>2+</sup> do retículo sarcoplasmático, interagindo então diretamente com os canais ou com outro receptor. Do ponto de vista toxicológico, as serpentes peçonhentas do Brasil da família Viperidae pertencem a três gêneros: *Bothrops*, *Crotalus* e *Lachesis*. E, da família Elapidae, temos o gênero *Micrurus*.



### 1.14 *Bothriopsis bilineata*

É uma espécie endêmica da floresta amazônica, tendo sua distribuição geográfica por toda a região Amazônica: Bolívia, Brasil, Peru, Equador, Guiana Francesa, Guiana, Suriname e Venezuela. São serpentes de hábito arborícolas conhecida como iararaca verde e que é encontrada em zonas de matas e na Amazônia e possuem hábitos alimentares noturnos. usualmente os adultos atingem até 120cm. Seu corpo possui uma cor esverdeada na parte dorsal e um verde mais forte na parte da cabeça. Apresenta uma faixa amarela que percorre por todo o seu corpo. Não é uma espécie agressiva mais ataca quando se sente acuada ou perturbada. Alimenta-se de pássaros, pequenos mamíferos, e alguns roedores de pequeno porte (McDiarmid *et al.* 1999).

O veneno desta serpente apresenta como característica uma alta atividade fosfolipásica  $A_2$  e uma alta expressão da atividade neurotóxica em relação a outros venenos *Bothrópicos* (Quadro 2).

Quadro 2: Tempo requerido para 50% de bloqueio das contrações musculares em preparação “*ex vivo*” *biventer cervicis* incubadas com peçonhas botrópicas.

Serpente	Concentração ( $\mu\text{g/mL}$ )	Tempo (min) para 50% de bloqueio das contrações
<i>B. bilineata</i>	50	20
<i>B. insularis</i> ***	80	44
<i>B. neuwiedi</i> *	50	45
<i>B. ervthromelas</i> *	50	87
<i>B. mooieni</i> *	50	95
<i>B. iararaca</i> *	50	107.3
<i>B. iararacussu</i> *	50	> 120

\* Zamunér *et al.*, 2004

\*\*\* Cogo *et al.*, 1993

Nossos estudos iniciais revelaram a presença de um fator ou fatores neurotóxicos no veneno total capaz de levar à diminuição da resposta contrátil induzida por estímulo elétrico no modelo “*ex vivo*” *biventer cervicis* de pintainho com potência superior à de outras serpentes do gênero *Bothrops* (Quadro 2), mas que não afetou a resposta à acetilcolina e ao potássio, excluindo assim o envolvimento de efeito pós-sináptico ou muscular direto, criando uma grande expectativa pelo isolamento, purificação bioquímica e biológica do fator responsável por este efeito: sem desconsiderar a possibilidade de se tratar de uma  $PLA_2$ , com efeito neurotóxico, similar à encontrada em *B. insularis*, o que nos motivou a propor desenvolver o presente projeto, que poderia prover novas informações bioquímicas e farmacológicas sobre a peçonha desta serpente e seus componentes.

## 2. OBJETIVOS

### 2. Obietivos Gerais

O obietivo geral deste trabalho é isolar e caracterizar físico-quimicamente uma nova PLA<sub>2</sub> do veneno de *Bothriopsis bilineata*. Será realizado o estudo e a avaliação farmacológica de neurotoxicidade, atividade inflamatória (edema) e citotoxicidade.

### 2.1 Obietivos Específicos

□ Isolamento e caracterização de uma PLA<sub>2</sub> D49 presentes no veneno de *Bothriopsis bilineata*, através de cromatografia convencional e de alta eficiência HPLC, eletroforese SDS-PAGE, espectrometria de massas (MALDI-Tof), análise de aminoácidos e estudo de homologia seqüencial da região N-Terminal.

□ Estudo da atividade cinética da PLA<sub>2</sub> através da determinação da atividade PLA<sub>2</sub>, efeito da concentração do substrato, pH, temperatura, íons divalentes, e inibidores proteicos: crotapotina crotálica e fator anti-hemorrágico de soro de *Didelphis albiventris* DA2-II.

□ Avaliação farmacológica da PLA<sub>2</sub> procedente do veneno de *Bothriopsis biliniata* através do estudo da atividade neurotóxica “*in vitro*” na preparação biventer cervicis de pintainho.

□ Avaliação da atividade inflamatória (edema) frente aos inibidores proteicos: fator anti-hemorrágico DA2-II isolado do soro de *Didelphis albiventris* da crotapotina F3 de *Crotalus durissus cascavella*.

□ Estudo da atividade citotóxica da PLA<sub>2</sub> isolada do veneno total de *Bothriopsis biliniata* em mioblastos e miotubos C2C12.

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1 Veneno**

O veneno total de *Bothriopsis bilineata* foi cedido pelo Prof. Dr Ronald Navarro Oviedo, do Laboratório de Ouímica Biológica, da Escola Acadêmica e Biológica de Biologia da Universidade Nacional de São Agustín de Arequipa – Perú.

#### **3.2 Animais**

Foram utilizados para os ensaios biológicos camundongos machos Swiss (18 a 20g) e pintainhos de 6 a 8 dias obtidos no CBMEG UNICAMP. Todos os ensaios biológicos foram feitos com autorização da Comissão de Ética para a Experimentação Animal (CEEA-IB-UNICAMP protocolo nº 1503-1)

#### **3.2 Purificação das toxinas de *Bothriopsis bilineata*.**

##### **3.2.1 Cromatografia de Exclusão Molecular Sephadex G-75.**

Cinquenta miligramas do veneno total foram homogeneizados em 1ml de tampão bicarbonato de amônio 1M. Esta solução de veneno foi então centrifugada a 9000 rpm por 3 minutos para clarificação. O sobrenadante obtido foi então aplicado à coluna de exclusão molecular contendo a resina Sephadex G-75, previamente equilibrada com AMBIC 0.2 M. A coluna é eluída com tampão bicarbonato de amônio 0.2M a um fluxo constante de 0.25ml/min e monitorado a 280 nm. As frações foram coletadas, liofilizadas e armazenadas a -20°C.

##### **3.2.2 HPLC de fase reversa**

A fração com atividade PLA<sub>2</sub> (fração II), obtida na cromatografia em Sephadex G-75 foi purificada em HPLC de Fase Reversa. O sistema cromatográfico usado foi o HPLC - PDA 991 (Waters), equipado com duas bombas Waters modelo 510/B, um inietor automático de amostras U6K com um “loop” de 200 ul e uma coluna  $\mu$ -Bondapak C-18 0.78 X 30cm, previamente equilibrada com ácido trifluoroacético 0.1%, pH 3.5. Foram aplicados 5mg da fração dissolvidas em 120ul de tampão A (TFA) e 80ul de AMBIC 1M. A eluição das amostras foi realizada usando-se um gradiente linear (0 – 100%) com Tampão B. A corrida cromatográfica foi realizada a um fluxo constante de 1ml/min e monitorada a absorvância em 280nm.

### **3.3 Eletroforese em PAGE-SDS**

A eletroforese em gel de poliacrilamida foi realizada seguindo-se a metodologia descrita por Laemmli (1970). As placas de poliacrilamida feitas de modo descontínuo apresentam um gel de concentração de 5% e um gel de corrida de 12.5%. As placas foram preparadas utilizando-se uma solução de acrilamida estoque (30%T, 0.8%C). O gel de concentração 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 PAGE-SDS foi realizada em um sistema duplo de mini placas SE 250 Mightv Small II (Hoefer Scientific Instruments). As amostras e os marcadores de massa molecular foram dissolvidos em tampão de amostra (Tris-HCl, 0.075M, pH 6.8; 10% de glicerol; 4% de SDS; 0.001% de bromofenol). A corrida eletroforética foi realizada a 30 mA. Os géis foram corados com solução de Coomassie Blue 0.05% a 37°C, o excesso de corante foi removido em ácido acético 7%.

### **3.4 Análise de aminoácidos**

A análise de aminoácidos foi realizada no analisador automático de aminoácidos PICO TAG (Sistema Waters) seguindo a metodologia descrita por Henrikson e Meredith (1984). Os aminoácidos derivados (PTC aminoácidos) das amostras foram identificados, em uma coluna de fase reversa, de acordo com o tempo de retenção dos PTC-aminoácido padrão. Para estimativa da composição global, a análise de composição de aminoácidos foi realizada de acordo com método descrito por (Ponce-Soto et al 2006).

### **3.5 Sequenciamento N-terminal**

A seqüência de aminoácidos da região N-terminal da toxina BbitX-I, reduzida e carboximetilada, foi realizada de forma direta através de um seqüenciador automático modelo Procise f 491 da Applied Biosystem. Os PTH aminoácidos foram identificados em um analisador automático de PTH aminoácidos modelo 120A (Applied Biosystem) de acordo com o tempo de retenção dos 20 PTH aminoácidos padrões.

### **3.6 Análise por Espectrometria de Massas Maldi-Tof (MS)**

A massa molecular da toxina BbilTX-I foi analisada por Espectrometria de Massas, utilizando-se um Voyager DE PRO MALDI TOF mass spectrometry (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). 1ul da amostra em TFA 0.1% foi misturada em 2ul da matriz. A matriz foi preparada com ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxi-cinnamico (Sigma), 60% acetonitrila e 0.1% v/v TFA. E a massa foi analisada sob as condições seguintes: aceleração de voltagem 25 kV o laser ajustado a 2890 mJ/cm<sup>2</sup> em 300 ns e o modo de análise é linear (Ponce-Soto, et al., 2007).

### **3.7 Atividade Fosfolipásica A<sub>2</sub>**

A determinação da atividade fosfolipásica foi realizada segundo o método descrito por Cho e Kézdy (1991) e Holzer e Mackessy (1996), modificado para placa de 96 pocos (Ponce-Soto, et al., 2002). O substrato é o ácido 4-nitro-3-(octanoiloxi) benzóico. Foram utilizadas amostras com uma concentração de 0.1 mg/ml de amostra, no caso do veneno total, e fosfolipase A<sub>2</sub> isoladas. As amostras foram incubadas junto com o tampão de reação (Tris-HCl 0.1M Ca<sup>2+</sup> 0.01M pH 8) por 30 minutos. Após o tempo de incubação, a reação enzimática foi lida em um espectro a 425 nm de absorbância.

### **3.8 Efeito da concentração de substrato na atividade PLA<sub>2</sub>**

Esse ensaio foi feito variando-se a concentração do substrato 3-nitro-4(octanoiloxi) ácido benzóico de acordo com o método 3.7.

### **3.9 Efeito do pH na atividade PLA<sub>2</sub>**

O efeito do pH sobre a atividade PLA<sub>2</sub> foi realizado em meios de reação preparados com diferentes valores de pH (4.0-10.0), sendo que a determinação da atividade PLA<sub>2</sub> e a concentração da enzima idêntica ao item 3.7 e para cada pH foi feito um controle. Os tampões utilizados nesse experimento foram: tampão citrato de sódio-HCl pHs 4.0; 5.0 e 5.5, tampão fosfato-NaCl pHs 6.0; 7.0, tampão Tris-HCl pHs 8.0; e tampão glicina-NaOH pHs 9.0; 10.0, respectivamente.

### **3.10 Efeito da temperatura na atividade PLA<sub>2</sub>**

O experimento para a observação do efeito da temperatura sobre a atividade PLA<sub>2</sub> foi realizado segundo método descrito em 3.7 com ensaio padrão contendo: 100ul de água

deionizada. 1000ul de tampão (Tris-HCl 10mM, NaCl 100mM, pH 8.0) e 100ul de PLA<sub>2</sub>. A temperatura varia de 25°C-44°C e foi mantida por 20 minutos e foi lida em seguida a 425nm.

### **3.11 Efeito dos íons bivalentes na atividade PL A<sub>2</sub>.**

A atividade PLA<sub>2</sub> na presença de íons bivalentes, como Ca<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, e Cd<sup>2+</sup> foi determinada segundo método descrito em 3.7.

### **3.12 Efeito inibitório por crotapotinas crotálicas**

Para avaliação do efeito inibitório das crotapotinas obtidas foi utilizado os mesmos protocolos para determinação da atividade fosfolipásica A<sub>2</sub>. A PLA<sub>2</sub> isolada, 1 mg/ml, foi pré-incubada por 20 minutos no tampão de reação com crotapotina de *Crotalus durrisus cascavela* na razão de 1:1 (M/M); o meio de pré-incubação foi o mesmo do ensaio enzimático sem enzima. Após este tempo de incubação as amostras de PLA<sub>2</sub> e crotapotina foram colocadas no meio de reação. A velocidade da reação enzimática é expressa em (nmoles/min/mg) de produto formado.

### **3.13 Medida da atividade neurotóxica em músculo biventer cervicis de pintainho**

A preparação foi isolada e montada de acordo com o método de Ginsborg e Warriner (1960). Os pintainhos foram anestesiados com éter etílico e, após o isolamento, o músculo foi suspenso em uma cuba de 5ml, contendo solução nutritiva de Krebs, com a seguinte composição em mM: NaCl 118.6; KCl 4.69; CaCl<sub>2</sub> 1.88; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.17; MgSO<sub>4</sub> 1.17; NaHCO<sub>3</sub> e C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub> 11.65. A solução foi arejada de modo constante com carbogênio (mistura 95% O<sub>2</sub> e 5% CO<sub>2</sub>) e mantida a 37C<sup>o</sup>. A preparação foi submetida a uma tensão constante de 0.5g e estimulada por meio de eletrodos bipolares (estimulação de campo). Foram aplicados pulsos supramaximais de 0.1Hz de frequência e 0.2ms de duração (estimulador Grass S48). As contrações musculares resultantes de estímulos elétricos máximos e as contrações em resposta à adição de KCl (13.4 mM) e ACh (110 µM) foram registradas em fisiógrafo Gould RS3400, por meio de transdutores isométricos Load Cell BG-10 GM. Os registros das contrações para KCl e ACh foram realizados com ausência de estimulação elétrica, no início (antes da adição de veneno) e no final do experimento (após 120 min de incubação com o veneno). As concentrações de toxinas isoladas utilizadas foram 10, 20, 30 e 50µg/ml (Ponce-Soto et al. 2007).

### **3.14 Determinação do efeito citotóxico em cultura celular de mioblastos e miotubos (C<sub>2</sub>C<sub>12</sub>) da PLA2 BbilTX isolada a partir do veneno de *Bothriopsis bilineata*.**

Determinou-se o efeito citotóxico em cultivo celular de mioblastos C<sub>2</sub>C<sub>12</sub>, por ação da PLA<sub>2</sub> BbilTX de *Bothriopsis bilineata*.

Uma micro-placa de 96 pocos foi utilizada como desenho experimental, escolhendo-se um n<sup>o</sup> correspondente a 3 pocos previamente preenchidos com uma cultura celular de mioblastos C<sub>2</sub>C<sub>12</sub>, em um meio DME com 10 – 15% de soro fetal bovino (SFB) a 37°C e CO<sub>2</sub> 5% (50uL) previamente incubado em uma estufa de cultura celular.

Depois de retirar 150ul de meio (sobrenadante) foi acrescentado 150ul de amostra previamente dissolvida em PBS, contendo as seguintes concentrações: 5, 10, 20 e 40 µg. Consideram-se dois tipos de controles: positivo em presença de Triton X-100 (+) e negativo só na presença de meio de cultura de DME contendo soro fetal bovino a 1% (-), afim de poder estabelecer parâmetros percentuais (%) de 0 a 100% de quantificação de lactato desidrogenase (LDH). Depois de 3 horas, retirou-se, de cada poco, 100 ul do sobrenadante, sendo estimada a liberação da enzima lactato desidrogenase (LDH), liberada como resultado da lise celular por ação da toxina.

O meio de reação contém 1ml do substrato preparado de acordo com o indicado pelo kit do fabricante (LDH-P UV Método UV otimizado SFBC Lab. Winer), previamente incubado por dois minutos a 30°C. Logo se acrescenta 80 uL do sobrenadante, depois incubado por 3 minutos aproximadamente. E, em seguida, lê-se a absorbância a 340 nm.

Posteriormente ao valor obtido como negativo, transformou-se em simples positivo e multiplicou-se por 1000. O valor obtido é convertido em valor porcentual (%), em relação ao controle positivo máximo encontrado com o Triton X-100.

### **3.15 Determinação da atividade inflamatória (Edema de pata).**

Para o presente experimento, foram utilizadas uma solução stock inicial de 400g/ml de PBS (20µg/50ul). Depois foram feitas diluições, tomando-se 500ul da primeira e mesclando-se com 500ul de PBS (10µg/50ul). Logo se tomou 500ul dessa e mesclou-se com outros 500ul de PBS (5µg/ul). E finalmente é feita a última diluição sob o mesmo procedimento para alcançar uma concentração de 2.5µg/50ul.

Inocula-se, via intraplantar 50µg/50ul, grupos de cinco camundongos de 18 a 20 g de peso, determinando-se, 30 minutos, 1 hora, 3 horas, 6 horas e 24 horas após da inieção, a

porcentagem de edema produzido, mediante comparação entre o aumento em mm da pata inoculada com a toxina e o aumento da pata inoculada com solução de PBS.

### **3.16 Avaliação do efeito inibitório do fator anti-hemorrágico DA2-II isolado do soro de *Didelphis albiventris* sobre as atividades biológicas da miotoxina isolada.**

Foi avaliado o efeito do fator anti-hemorrágico isolado do soro de *Didelphis albiventris* (Gambá de orelha branca) na atividade edematogênica da PLA<sub>2</sub> isolada. A fração isolada foi pré incubada com o fator anti-hemorrágico DA2-II por 30 minutos à 37°C em diferentes proporções de fator anti-hemorrágico/PLA<sub>2</sub> (peso/peso: 4:1; 2:1; 1:1; ou 0.5:1). depois a PLA<sub>2</sub> ou a mistura (PLA<sub>2</sub>/fatores anti-hemorrágicos) serão aplicados segundo as metodologias descritas em 3.15.

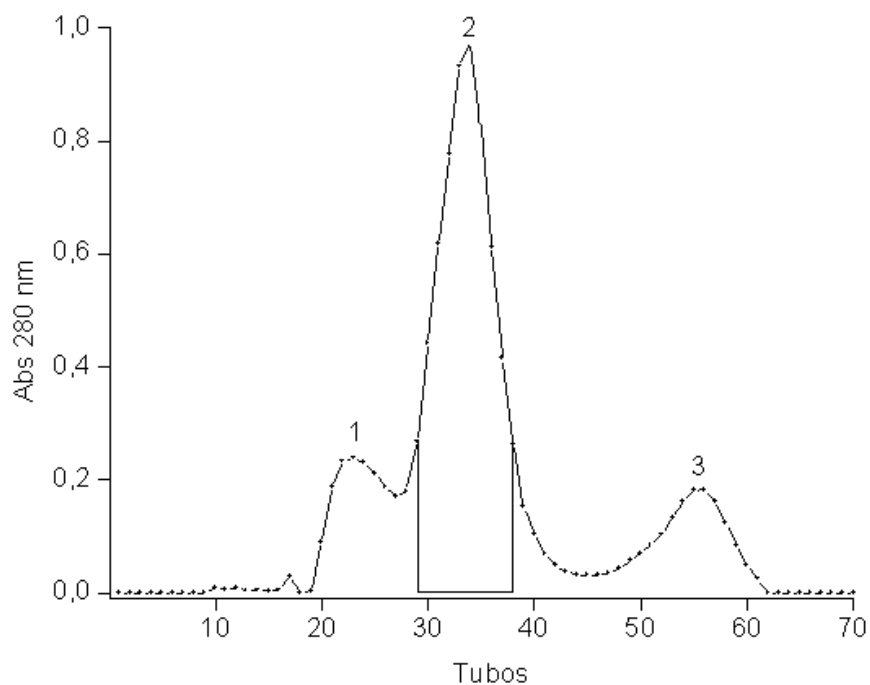


## 4. RESULTADOS

### 4.1 Perfil cromatográfico de exclusão molecular em uma coluna de Sephadex G-75

O perfil cromatográfico do veneno total de *Bothriopsis bilineata*, mostra a presença de três picos maioritários os quais foram denominados como 1, 2 e 3 respectivamente.

Foram avaliadas as atividades PLA<sub>2</sub>, sendo detectada no pico 2 (Figura 3), o qual foi submetido para uma maior purificação a uma nova etapa cromatográfica em sistema de HPLC.



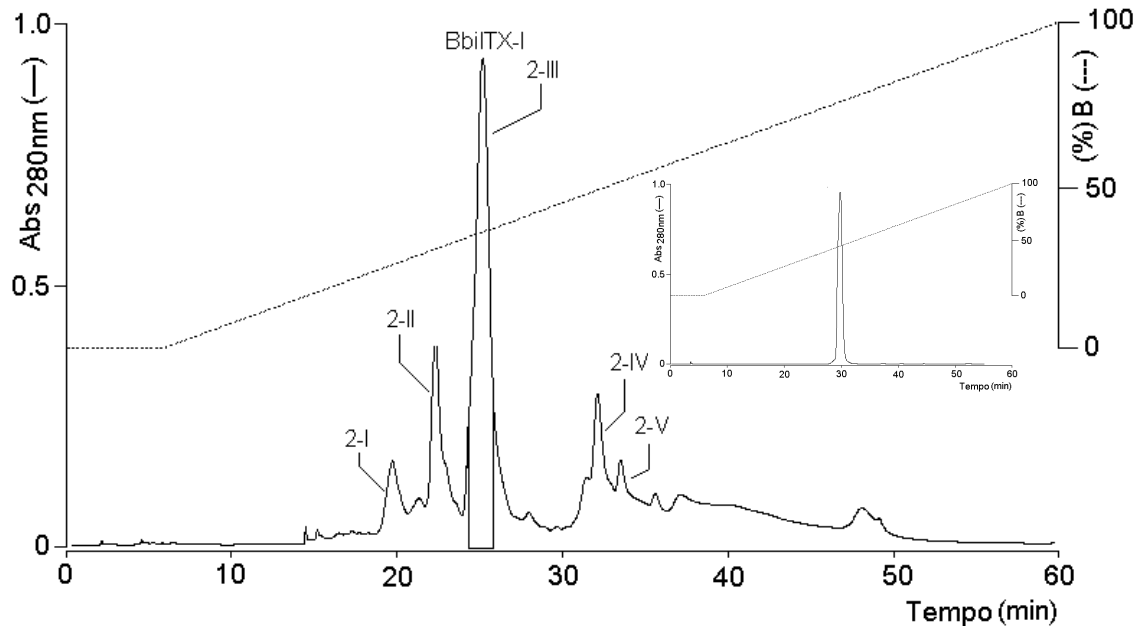
**Figura 3:** Perfil cromatográfico da purificação do veneno total de *Bothriopsis bilineata* 50mg foram aplicados em uma coluna de Sephadex G-75. A corrida foi realizada com tampão bicarbonato de amônio (0,2M pH 7,8), a um fluxo constante de 0,25ml/min. A figura 3 mostra a cromatografia do veneno total de *Bothriopsis bilineata*, sendo os picos denominados como 1, 2 e 3 respectivamente. As frações foram coletadas, agrupadas e posteriormente liofilizadas. O pico destacado contém a atividade de PLA<sub>2</sub>.

#### 4.2 Perfil cromatográfico em HPLC de fase reversa

A Figura 4 mostra o perfil cromatográfico da fração 2, obtida previamente, da purificação de exclusão molecular em Sephadex G-75. A qual foi submetida a uma coluna u-Bondapak C-18 (0.78 cm X 30 cm) preparativa (Waters), acoplada a um sistema de HPLC de fase reversa.

Verificam-se a presença de 5 picos os quais foram denominados como 2-I, 2-II, 2-III, 2-IV e 2-V. Dos cinco picos obtidos só o pico 2-III apresenta atividade PLA<sub>2</sub>, e para garantir sua homogeneidade molecular, foi re-purificado novamente em uma coluna u-Bondapak C-18 (0.78 cm X 30 cm) preparativa (Waters), acoplada a um sistema de HPLC de fase reversa (Figura 4, figura inserida).

O pico 2-III foi denominado como BbilTX-I e foi utilizado para a respectiva caracterização físico-química quanto biológica.

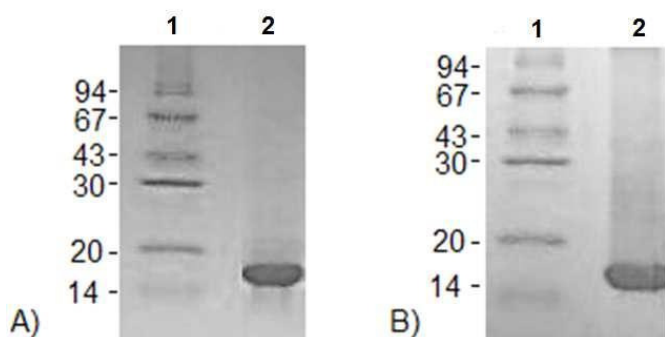


**Figura 4.** Perfil cromatográfico da purificação da fração 2 utilizando uma coluna u-Bondapak C-18 (Waters) acoplada a um sistema de HPLC de fase reversa. 5mg da fração 2 foram dissolvidos em 200  $\mu$ L de TFA ao 0.1% e foi aplicado em uma coluna u-Bondapak C-18 (Waters). A eluição da amostra é realizada usando-se um gradiente linear contínuo de concentração do tampão B (Acetonitrila 60%, TFA 0.025%). O fluxo é mantido constante a 1ml/min. O monitoramento da corrida cromatográfica é realizado a 280 nm de absorvância. O pico destacado corresponde a fração BbilTX-I. O gráfico inserido mostra o grau de pureza da fração BbilTX-I.

### 4.3 Eletroforese em SDS-PAGE da fração BbilTX-I

O perfil de massa molecular em PAGE-SDS da fração BbilTX-I é mostrado em condições reduzidas (com a presença de DDT, onde a proteína se encontra desovelada) e não reduzidas (sem a presença de DDT) (Figura 5.A.B pista 2) e apresenta uma única banda protéica com mobilidade molecular restrita, indicativo de homogeneidade molecular. Possui massa molecular relativa de ~15KDa em relação aos marcadores de massa molecular ( Figura 5.A.B pista 1).

Nas condições reduzidas e não reduzidas a presença de uma única banda protéica é indicativo também de que essa PLA<sub>2</sub> possui uma única cadeia polipeptídica.



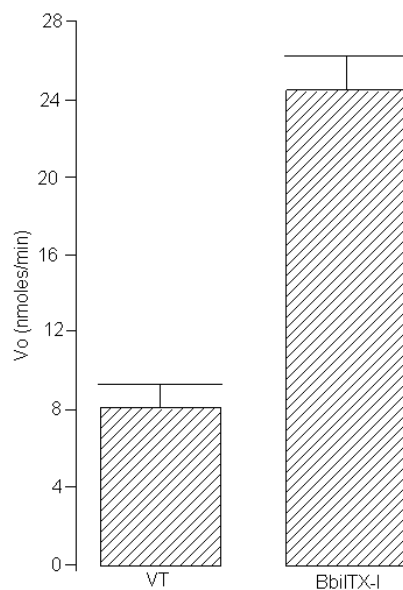
**Figura 5.** Eletroforese em gel de poliacrilamida 12.5% (M/V). (Fig.5.A, pista 2)- BbilTX-I em condições não reduzidas. (Fig.5.B, pista 2)- BbilTX-I em condições reduzidas. Mk – Pista 1: 6 marcadores de massa molecular: Fosforilase b – 94. Albumina – 67. Ovoalbumina – 43. Anidrase carbónica – 30. inibidor de tripsina – 20.1.  $\alpha$  Lactoalbumina 14.4. A corrida foi realizada com amperagem constante de 30 mA. Os géis foram corados com solução de Coomassie Blue 0.05% a 37°C. o excesso de corante foi removido em ácido acético 7%.

#### 4.4 Avaliação da atividade PLA<sub>2</sub>.

A medida da atividade PLA<sub>2</sub> foi realizada segundo Cho e Kézdy (1991), Holzer e Mackesev (1996) e adaptado para micro-placa por Ponce-Soto *et al.*, (2006) usando o 4-nitro-3-(octanovloxy) ácido benzóico como substrato cromogênico.

A atividade PLA<sub>2</sub> para o veneno total de *Bothriopsis bilineata* é de  $8.15 \pm 1.24$  nmoles/min e para a fração BbilTX-I foi de  $24.75 \pm 2.68$  nmoles/min respectivamente, mostrando assim a fração uma maior atividade enzimática quando comparada com a atividade do veneno total (Figura 6).

Este fato evidencia a otimização no processo cromatográfico, pois foi capaz de mostrar não só a integridade das moléculas, mas ao mesmo tempo a preservação da atividade catalítica.

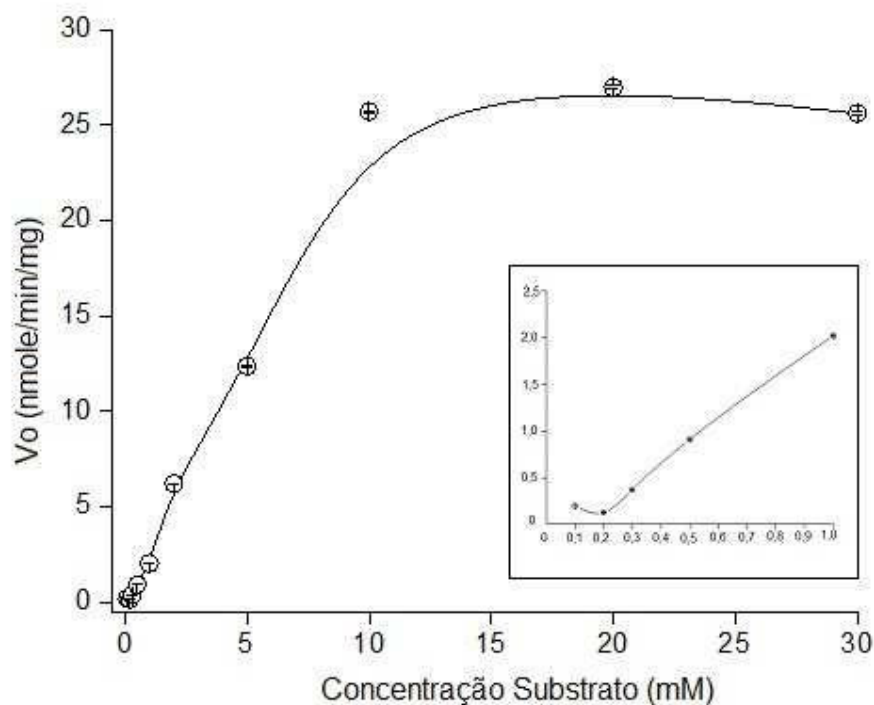


**Figura 6** Atividade PLA<sub>2</sub> proveniente do veneno total de *Bothriopsis bilineata* (VT) e da fração BbilTX-I, utilizando o 4-nitro-3-(octanovloxy) ácido benzóico como substrato cromogênico. n=3.

## 4.5 Estudos da atividade cinética da PLA<sub>2</sub> BbilTX-I

### 4.5.1 Efeito da concentração de substrato na atividade PLA<sub>2</sub> BbilTX-I

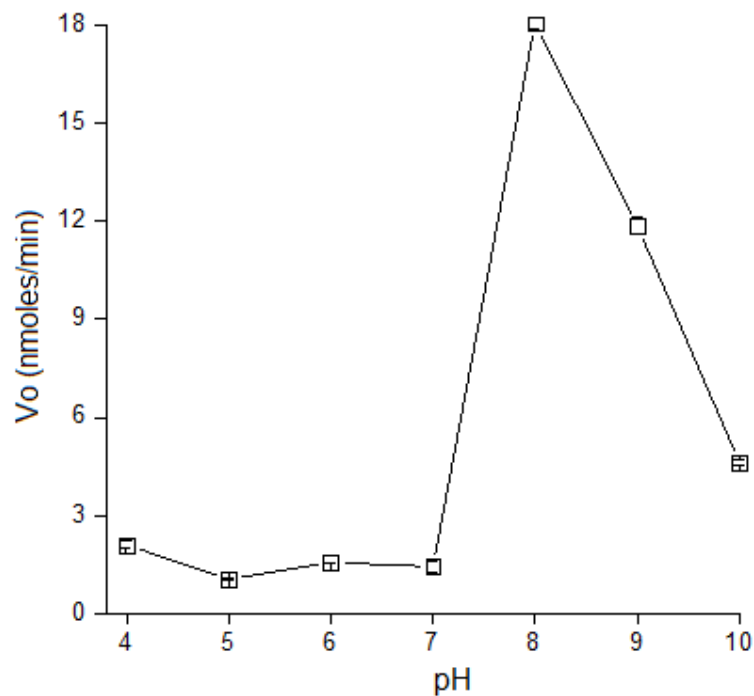
O efeito da concentração do substrato na atividade PLA<sub>2</sub> da BbilTX-I sobre o substrato 4-nitro-3-(octanoiloxi) ácido benzóico mostrou que a PLA<sub>2</sub> tem um comportamento com tendência alostérica devido ao perfil apresentado no início da curva (Figura 7. figura inserida).



**Figura 7.** Efeito da concentração do substrato ácido 4-nitro-3- (octanoiloxi) benzóico na atividade PLA<sub>2</sub> da BbilTX-I. O ensaio foi realizado conforme descrito no método 3.7 variando-se a concentração de substrato. Os experimentos foram realizados em triplicata e as barras representam o desvio padrão. Gráfico inserido: detalhes a baixa concentração de substrato.

#### 4.5.2 Efeito do pH na atividade da PLA<sub>2</sub> BbilTX-I

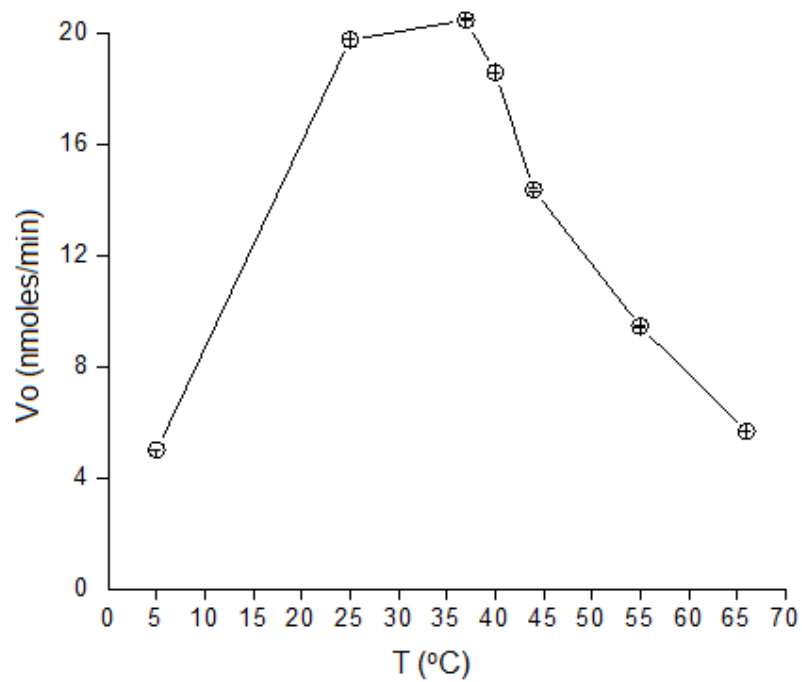
O pH ótimo da PLA<sub>2</sub> BbilTX-I. foi determinado. incubando a enzima em diferentes pHs (4-10) sendo feito um controle para cada pH. O pH ótimo para a PLA<sub>2</sub> BbilTX-I foi 8.0 como mostrado na Figura 8.



**Figura 8.** Efeito da variação de pH sobre a atividade PLA<sub>2</sub> da BbilTX-I. O ensaio foi realizado conforme descrito no método 3.7 e os tampões utilizados na concentração de 10 mM. foram: Citrato de sódio-HCl (pHs 4.5:5 e 5.5); tampão fosfato-NaCl (pHs 6: 6.5: 7 e 7.5), tampão Tris-HCl (pHs 8 e 8.5); e tampão glicina-NaOH (pHs 9: 9.5 e 10). O tempo de reação foi de 20 minutos a 37°C. Os experimentos foram realizados em triplicata e as barras representam o desvio padrão.

#### 4.5.3 Efeito da Temperatura na Atividade da PLA<sub>2</sub> BbilTX-I

O efeito da temperatura na atividade da PLA<sub>2</sub> foi determinado incubando em diferentes temperaturas (5-66°C). A atividade da enzima a 37°C foi considerada 100% (Figura 9).

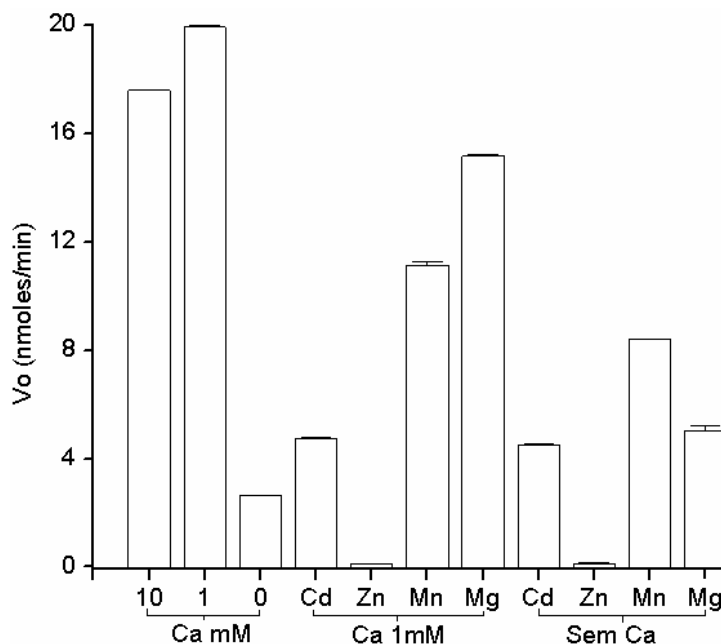


**Figura 9.** Efeito da variação temperatura sobre a atividade PLA<sub>2</sub> da BbilTX-I. O ensaio foi realizado nas mesmas condições descritas no método 3.7.

#### 4.5.4 Efeito de alguns íons na atividade PLA<sub>2</sub> BbilTX-I

A atividade da PLA<sub>2</sub> foi determinada na presença de alguns íons tais como Mn<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, e Cd<sup>2+</sup> (10mM), na presença de Ca<sup>2+</sup> (1mM) e sem a presença de Ca<sup>2+</sup>. Sendo que a atividade normal foi feita com Ca<sup>2+</sup> 10mM e 1mM.

A atividade PLA<sub>2</sub> frente aos íons Mn<sup>2+</sup> e Mg<sup>2+</sup> (10 mM) na presença de Ca<sup>2+</sup> (1mM) foi 11.14 nmoles/min e 15.6 nmoles/min. Já quando estes íons se encontram sem a presença do Ca<sup>2+</sup> a atividade PLA<sub>2</sub> caiu para Mn<sup>2+</sup> 8.39 nmoles/min e Mg<sup>2+</sup> 5.03. Na presença do Zn<sup>2+</sup> a BbilTX-I não apresentou atividade PLA<sub>2</sub> com ou sem a presença do Ca<sup>2+</sup>. O Cd<sup>2+</sup> não apresentou uma diferença significativa na atividade PLA<sub>2</sub> com a presença de Ca<sup>2+</sup> (4.73 nmoles/min) e sem o Ca<sup>2+</sup> (4.50 nmoles/min) (Figura 10).



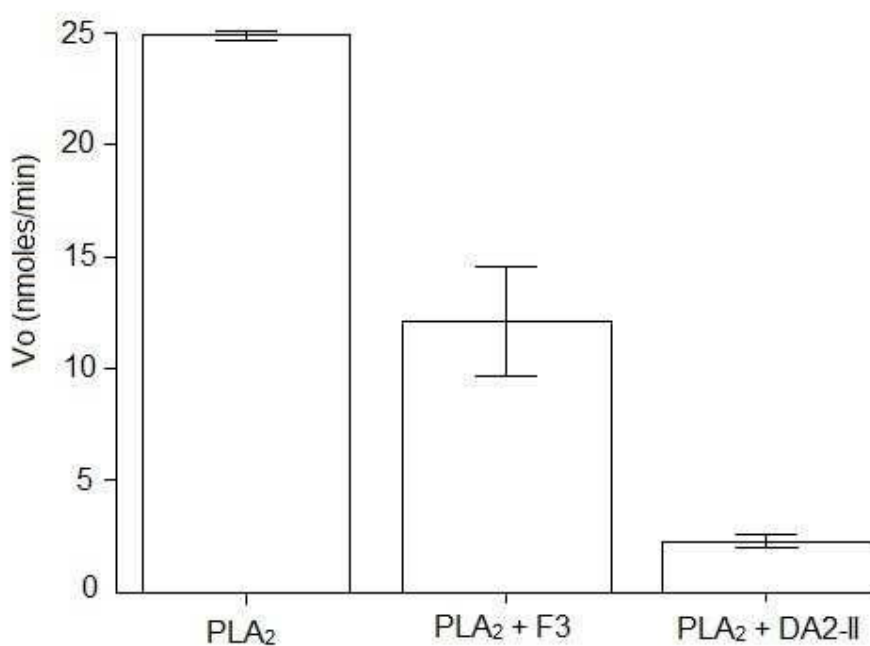
**Figura 10.** Influência de íons na atividade da PLA<sub>2</sub> BbilTX-I. O ensaio foi realizado conforme descrito no método 3.7, utilizando tampões: Tris-HCl (10mM), contendo os íons Mg<sup>2+</sup>, Cd<sup>2+</sup> e Mn<sup>2+</sup> (10 mM), NaCl (100mM), com concentração de CaCl<sub>2</sub> subótimas (1mM) e com ausência de CaCl<sub>2</sub>. O tempo de reação foi de 20 minutos a 37°C.



#### 4.5.5 Medida da atividade inibitória da isoforma de crotopotina (F3) de *Crotalus durissus cascavella* e do fator anti-hemorrágico DA2-II isolado do soro de *Didelphis albiventris* sobre a atividade PLA<sub>2</sub> da BbilTX-I

A inibição da atividade PLA<sub>2</sub> da BbilTX-I, pela isoforma de crotopotina de *Crotalus durissus cascavella* e do fator anti-hemorrágico (F3 e DA2-II), foram determinadas incubando cada uma delas com a PLA<sub>2</sub> BbilTX-I na razão molar de 1:1 por 30 minutos a 37°C.

A crotopotinas F3 e o fator anti-hemorrágico DA2-II foram capazes de inibir a atividade PLA<sub>2</sub> em mais de 50% como mostrado na Figura 11.



**Figura 11** - Inibição da PLA<sub>2</sub> BbilTX-I pela crotopotina F3 de *Crotalus durissus cascavella* e pelo fator anti-hemorrágico DA2-II.

## 4.6. Análise Estrutural

### 4.6.1 Análise de Composição de Aminoácidos.

Com relação à análise da composição de aminoácidos a Tabela 1 mostra que a fração BbilTX-I trata-se de uma proteína de caráter básica (alto conteúdo de Lvs, His e Arg).

A presença de 14 cisteínas e o número de aminoácidos determinado (121) sugere que a fração BbilTX-I pertence à família das PLA<sub>2</sub> provenientes de serpentes, pois são capazes de compartilhar estas características semelhantes.

O alto conteúdo de aminoácidos hidrofóbicos sugere a grande estabilidade da enzima em sua cinética de reação.

**Tabela 1** Composição de aminoácidos das PLA<sub>2</sub> BbilTX-I isolada do veneno de *Bothriopsis bilineata*. Os valores são expressos em mol de aminoácidos por mol de proteína. (ND)= não determinado

Aminoácido	BbilTX-I
Asp	11
Glu	12
Ser	2
Gly	10
His	1
Arg	6
Thr	7
Ala	7
Pro	9
Tyr	9
Val	4
Met	2
Cys	14
Ile	3
Leu	7
Phe	4
Lys	12
Trp	ND
<b>TOTAL</b>	<b>121</b>

#### 4.6.2 Estudo de homologia seqüencial da região N-terminal

A homologia seqüencial dos 26 resíduos de aminoácidos da região N-terminal da fracção com atividade PLA<sub>2</sub> BbilTX-I. foi submetida no banco de dados de proteínas (Altschul et al., 1990), com seqüências já determinadas e registradas, mostrando homologia com um alto grau de similaridade, conforme o estabelecido na Figura 12. Assim temos que a análise da homologia seqüencial mostra que a faixa se encontra entre 73,1 – 76,9% de similaridade.

A presença do resíduo de cisteína na posição 26 revela o grau de conservação deste tipo de aminoácido que contribui para a possível formação de uma ponte dissulfeto na fracção BbilTX-I, embora não tenha sido determinada a estrutura primária.

A região demarcada da Figura 12 representa a seqüência consenso entre as diferentes PLA<sub>2</sub> provenientes de serpentes, indicando tanto regiões altamente conservadas quanto variáveis. A região N-terminal apresenta uma importante mutação, a Pro na posição 19 pela Ser que apresenta a fracção BbilTX-I, a qual será comentada na discussão.

	10	20	% Identidade
BbilTX_I	D L W E L N K M I L K E T G K L P F S Y Y G A Y G C ...	100,0	
6-1 PLA <sub>2</sub>	D L <b>F E W G Q</b> M I L K E T G K <b>N</b> P F P Y Y G A Y G C ...	76,9	
6-2 PLA <sub>2</sub>	D L W <b>Q F G Q</b> M I L K E T G K <b>I</b> P F P Y Y G A Y G C ...	76,9	
BmTX-I PLA <sub>2</sub>	D L W <b>Q F N K M I K</b> K E <b>V</b> G K L P F P <b>F</b> Y G A Y G C ...	76,9	
BthTX-II	D L W <b>Q W G Q</b> M I L K E T G K L P F P Y Y <b>T T</b> Y G C ...	73,1	
Cr-IV 1 PLA <sub>2</sub>	D L W <b>E F G Q</b> M I L K E T G <b>S</b> L P F P Y Y <b>T T</b> Y G C ...	73,1	

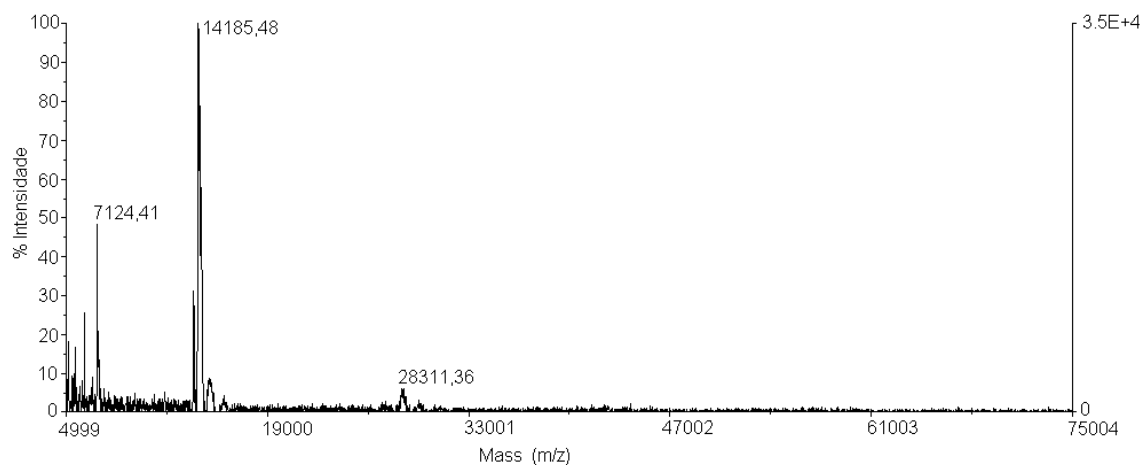
**Figura 12** Análise da homologia seqüencial comparativa da fracção BbilTX-I com atividade PLA<sub>2</sub> com outras PLA<sub>2</sub>. A parte demarcada determina a região de uma seqüência invariável entre as diferentes PLA<sub>2</sub>. Assim temos: 6-1 e 6-2 isoformas da fracção BthTX-II de *Bothrops ijararacussu* (Ponce-Soto et al., 2006); BmTX-I PLA<sub>2</sub> de *Bothrops mooieni* (Kalgaroto et al., 2008); BthTX-II de *Bothrops ijararacussu* (Pereira, et al., 1998) e a Cr-IV 1 PLA<sub>2</sub> de *Calloselasma rhusotoma* (Bonfim et al., 2008) o- Prolina(P) na posição 19 na BbilTX-I foi trocada por Serina (S).

#### 4.6.3 Espectro de massa da fracção BbilTX-I

Através desta análise, pode-se constatar o grau de pureza da fracção com atividade PLA<sub>2</sub> BbilTX-I, de *Bothriopsis bilineata*, obtida a partir da cromatografia de fase reversa em uma coluna  $\mu$ -Bondapak C-18 (Waters).

A fracção BbilTX-I apresenta uma massa molecular de 14185.48 Da, segundo o que é mostrado na Figura 13, sendo que a determinação da massa molecular real mostra que não existe diferença significativa entre a massa determinada por eletroforese em SDS-PAGE.

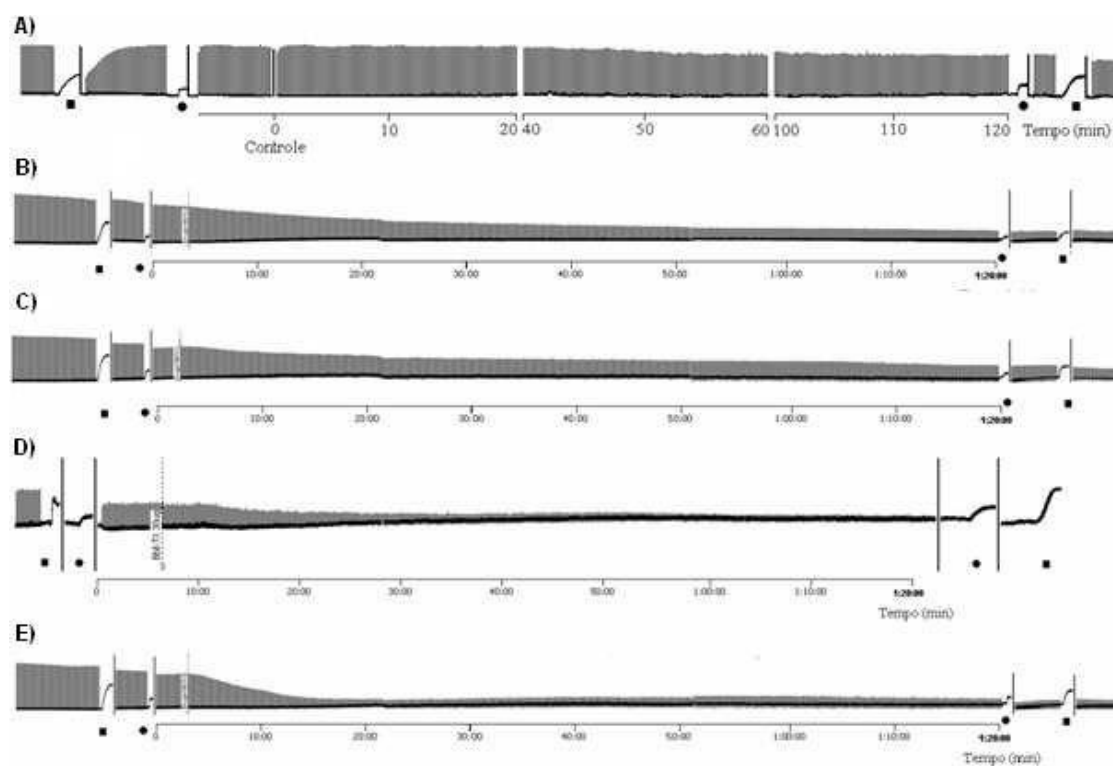
A análise realizada por espectrometria de massa (MALDI-ToF) (Figura 8), pode-se notar a presença de dois picos a mais, um de massa 7124.41 Da e o outro de 28311.36 Da respectivamente. Cada um deles representa a massa real dividida por dois, mais um próton ( $H^+$ ) e o outro representa a massa real multiplicada por dois, referidos à formação de um dímero de massas real (2X), o que confirma que os parâmetros empregados na determinação de tipo linear foram adequadamente calibrados.



**Figura 13** A massa molecular da fracção BbilTX-I com atividade PLA<sub>2</sub> de *Bothriopsis bilineata* é analisada por Espectrometria de Massas, utilizando-se um Voyager DE PRO Maldi-TOF mass spectrometry (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). 1  $\mu$ L da amostra em TFA 0.1% é misturada em 2  $\mu$ L da matriz, e analisada sob as condições seguintes: aceleração de voltagem 25 kV, o laser ajustado a 2890 mJ/cm<sup>2</sup>, em 300 ns e o modo de análise é linear.

#### 4.7 Estudo da atividade neurotóxica na preparação biventer cervicis de pintainho da Fracção BbilTX-I de *Bothriopsis bilineata*.

A figura 14 representa o experimento realizado com uma das preparações de Biventer cervicis de pintainho, demonstrando as contrações e o bloqueio neuromuscular acima de 50% causados pelo efeito neurotóxico da PLA<sub>2</sub> BbilTX-I. Este mesmo experimento foi realizado em um n=5 que serviu de base para o gráfico da figura 15.

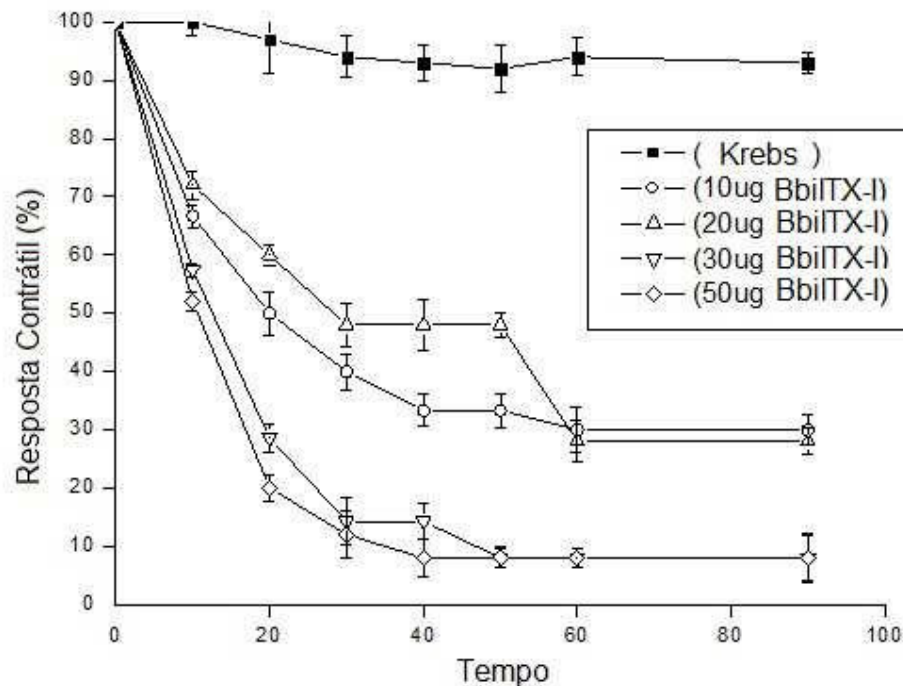


**Figura 14.** Em A, registro controle Krebs; B,C,D e E, efeito bloqueador neuromuscular após a incubação da preparação com a fracção BbilTX-I na concentração 10, 20, 30 e 50µg/ml. Na ausência de estímulo elétrico observar a contratura em resposta à adição de ACh (●110 mM) e KCl (■10mM) antes e após o tratamento com BbilTX-I.

Os experimentos realizados correspondem a um n=5. na preparação biventer cervicis de pintainho. Os resultados evidenciam que a PLA<sub>2</sub> BbilTX-I apresenta um efeito inibidor sobre a transmissão neuromuscular (Figura 15).

O tempo para atingir um bloqueio de 50 % da resposta contrátil é, para dose de 10  $\mu\text{g/ml}$  de  $\pm 20$  min, para dose de 20  $\mu\text{g/ml}$   $\pm 30$  min, para dose de 30  $\mu\text{g/ml}$  é  $\pm 22$  min e para dose de 50  $\mu\text{g}$  é  $\pm 20$  min (Figura 15).

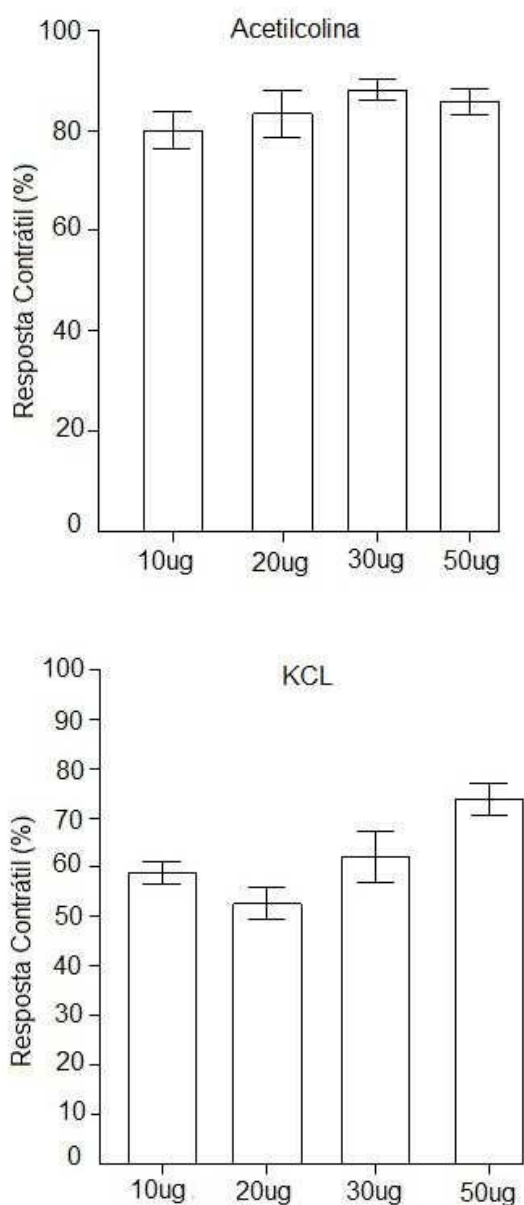
As doses de 30  $\mu\text{g}$  e 50  $\mu\text{g/ml}$  causaram bloqueio irreversível pós-50 minutos como se observa nos registros miográficos, a dose de 10  $\mu\text{g/ml}$  e 20  $\mu\text{g/ml}$  se manteve estável após os 50 minutos, não aumentando o bloqueio e não atingindo o bloqueio total.



**Figura 15.** Representação gráfica do bloqueio da resposta contrátil na transmissão neuromuscular na preparação biventer cervicis de pintainho (Estímulo indireto) pela ação da PLA<sub>2</sub> BbilTX-I nas doses de 10, 20, 30 e 50  $\mu\text{g/ml}$ . O bloqueio neuromuscular foi dose-dependente. Cada ponto corresponde a média  $\pm$  erro padrão de 5 experimentos. Representação gráfica de 50 % do bloqueio da transmissão neuromuscular.

#### 4.8 Contraturas induzidas por Acetilcolina (ACh) e Potássio (KCl) em preparações biventer cervicis de pintainho (BCp) antes e após a adição da PLA<sub>2</sub> BilTX-I

Após a adição das doses de 10 $\mu$ g, 30 $\mu$ g e 50 $\mu$ g da fracção BbilTX-I isolada a partir do veneno total da *Bothriopsis bilineata*, houve uma discreta diminuição na resposta à adição de acetilcolina (ACh) 110mM e KCl 10mM se comparado à contratura antes da adição da toxina (Figura 16).



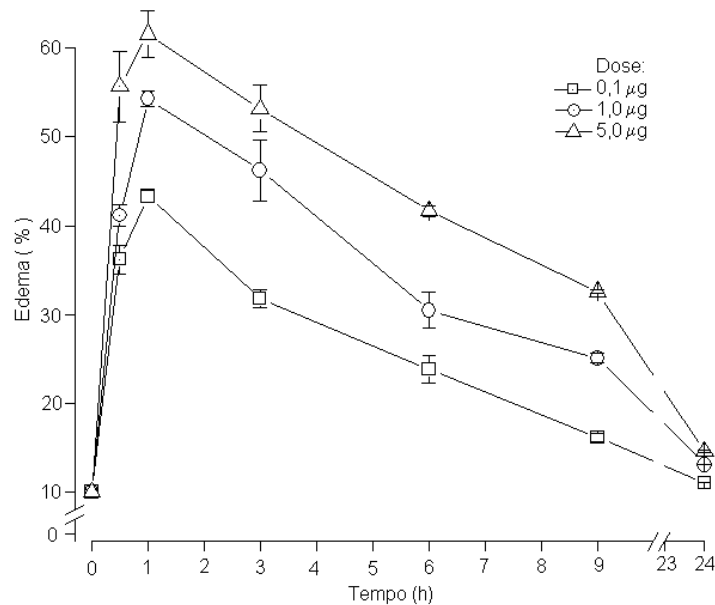
**Figura 16.** Porcentagem de bloqueio da resposta contraturante à acetilcolina (ACh) e ao potássio, na forma de KCl, com as dosagens de 10, 30 e 50  $\mu$ g/ml de veneno total da PLA<sub>2</sub> BilTX-I de *Bothriopsis bilineata* em músculo biventer cervicis de pintainho.

#### 4.9 Determinação da atividade inflamatória (Edema de pata) induzida pela fracção BbilTX-I.

Para o estudo da atividade inflamatória analisou-se um dos eventos que ocorre neste processo, a formação de edema. Para isto, foram empregadas três doses: 0.1; 1.0 e 5.0 $\mu$ g da fracção com atividade PLA<sub>2</sub> BbilTX-I que foram dissolvidas em um volume de 50  $\mu$ l de PBS, e aplicadas na região intraplantar da pata direita de camundongos (18 – 20 g). A pata esquerda recebeu 50  $\mu$ l de PBS como controle. As leituras foram feitas após 0.5, 1, 3, 6, 9 e 24 horas de aplicação da fracção.

O edema foi expresso como o porcentual de aumento em milímetros da pata direita com relação à pata esquerda. A Figura 17 mostra que a fracção com atividade PLA<sub>2</sub> BbilTX-I é capaz de induzir um intenso edema, superando a concentração mínima edematogênica (30%). A seguinte tabela mostra os valores do edema formado em resposta a cada dose, pode ser observado que mesmo na concentração de 0.1  $\mu$ g uma hora após o tratamento, o edema formado é significativo, como resultado de um aumento na permeabilidade vascular.

Tempo (h)	0.1 $\mu$ g	$\pm$ SD	1.0 $\mu$ g	$\pm$ SD	5.0 $\mu$ g	$\pm$ SD
0	10	0	10	0	10	0
0.5	36.21	1.63	41.19	1.22	55.67	4
1	43.29	0.64	54.28	0.86	61.57	2.67
3	31.82	1.01	46.25	3.45	53.19	2.6
6	23.78	1.53	30.49	1.98	41.64	0.57
9	16.15	0.45	25.08	0.56	32.55	0.22
24	11.06	0.01	13.1	0.04	14.61	0.12



**Figura 17.** Atividade inflamatória da PLA<sub>2</sub> BbilTX-I isoladas de veneno de *Bothriopsis bilineata* em camundongos (18-20g). Cada ponto representa a média  $\pm$  o desvio-padrão de um grupo de 4 animais.

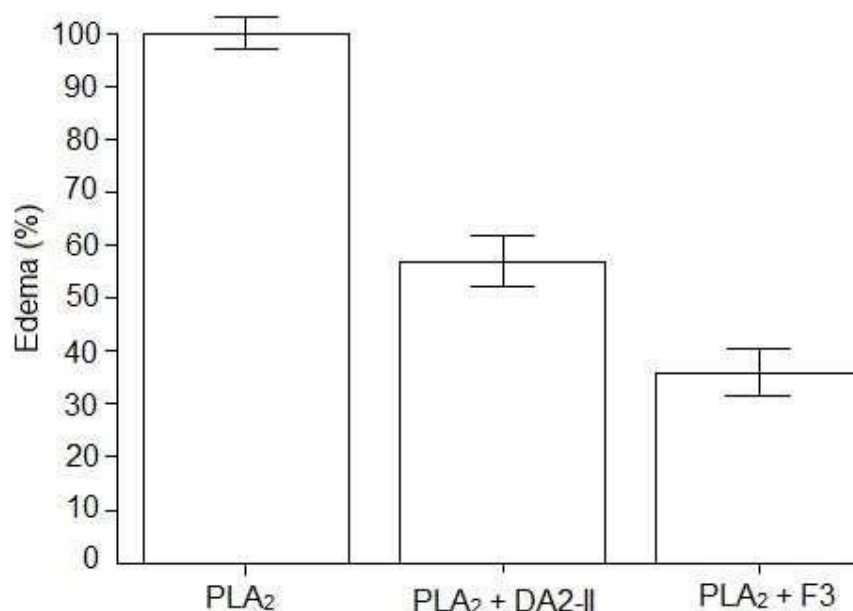


#### 4.10 Medida da atividade inibitória da isoforma de crotopotina (F3) isolada do veneno de *Crotalus durissus cascavella* e do fator anti-hemorragico isolado de soro de *Didelphis albiventris* (DA2-II) sobre a atividade edematizante (inflamatória) da PLA<sub>2</sub> BbilTX-I.

Foi estimada a ação inibitória da isoforma da crotopotina (F3) e do fator anti-hemorragico (DA2-II) sobre a ação inflamatória da PLA<sub>2</sub> BbilTX-I procedente do veneno da serpente *Bothriopsis bilineata* através de edema de pata. A PLA<sub>2</sub> BbilTX-I é incubada com os inibidores na razão molar 1:1 (F3 e DA2-II) por 30 minutos a uma temperatura de 37<sup>0</sup>C.

Foram inoculadas as soluções (F3 e DA2-II), a PLA<sub>2</sub> BbilTX-I e PBS, na região subplantar das patas do camundongo. A figura 18 mostra a ação inibitória da inflamação pela crotopotina (F3) e do fator anti-hemorragico (DA2-II). Os resultados demonstram que houve uma inibição parcial de aproximadamente 30% da inflamação com o fator DA2-II e de mais de 50% com a crotopotina F3, comparadas com a ação da PLA<sub>2</sub> BbilTX-I sem a presença dos agentes inibidores.

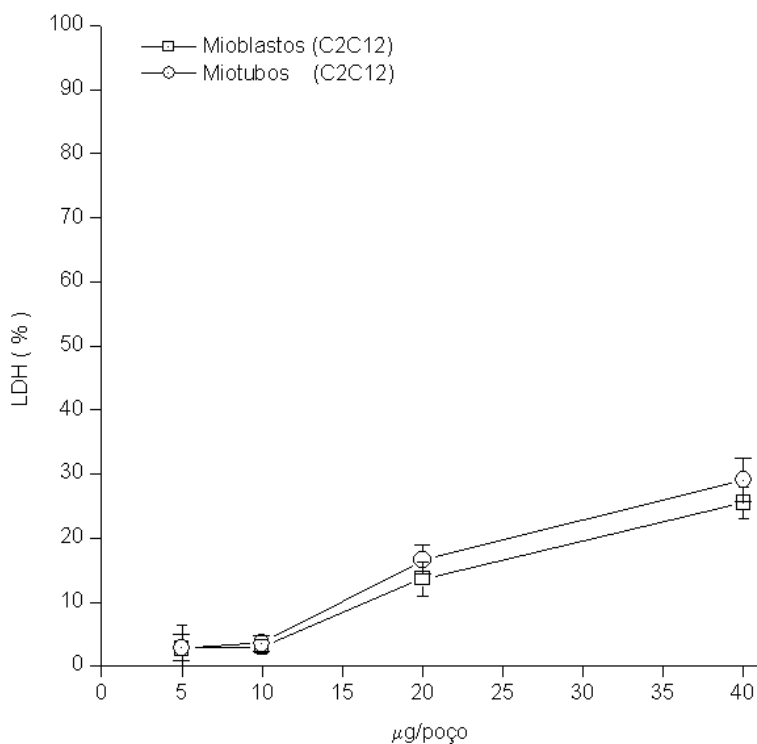
A concentração utilizada para a PLA<sub>2</sub> BbilTX-I foi de 5 $\mu$ g e para as crotopotinas 10 $\mu$ g.



**Figura 18** – Inibição da atividade inflamatória da toxina PLA<sub>2</sub> BbilTX-I pela ação do fator anti-hemorragico de soro de gamba DA2-II e da crotopotina F3, medido pela porcentagem de inflamação da pata do camundongo.

#### 4.10 Estudo do efeito citotóxico através dos níveis de LDH em cultura celular de mioblastos e miotubos (C2C12)

O efeito citotóxico ensaiado em cultura celular de mioblastos e miotubos (C<sub>2</sub>C<sub>12</sub>) da fração não apresentou um comportamento citotóxico, pois, à medida que as doses da PLA<sub>2</sub> BbilTX-I foram sendo acrescentadas, os níveis de LDH não aumentam significativamente, atingindo até 25.49 ± 2.3 % para mioblastos e 29.05 ± 3.45 % para miotubos, dados que se evidenciam na figura 19, sendo usado como controle positivo (0-100%) o Triton-X.



**Figura 19.** Representação gráfica da atividade citotóxica da PLA<sub>2</sub> BbilTX de *Bothriopsis bilineata* “*ex vivo*”, sob cultura celular de mioblastos e miotubos (C<sub>2</sub>C<sub>12</sub>). A lise celular foi estimada pela liberação da enzima lactato desidrogenase (LDH) do sobrenadante, após 3 horas de exposição da fração, em um volume de 150 µL/poço. Cada ponto representa a média ± SD do triplicado da cultura celular.

## 5. DISCUSSÃO

Fosfolipases A<sub>2</sub> miotóxicas provenientes de venenos botrópicos podem ser divididas em dois grandes grupos: aquelas com atividade enzimática, as PLA<sub>2</sub>s Asp49, e aquelas desprovidas de atividade catalítica, as PLA<sub>2</sub>s Lvs49 (Gutiérrez e Lomonte, 1995; Kini 2003 e Ponce-Soto et al., 2007).

Lomonte e colaboradores (1990), descrevem um procedimento de dois passos cromatográficos para isolamento e caracterização parcial de duas PLA<sub>2</sub>s Lvs49 a partir do veneno total de *Bothrops mooieni* referidas como MiTX-I e MiTX-II. Outros autores apresentam também dois passos cromatográficos no isolamento de miotoxinas provenientes de veneno botrópico como sendo um processo eficiente, como é o caso das isoformas de PLA<sub>2</sub> 6-1 e 6-2 de *Bothrops jararacussu* (Ponce-Soto et al., 2006).

No presente trabalho a purificação da nova PLA<sub>2</sub> Asp49, denominada BbilTX-I, a partir do veneno de *Bothriopsis bilineata* foi realizada em dois passos cromatográficos através de uma cromatografia convencional de exclusão molecular em Sephadex G-75 (Figura 3) e em uma segunda etapa utilizando um sistema de HPLC em coluna C18 de fase reversa mostrando a alta eficiência obtida no presente trabalho (Figura 4).

Nossos resultados utilizando cromatografia de alta eficiência (HPLC de fase reversa) mostraram que o veneno total de *Bothriopsis bilineata* pode ser decomposto em 5 frações, dentre as quais foi registrada uma nova PLA<sub>2</sub> com atividade catalítica denominada BbilTX-I. Para confirmação do grau de pureza da fração BbilTX-I usamos o mesmo sistema cromatográfico onde obtivemos um único pico agudo (Figura 4, figura inserida). A adequação metodológica utilizada neste trabalho permite apresentar a PLA<sub>2</sub> BbilTX-I não descrita na literatura para o veneno de *Bothriopsis bilineata*, sendo um veneno pouco conhecido até o presente.

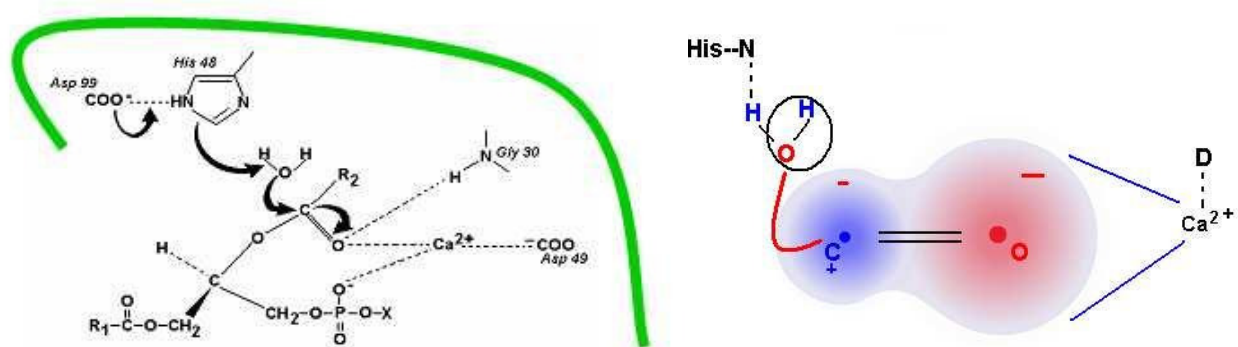
O perfil eletroforético de SDS-PAGE em gel de poliacrilamida (12.5%), da PLA<sub>2</sub> BbilTX-I (Figura 5A e B), revela que em condições não redutoras a PLA<sub>2</sub> BbilTX-I apresentou uma única banda proteica e quando reduzida com 1.4 ditioneitol (DTT) mostra também a presença de uma única banda de massa molecular de ~14 kDa. Esses resultados confirmam que a fração BbilTX-I apresenta uma só cadeia polipeptídica com massa molecular relativa ao redor de ~14 kDa, e esta de acordo com os dados encontrados para outras fosfolipases descritas na literatura (Gutiérrez e Lomonte, 1995; Arni e Ward, 1996 e Gutiérrez et al., 2008).

A atividade PLA<sub>2</sub> do veneno de *Bothriopsis bilineata* e da PLA<sub>2</sub> BbilTX-I foi analisada utilizando um substrato cromogênico denominado ácido 4-nitro-3-(octanovloxy) benzóico (Holzer e Mackessy, 1996). A atividade fosfolipásica (Figura 6) mostra ser maior para a BbilTX-I quando comparada com o veneno total, sendo a velocidade de reação  $24.75 \pm 2.68$  nmoles/min para a BbilTX-I e  $8.15 \pm 1.24$  nmoles/min para o veneno total. Esses valores são correspondentes de PLA<sub>2</sub> com atividade catalítica e evidencia a presença do aminoácido aspartato na posição 49 da cadeia polipeptídica podendo ser classificado como uma PLA<sub>2</sub> Asp49 como aquelas descritas para veneno botrópicos: BthTx-II – bothroptoxin II de *Bothrops jararacussu*. (Pereira, M.E. et al., 1998). PLA<sub>2</sub> PrTX-III c. de *Bothrops piraiyai* (Rigden et al., 2003) e as isoformas 6-1 e 6-2 de *Bothrops jararacussu*. A BbilTX-I é uma fosfolipase ainda não descrita para o gênero *Bothriopsis*.

A atividade PLA<sub>2</sub> da BbilTX-I é estudada usando diferentes concentrações do substrato cromogênico NOAB, a qual evidencia comportamento tipo sigmoidal discreto, principalmente em concentrações baixas do substrato (Figura 7, fig. inserida). Este comportamento cinético de reação é típico das enzimas alostéricas com múltiplos centros ativos e operando de modo cooperativo. Porém esse mecanismo não parece ser usado pela BbilTX-I, devido a que BbilTX-I é uma enzima monomérica com um único sítio ativo. Algumas proteínas como a glicocinase (enzima monomérica com um único sítio ativo) possuem uma cinética alostérica no início de sua ligação (baixa afinidade) com o substrato, e proporciona uma alteração da arquitetura molecular do sítio ativo preparando essa região para a molécula de substrato seguinte, expressando agora uma alta afinidade (Cornish-Bowden e Cardenas, 1987). A ligação com o substrato induz mudanças de conformação, de modo que ao final do ciclo catalítico a enzima mantém uma alta afinidade pela seguinte molécula de substrato sugerindo que essa cooperatividade positiva obedece a um mecanismo mnemônico (Kamata et al., 2004). A BbilTX-I apresentada nesse trabalho é uma enzima monomérica com tendência alostérica sugerindo provavelmente um mecanismo de cooperatividade positiva mnemônico.

Sabe-se que a ligação do Ca<sup>2+</sup> às PLA<sub>2</sub> induz mudanças sutis na configuração do sítio ativo necessárias para exercer a atividade enzimática (Chang et al., 1996). Scott et al (1990) descreve no sítio catalítico a presença do aminoácido Asp-49 que imobiliza o íon Ca<sup>2+</sup>, que interage com o fosfato e oxigênio do grupo carbonil da ligação éster na posição sn-2 do fosfolipídio (Figura 20). Essa interação faz com que o oxigênio que tem dupla ligação com o carbono sn-2, fique temporalmente mais negativo (altera a distribuição de cargas elétricas do

éster). fragilizando a dupla ligação (comportando-se como uma ligação simples) induzindo que o carbono da ligação sn-2 fique mais positivo. Essa ligação fica exposta à reação catalítica que consiste no ataque nucleofílico do oxigênio (que tem carga residual negativa), pertencente a uma molécula de água (imobilizada pelo anel imidazólico da His 48 presente no sítio catalítico). Portanto o íon  $\text{Ca}^{2+}$  direciona o posicionamento do substrato no sítio ativo da enzima sugerindo que esse arranjo do sítio catalítico apresenta uma conformação exclusiva para o  $\text{Ca}^{2+}$ , o que explicaria a diminuição da atividade  $\text{PLA}_2$  da BbilTX-I na presença dos outros cátions (Figura 10).



**Figura 20.** Mecanismo catalítico de uma  $\text{PLA}_2$  mostrando a importância do  $\text{Ca}^{2+}$  para que ocorra a hidrólise do fosfolípido de membrana (Janssen, W.J.M., *et al* 1999).

Os íons  $\text{Mg}^{2+}$  e  $\text{Sr}^{2+}$  induzem configurações não apropriadas na enzima resultando na diminuição a atividade  $\text{PLA}_2$  da  $\beta$ -bungarotoxina (Chu *et al.*, 2005). Inibição da  $\text{PLA}_2$  da serpente chinesa *Naja naja naja* pelos cátions  $\text{Ba}^{2+}$  e  $\text{Cd}^{2+}$  mostram características cinéticas de inibidores competitivos convencionais que deslocariam o  $\text{Ca}^{2+}$  do sítio ativo (Mezna *et al.*, 1994). O  $\text{Zn}^{2+}$  é conhecido como um forte inibidor de enzimas  $\text{PLA}_2$ , mas a sua atividade inibitória baseia-se no modelo em que a enzima é ativada por dois íons  $\text{Ca}^{2+}$ , um é essencial e pode ser deslocado por  $\text{Ba}^{2+}$ , o outro modula a atividade e pode ser deslocado por  $\text{Zn}^{2+}$  (Mezna *et al.*, 1994).

A fração BbilTX-I mostra ser cálcio-dependente (Figura 10), uma vez que o íon cálcio é um importante cofator para que ocorra a catálise (Kini, 1997; Tu, 1977;1982;1991; Breithaupt, 1976; Holzer e Mackessv 1996). Também são descritas  $\text{PLA}_2$ s que são ativadas cataliticamente por ação de outros íons divalentes como descrito por (Breithaupt, 1976; Tu, *et al.*, 1970).

Em nossos experimentos observamos que além do  $\text{Ca}^{2+}$  ( $\text{CaCl}_2$  1mM) a  $\text{PLA}_2$  BbilTX-I é ativada na presença de outros íons divalentes, tais como  $\text{Mn}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$  (10mM) (como cofator) mais somente com a presença de  $\text{CaCl}_2$  (Fig. 10) e menos ativa frente a  $\text{Zn}^{2+}$  e  $\text{Cd}^{2+}$  (10mM). Com a ausência de  $\text{CaCl}_2$  a  $\text{PLA}_2$  BbilTX-I evidenciou uma baixa atividade mostrando ser cálcio-dependente. Ao mostrar atividade frente a outros íons divalentes como  $\text{Mg}^{2+}$  e  $\text{Mn}^{2+}$  parece ser que o arranjo do sítio catalítico apresenta uma estrutura exclusiva para o íon Cálcio.

A  $\text{PLA}_2$  BbilTX-I mesmo sendo cálcio-dependente, o estudo do efeito de cátion mostrou que o sítio catalítico pode ser modificado estruturalmente tornando a enzima ativa na presença de outros íons como  $\text{Mg}^{2+}$  e  $\text{Mn}^{2+}$  ou gerando um desarranjo molecular com perda da atividade catalítica frente a  $\text{Zn}^{2+}$  e  $\text{Cd}^{2+}$  (Fig.10). Enfim, podemos concluir que o  $\text{Ca}^{2+}$  possui uma arquitetura atômica mais adequada ao sítio catalítico da  $\text{PLA}_2$  BbilTX-I.

Tem sido registrado que a  $\text{PLA}_2$  de veneno *Naia naia naia* é altamente estável a temperaturas extremas tal como  $100^\circ\text{C}$  (Deems e Dennis, 1975a) assim como a  $\text{PLA}_2$  de Cdt que mostra uma alta atividade catalítica em temperaturas em torno de  $53\text{-}57^\circ\text{C}$  (Breithaupt, 1976). Em nossos experimentos encontramos que a BbilTX-I mostrou uma temperatura ótima para sua atividade catalítica na faixa de  $25\text{-}40^\circ\text{C}$  (Figura 9), demonstrando uma alta estabilidade na atividade catalítica, havendo uma atividade considerável em temperaturas de até  $57^\circ\text{C}$ .

Outros parâmetros cinéticos conhecidos para  $\text{PLA}_2$  (Asp49) como pH, mostraram ser comuns a outras  $\text{PLA}_2$  descritas, cujos valores ótimos se encontram entre 7 a 8.5 (Kini, 1997; Breithaupt, 1976; Beghini, et al., 2000). Nossos resultados mostraram que a  $\text{PLA}_2$  BbilTX-I tem um pH ótimo na faixa de 8 a 9. Em valores de pH acima de 9 ou abaixo de 8 a enzima  $\text{PLA}_2$  BbilTX-I demonstrou ser relativamente instável (Figura 8).

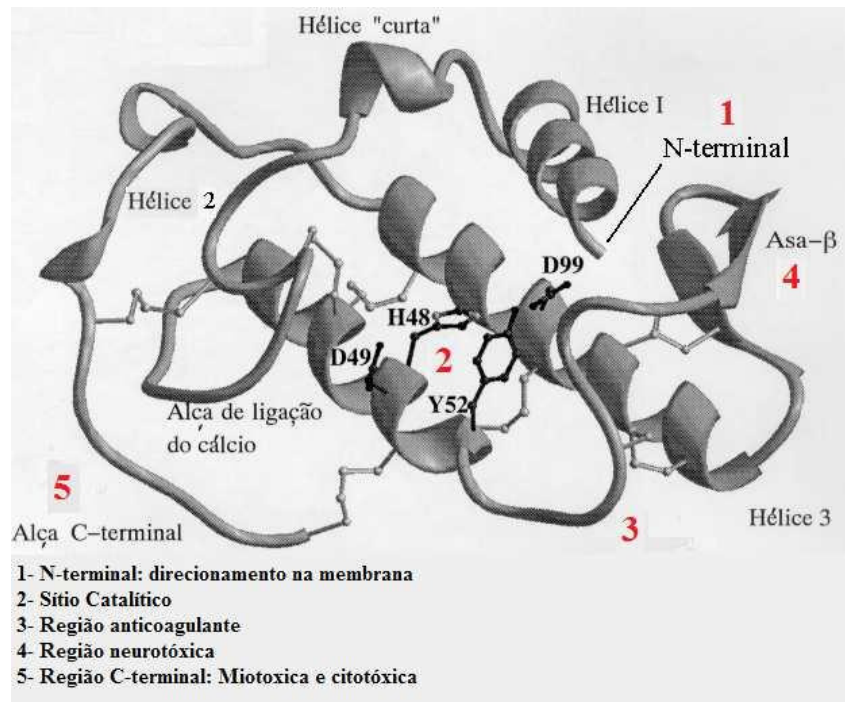
Os estudos obtidos por espectrometria de massas (Maldi-Tof) mostram que a  $\text{PLA}_2$  BbilTX-I apresenta um alto grau de pureza e homogeneidade molecular (Figura 13), sendo sua massa molecular de 14185.48 Da diferente da BmTX-I (14.231.71 kDa) de *Bothriopsis mooeieni* (Calgaroto et al., 2008), resultados que possibilitam mostrar a presença de uma nova fração que apresenta atividade  $\text{PLA}_2$  no veneno de *Bothriopsis bilineata*.

Em nossos resultados, a análise da composição de aminoácidos da BbilTX-I (Tabela 1) apresenta um importante nível de homologia com outras  $\text{PLA}_2$ s procedentes do veneno botrópico. Assim a análise da composição de aminoácidos mostra a presença de uma grande quantidade de aminoácidos tanto de caráter básico quanto hidrofóbico: a presença de 14 Cys é

indicativa de possuir sete pontes dissulfeto as quais estabilizam a estrutura terciária da proteína, e sua cadeia polipeptídica é constituída de 121 resíduos de aminoácidos. Estas características na composição de aminoácidos corroboram com a estabilidade da atividade catalítica em âmbito maior de variação de temperatura. A presença de resíduos carregados positivamente tais como Lisina, Histidina e Arginina tanto nas PLA<sub>2</sub>s Asp49 quanto nas Lvs49 estão relacionados com possíveis efeitos farmacológicos (Gutierrez e Lomonte, 1995).

O estudo da homologia seqüencial da região N-terminal (Figura 12) mostra que a BbilTX-I possui homologia seqüencial com outras PLA<sub>2</sub>s de origem botrópico, tais como as isoformas 6-1 e 6-2 de *Bothrops jararacussu*, (Ponce-Soto et al., 2006) e a PLA<sub>2</sub> BmTX-I, de *Bothrops mooieni* (Calgaroto et al., 2008). Estudos de homologia seqüencial têm mostrado que existem determinadas posições extremamente conservadas nas PLA<sub>2</sub>s. Na posição 1 e 2 predomina a seqüência de aminoácidos (SL), na posição 4 (O), na posição 7 a 10 (KMIL), na posição 12 e 13 (ET), na posição 21 (Y) e na posição 25-26 (GC). Nas PLA<sub>2</sub>s Asp49 existem vários resíduos conservados que também possuem um papel crucial na expressão da atividade PLA<sub>2</sub>. Assim temos que as seqüências de aminoácidos W/YCG-G (27, 28, 29 e 30) são essenciais para a formação da alca de ligação do cálcio (Arni e Ward, 1996).

De acordo com o estudo de homologia seqüencial realizado com a BbilTX-I, existem algumas mutações importantes, por exemplo, a substituição de (S) por (D) na posição 1; (E) por (K) na posição 4 e (S) por (P) na posição 19. Apesar destas mudanças, não houve diminuição da atividade catalítica nem edematogênica. Tais mudanças provavelmente podem estar relacionadas com alguns outros efeitos biológicos que não foram tratados no presente trabalho. De outro lado mesmo tendo sido substituído a P(19) por S(19), responsável pela ligação interfacial com o substrato (Scott *et al.*, 1990) a atividade PLA<sub>2</sub> não parece estar diminuída, o qual mostra uma nova e importante contribuição nesta nova PLA<sub>2</sub> na cinética da reação, procedente de um veneno completamente desconhecido (Figura 21).



**Figura 21.** Estrutura tridimensional de uma PLA<sub>2</sub> relacionando regiões moleculares de sua cadeia polipeptídica com a expressão funcional das diferentes atividades biológicas (Arni.e Wars. 1996)

Neurotoxinas de veneno de serpentes que causam paralisia neuromuscular atuam tanto pré-iuncionalmente por bloquearem a liberação de acetilcolina (ACh) ou pós-iuncionalmente por bloquearem os receptores nicotínicos. Estes diferentes mecanismos de ação não podem ser facilmente diferenciados usando preparação nervo frênico-diafragma de camundongo (PNDp), mas eles podem ser diferenciados usando preparação biventer cervicis de pintainho (BCp) (Rodriguez-Acosta. 2001).

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

No entanto, como regra, os venenos bem como suas toxinas, atuam periféricamente na junção neuromuscular. Assim, estudos têm mostrado que espécies botrópicas possuem efeito neurotóxico *in vitro*, como o reportado por Costa et al (1999) que evidenciou que o veneno de *Bothrops pirai* possui um efeito miotóxico e neurotóxico "*in vitro*", capaz de bloquear a resposta contrátil na preparação extensor digitorum longus (EDL) de rato.



Cogo et al (1993), mostraram que o veneno de *Bothrops insularis* também possui um efeito neurotóxico in vitro na preparação músculo biventer cervicis de pintainho em concentrações que não afetam as respostas contraturantes a ACh e ao KCl e nem mesmo interfere sobre a liberação de CK.

Posteriormente, Araújo *et al* (2003) também observaram que tanto o veneno como uma fração caseinolítica de *Bothrops lanceolatus* possui um efeito neurotóxico in vitro sobre a preparação músculo biventer cervicis de pintainho, assim como os estudos eletrofisiológicos mostraram que o veneno total é capaz de aumentar ligeiramente a amplitude e frequência dos potenciais de placa em miniatura (PPM).

Em nossos resultados reportamos a atividade neurotóxica in vitro da PLA<sub>2</sub> BilTX-I de *Bothriopsis bilineata* (Figura 15) usando como modelo a preparação biventer cervicis de pintainho (BCD). A caracterização neurotóxica in vitro feita a partir do veneno total de *Bothrops mooieni*, e da fração BmTX-I no modelo biventer cervicis de pintainho mostrou que o veneno de *Bothrops mooieni* é menos ativo que os venenos crotálicos, já que estes últimos levam a um bloqueio da transmissão neuromuscular muito mais rapidamente e usando-se baixas concentrações; no entanto, não se pode negar que o veneno botrópico exibe também uma ação neurotóxica “in vitro”.

A resposta ao potássio é indicativo de preservação da membrana de células musculares. (Beghini *et al* 2000) os resultados mostram que o completo bloqueio com 10, 20, 30 e 50 µg/ml da PLA<sub>2</sub> BbilTX-I (Figura 14) não foi acompanhado pela inibição das respostas ao potássio (KCl), dados que mostram que é uma fração com efeito neurotóxico e não miotóxico.

A resposta a ACh é um indicativo da preservação dos receptores colinérgicos pós-sinápticos. Neurotoxinas ativas pré-sinápticamente são capazes de abolir a resposta contrátil sem afetar a resposta aos agonistas (ACh) colinérgicos (Lewis e Gutmann, 2004). Como a resposta a ACh se manteve antes e pós experimento, pode-se afirmar que a BbilTX-I é uma neurotoxina de ação pré-sináptica.

Estes dados sugerem que a fração BbilTX-I do veneno de *Bothriopsis bilineata* não teve efeito inibitório nos receptores pós-sinápticos colinérgicos e nem causou dano muscular que impedisse a contração em resposta ao KCl, portanto a BbilTX-I comporta-se como uma neurotoxina pré-sináptica não miotóxica.

Inflamação é uma reação de injúria tecidual, a qual é uma importante característica do envenenamento por serpentes das famílias Viperidae e Crotalidae (Rosenfeld, 1971). É uma resposta protetora a qual possui um conjunto de estágios para recuperação e reconstituição da

função normal do tecido lesado. A reação inflamatória é mediada endogenamente por substâncias ativas, chamadas de mediadores químicos da inflamação. Entre eles estão eicosanóides, citocinas, quimiocinas, histamina e serotonina.

Os venenos botrópicos, além de alterações sistêmicas, algumas vezes letais, induzem intensos efeitos inflamatórios locais, entre eles hemorragia e edema (Gutiérrez e Lomonte, 1986). Tais efeitos foram observados quando inoculado a PLA<sub>2</sub> BbilTX-I na região subplantar em patas de camundongos. O edema de pata induzido em camundongos ocorreu de forma dose e tempo-dependentes. Na dose da PLA<sub>2</sub> BbilTX-I (0.1; 1.0 e 5.0µg) testadas, o edema atingiu índices máximos 0.5 horas após a injeção e estatisticamente insignificantes após 24 horas (Figura 17). Tais fenômenos foram também observados com os venenos de *Bothrops insularis* (Barbosa *et al.*, 2003) e *Bothrops jararacussu* (Ketelhut *et al.*, 2003).

Estudos utilizando diferentes venenos ofídicos demonstram que o início do edema e o tempo necessário para que estes alcancem índices máximos variam consideravelmente (Selistre *et al.*, 1996). Este fato poderia ser explicado por variações na composição e origem dos venenos, bem como por diferenças nas espécies de animais empregadas. Araújo *et al* (2000) descreveu que o veneno de *Bothrops lanceolatus* quando inoculado na região subplantar de camundongos produz respostas edematogênicas máximas somente 2 horas após a injeção, desaparecendo após 24 horas.

Segundo Gutiérrez e Lomonte (2003) PLA<sub>2</sub> presentes em venenos ofídicos exerce grande variedade de efeitos farmacológicos, entre eles, uma importante atividade edematogênica.

Estas substâncias podem induzir edema por dois mecanismos distintos: a) através da liberação do ácido araquidônico em consequência da degradação enzimática da membrana fosfolipídica, aumentando a biossíntese de eicosanóides e b) diretamente, afetando a microvasculatura, levando a exsudação do plasma.

As PLA<sub>2</sub> purificadas a partir de veneno de serpentes podem ser largamente utilizadas como modelos biológicos para compreensão de mecanismos de injúria tecidual além de toda a cascata inflamatória e imunológica.

Esses resultados mostram a presença de uma nova PLA<sub>2</sub> com atividade catalítica ainda não descrita na literatura para este veneno completamente desconhecido, indicativo da presença do aminoácido aspartato na posição 49 da cadeia polipeptídica, com importante participação na estrutura tridimensional responsável pela atividade de hidrólise dos

fosfolipídios, contribuindo para a compreensão e importância das características estruturais em tornar uma proteína biologicamente funcional.

A crotoxina é um complexo dimérico formado por uma PLA<sub>2</sub> básica de aproximadamente 14 kDa e uma proteína de natureza ácida denominada de crotopotina com uma massa aproximada de 9 kDa e esta presente no veneno da maioria da espécie do gênero *Crotalus durissus* (Boldrini-Franca J et al., 2010).

As isoformas de crotopotina do veneno de *Crotalus durissus cascavella* (F2 e F3) inibiram significativamente a atividade catalítica da PLA<sub>2</sub> BbilTX-I em mais de 50% (Figura 11). Nossos resultados estão em concordância com os resultados encontrados por Landucci et al. (2000), os quais observaram que crotopotinas poderiam inibir PLA<sub>2</sub>s pancreáticas de abelhas e de outros venenos de serpentes e Bonfim *et al* (2001) que reportaram que crotopotinas dos venenos de *C. durissus terrificus* (F7), *C. d. collilineatus* (F3 e F4) e de *C. durissus cascavella* (F3 e F4) diminuíram a atividade catalítica da PLA<sub>2</sub> BiIV purificada do veneno de *B. jararacussu*.

Em nossos estudos a crotopotina F3 de *Crotalus durissus cascavella* inibiram farmacologicamente a atividade edematizante da PLA<sub>2</sub> BbilTX-I em 64% evidenciando que esta atividade biológica da fração é mais dependente da atividade catalítica desta PLA<sub>2</sub> e por tanto necessita que a estrutura do sítio catalítico esteja inalterada (Figura 18).

Nossos estudos demonstram uma forte inibição da atividade catalítica da PLA<sub>2</sub> BbilTX-I pelo fator anti-hemorrágico DA2-II isolado de *Didelphis albiventris*, e uma forte inibição na atividade inflamatória, medida por edema de pata o que confirma com os resultados obtidos pela inibição da crotopotina F3, a atividade edematizante mostrando-se dependente da atividade catalítica.

No presente trabalho, um perfil de atividades tóxicas foi estudado para a PLA<sub>2</sub> BbTX-I, isolada a partir do veneno total de *Bothriopsis bilineata* e caracterizada físico-quimicamente. O estudo da miotoxicidade “ex vivo”, proposto por Lomonte et al. (1999), de PLA<sub>2</sub> miotóxicas em mioblastos (C<sub>2</sub>C<sub>12</sub>), estabelece uma correlação perfeita com os nossos experimentos na capacidade da PLA<sub>2</sub> BbilTX-I de produzir uma lise de mioblastos em cultura celular (C<sub>2</sub>C<sub>12</sub>) moderada, mostrando assim que o efeito citotóxico ao elevar os níveis de LDH no meio não mostra uma especificidade pontual, sugerindo que a atividade catalítica poderia ser crucial no desenvolvimento dos efeitos farmacológicos (figura 19).

O presente trabalho contribui para o melhor entendimento da atividade das PLA<sub>2</sub> de venenos de serpente, a nova PLA<sub>2</sub> nomeada BbilTX-I purificada do veneno de *Bothriopsis*

*bilineata* possui a maior atividade neurotóxica já descrita para PLA<sub>2</sub> de venenos botrópicos. Ainda que a análise das propriedades bioquímicas e farmacológicas da PLA<sub>2</sub> mostre semelhanças com outros membros desta família de proteínas já descritos o seu efeito neurotóxico aponta uma importante modificação na arquitetura desta proteína. A continuação deste trabalho será a determinação de estrutura primária e terciária, o que fornecerá informações sobre as particularidades da arquitetura das PLA<sub>2</sub>, responsáveis pelo efeito neurotóxico observado.

## 6. CONCLUSÕES

6.1 Utilizando metodologias otimizadas de purificação em HPLC de fase reversa, purificamos uma nova toxina com atividade PLA<sub>2</sub> a partir do veneno total de *Bothriopsis bilineata* denominada BbilTX-I com alto grau de pureza, homogeneidade molecular e sem perda das atividades biológicas.

6.2 A fração BbilTX-I é identificada como uma PLA<sub>2</sub>D49, devido às características físico-químicas, alta atividade enzimática ( $24.75 \pm 2.68$  nmoles/min), caráter básico, massa de 14185.48 Da, e alta similaridade na sua sequência N-terminal com outras PLA<sub>2</sub> de veneno de serpentes botrópicas.

6.3 A PLA<sub>2</sub> BbilTX-I apresentou uma temperatura ótima de 25-40C°. sendo uma proteína termo-estável pois se mantém ativa a 66C°. O pH ótimo encontrado foi em torno de 8, e a fração BbilTX-I é cálcio dependente. Em diferentes concentrações do substrato 3-nitro 4-(octanoiloxi) ácido benzóico ela apresentou um comportamento alostérico (em baixas concentrações) e um comportamento hiperbólico em maiores concentrações, sugerindo-se um comportamento do tipo mnemônico. A atividade fosfolipásica da toxina BbilTX-I foi inibida em mais de 50% na presença da crotapotina F3 isolada de *Crotalus durissus cascavella* e do fator anti-hemorrágico DA2-II.

6.4 A toxina purificada neste trabalho apresentou um bloqueio acima de 50% aos 20 minutos (10µg) na junção neuro-muscular das preparações de biventer cervices de pintainho e não ocasionou grandes danos na membrana muscular e na resposta à acetilcolina, sendo então uma neurotoxina não miotóxica e pré-sináptica.

6.5 A Crotapotina F3 isolada de *Crotalus durissus cascavella* e o fator anti-hemorrágico DA2-II inibiram a atividade inflamatória causada pela PLA<sub>2</sub> BbilTX-I.

6.6 A PLA<sub>2</sub> BbilTX-I apresentou uma atividade miotóxica moderada e não específica no teste realizado com miotubulos e mioblastos em células (C<sub>2</sub>C<sub>12</sub>), sugerindo que suas atividades farmacológicas sejam dependentes de sua atividade catalítica.

## 7. BIBLIOGRAFIA

- Abe. T., Alema. S., Miledi. R., 1977. Isolation and characterization of presynaptically acting neurotoxins from the venom of *Bungarus snakes*. Eur. J. Biochem 80. 1–12.
- Altschul. S.F., Gish. W., Miller. W., Myers. E.W., Lipman. D.J., 1990. Basic local alignment search tool. J Mol Biol 215. 403–10.
- Araujo. A.L., de Souza. A.O., da Cruz Hoffling. M.A., Flores. C.A., Bon. C., 2000 *Bothrops lanceolatus* (Fer de lance) venom induces oedema formation and increases vascular permeability in the mouse hind paw. Toxicon 38. 209-221.
- Arni.R.K., Ward. R.J., 1996. Phospholipase A2 – A Structural Review. Toxicon 34. 327-841.
- Azevedo-Marques. M.M., Curo. P., Coimbra. T.M., Hering. S.E., Rossi. M.A., Laure. C.J., 1985. Myonecrosis, myoglobinuria and acute renal failure induced by South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*) envenomation in Brazil. Toxicon. 23. 631-6.
- Barbosa. A.M., do Amaral RO. Teixeira. C.F., Hislop. S., Cogo. J.C., 2003. Pharmacological characterization of mouse hind paw oedema induced by *Bothrops insularis* (iararaca ilhoa) snake venom. Toxicon 42. 515-23.
- Beghini. D.G., Toyama. M.H., Hislop. S., Sodek. L.C., Novello. J.C., and Marangoni. S., 2000. Enzymatic characterization of a novel phospholipase A2 from *Crotalus durissus cascavella* rattlesnake (maracamboia) venom. J. Protein Chem 19. 679-84.
- Boldrini-Franca. J., Corrêa-Netto. C., Marliete M.S., Silva. Renata S.R., Pilar De La Torre. Alicia Pérez. Andreimar. M.S., Russolina. B.Z., Romildo. A.N., Veridiana M.R., Líbia Sanz. Juan J.C., 2010. Snake venomomics and antivenomics of *Crotalus durissus* subspecies from Brazil: Assessment of geographic variation and its implication on snakebite management. Journal of Proteomics 73. 1758-1776.
- Bon. C., 1997. Multicomponent Neurotoxic Phospholipases A2. In: Venom Phospholipase A2 Enzymes. Structure, Function and Metabolism. Kini. M.R. (ed), cap 11, pp 269 - 285. John Wiley & Sons - Chichester. New York. Weinheim. Brisbane. Singapore. Toronto.
- Bonfim. V.L., Toyama. M.H., Novello. J.C., Hislop. S., Oliveira. C.R.B., Rodrigues-Simioni. L., Marangoni. S., 2001. Isolation and enzymatic characterization of a basic phospholipase A2 from *Bothrops jararacussu* snake venom. J. Protein Chem 20. 239-245.
- Breithaupt. H., 1976 Enzymatic characteristics of crotalus phospholipase A2 and the crotoxin complex. Toxicon 14. 221-233
- Chang. L.S., Lin. S.R., Chang. C.C., 1996 The essentiality of calcium ion in the enzymatic activity of *Taiwan cobra* phospholipase A2. J Protein Chem. 15. 701-7.
- Chang. C.C., Lee. J.D., 1977. Crotoxin. The Neurotoxin of South American Rattlesnake Venom. is a Presynaptic Toxin Acting Like  $\beta$ -Bungarotoxin. Naunyn-Schmiedeberg. Arch. Pharmacol 296. 159-168.

- Chang, C.C., Tseng, K.H., 1978. Effect of crotamine, a toxin of South American rattlesnake venom, on the sodium channel of murine skeletal muscle. *Br. J. Pharmacol.* 63, 551-559.
- Cho, W., Kézdy, F.J., 1991. Chromogenic substrates and assay of phospholipases A<sub>2</sub>. *Methods enzymol* 197, 75-79.
- Chu Y.P., Cheng Y.C., Yang C.C., Chang L.S., 2005. The structural events associated with the binding of divalent cations to beta-bungarotoxin. *Toxicon*, 45, 139-45.
- Cintra, A.C.O., Marangoni, S., Oliveira, B., Giglio, J.R., 1993. Bothropstoxin-I: amino acid sequence and function. *Jurnal of Protein Chemistry* 12, 57-64
- Cogo J.C., Prado-Franceschi J., Cruz-Hofling, M.A., Corrado, A.P., Rodrigues-Simioni, L., 1993. Effect of *Bothrops insularis* venom on the mouse and chick nerve-muscle preparation. *Toxicon* 31, 1237-47.
- Cornish-Bowden, A., Cardenas, M.L., 1987. Co-operativity in monomeric enzymes. *J.Theor. Biol* 124, 1-23.
- Costa, P.D., Tovama, M.H., Marangoni, S., Rodrigues-Simioni, L., da Cruz-Hofling, M.A., 1999. Effects of *Bothrops pirajai* venom on the mouse extensor digitorum longus (EDL) muscle preparation. *Toxicon* 37, 1143-53.
- Davidson, F.F., Dennis, E.A., 1990. Evolutionary relationships and implications for the regulation of phospholipase A2 from snake venom to human secreted forms. *J Mol Evol* 31, 228-38.
- Deems, A.S., Dennis, E.A., 2000. The expanding superfamily of phospholipase A2 enzymes: classification and characterization *biochim. Biophys Acta* 1488, 1-19.
- Denis E.A., 1994 Diversity of group types, regulation, and function of phospholipase A2. *J. Biol. Chem* 269, 13057-1306.
- Dennis, E. A. (2000). "Phospholipase A2 in Eicosanoid Generation". *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. Vol. 161: pagS33-S35.
- Denson, K.W.E., Russel, F.S., Almago, D., Bishop, R.C., 1972. Characterization of coagulant activity of some snake venoms. *Toxicon* 10, 557- 562.
- Faure, G., Bon, C., 1988. Crotoxin, A Phospholipase A2 neurotoxin from the south america rattlesnake *Crotalus durissus terrificus*. Purification of several isoforms and a Comparison of their molecular structure and of their biological activities. *Biochemistry* 27, 730-738.
- Faure, G., Guillaume, J.L., Camoin, L., Saliou, B., Bon, C., 1991. Multiplicity of acidic subunit isoforms of crotoxin, the phospholipase A2 neurotoxin from *Crotalus durissus terrificus* venom, results from posttranslational modifications. *Biochemistry* 30, 8074-8083

- Ferreira. M.L., Henriques. O.B., Lebrum. I., Batista. M.B.C., Drezuto. B.C., Andreoni. A.S.S., Zelnik. R., Habermehl. B., 1992 A new bradykinin potentiating (peptide P). Isolated from the venom of *Bothrops jararacusu* (Jararacucu Tapete, Urutu Dourado). *Toxicon* 30. 33-40.
- Gutiérrez. J.M., Lomonte. B., 1995 Phospholipase A2 mvotoxins from *Bothrops* snake venoms. *Toxicon* 33. 1405-1424.
- Gutiérrez. J.M., Ponce-Soto. L.A., Marangoni. S., Lomonte. B., 2008 Systemic and local mvotoxicity induced by snake venom group II Phospholipases A2: Comparison between crotoxin, crotoxin B and a Lys49 PLA2 homologue. *Toxicon* 51. 80-92.
- Gutiérrez. J.M., Ownby. C.I., 2003. Skeletal muscle degeneration induced by venom phospholipases A2: insights into the mechanism of local and systematic mvotoxicity. *Toxicon*. 42. 915-31.
- Gutierrez. J.M., Lomonte. B., 1989. Local tissue damage induced by Bothrops snake venoms. A review. *Mem Inst Butatan* 51. 211-223.
- Gutierrez. J.M., Lomonte. B., 2003. Cap. 32 Efectos Locales en el Envenenamiento Ofídico en America Latina – Animais peçonhentos no Brasil: Biologia, Clínica e Terapêutica dos Acidentes Ed. Sarvier. São Paulo pag. 310-323.
- Gutierrez. J.M., Lomonte. B., 1997. Phospholipase A2 mvotoxins from *Bothrops* snake venoms. In: Kini. R.M.(Ed.), venom phospholipase A2 enzymes: Structure, Function and mechanism. Wiley, Chichester, England. pp. 321-352.
- Harvey. A.L., Bradley. K.N., Cochran. S.A., Rowan. E.G., Pratt. J.A., Ouillfeldt. J.A., Jerusalinsky. D.A., 1998. What can toxins tell us for drug discovery? *Toxicon* 36. 1635-1640.
- Heinrikson. R.L., Meredith. S.C., 1984. Amino acid analysis by reverse phase high-performance liquid chromatography: precolumn derivatization with phenylthiocyanate. *Analytical Biochemistry* 13. 65-72.
- Hodgson Wayne. C., Wickramaratna Janith 2002. In vitro neuromuscular activity of snake venoms *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*. 29. 807-814.
- Hoge. A.R., Romano-Hoge. S.A.R.W.L., 1978/1979. Sinopse das serpentes peçonhentas do Brasil. *Mem. Inst. Butantan* 42/43. 373-496
- Holzer. M., Mackessy. S.P., 1996. Na aqueous endpoint assay of snake venom phospholipases A2. *Toxicon* 34. 1149-1155.
- Igor Krizai., Franc Gubensek., 2000. Neuronal receptors for phospholipases A2 and  $\beta$ -neurotoxicity. *Biochimie* 82. 807-814.



- Janssen, J.W.M., Wendy A.E.C., Van de Wiel, Sigrid H.W., Beiboer, Muriel, D. Van Kampen., Huberts M.V., Arend J.S., Maarten R.E., 1999. Catalytic role of the active site histidine of porcine pancreatic phospholipase A<sub>2</sub> probed by the variants H48O, H48N and H48K. *Protein Engineering* 12, 497-503.
- Calgarotto, A.K., Damico, D.C., Ponce-Soto, L.A., Baldasso, P.A., Da Silva, S.L., Souza, G.H., Eberlin, M.N., Marangoni, S., 2008. Biological and biochemical characterization of new basic phospholipase A2 BmTX-I isolated from *Bothrops mooieni* snake venom. *Toxicon* 51, 1509-19.
- Kamaguti, A.S., Zuzel, M., Theakston, R.D., 1998. Snake venom metalloproteinases and disintegrins: interactions with cells. *Braz J. Med Biol Res* 31, 853-62.
- Kamata, K., Nishimura, M., Eiki, J., Nagata, Y., 2004. Structural Basis for allosteric regulation of the monomeric allosteric enzyme human glucokinase. *Structure* 12, 429-438.
- Karlsson, E., 1979. Chemistry of protein toxic in snake venom. In Lee, C.Y. (Ed): *Handbook of Experimental Pharmacology* 159-212. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Kelly, R.B., von Wedel, R.J., Strong, P.N., 1979. Phospholipase-dependent and phospholipase-independent inhibition of transmitter release by b-bungarotoxin. *Adv. Cytoparmacol* 3, 77-85.
- Ketelhut, D.F., de Mello, M.H., Veronese, E.L., Esmeraldino, L.E., Murakami, M.T., Arni, R.K., Giglio, J.R., Cintra, A.C., Sampaio, S.V., 2003. Isolation, characterization and biological activity of acidic phospholipase A2 isoforms from *Bothrops ijaracussu* snake venom. *Biochimie* 85, 983-91.
- Kini, R.M., Iwanaga, S., 1986. Structure function relationship of phospholipase II charge density distribution and the myotoxicity of presynaptically neurotoxic phospholipase. *Toxicon*.
- Kini, R.M., 1997a. Phospholipase A2 a complex multifunctional protein puzzle. In: Kini, R.M., (Ed.), *enzymes: Structure, function and mechanism*. Wiley, Chichester, England, pp. 1-28.
- Kini, R.M., Evans, H.J., 1989. A model to explain the pharmacological effects of snake venom phospholipases A2. *Toxicon* 27, 613-635.
- Kini, R.M., Evans, H.J., 1989a. A model to explain the pharmacological effects of snake venom phospholipases A2. *Toxicon* 27, 613-635.
- Kini, R.M., Evans, H.J., 1989b. A common cytolytic region in myotoxins, hemolysins, cardiotoxins and antibacterial peptides. *Int.J.Peptide Protein Res* 34, 227-286.

- Kini, R.M., Evans, H.J., 1989c. Role of cationic amino acid residues in cytolytic activity. Modifications of lysine residues in the cardiotoxin from *Naja nigricollis* venom and correlation between cytolytic and antiplatelet activities. *Biochemistry* 28, 9209-9215.
- Kini, R.M., 2003. Excitement ahead: structure, function and mechanisms of snake venom phospholipases A2 enzymes. *Toxicon* 42, 827-840.
- Kondo, K., Zhang, J., Xu, K., Kagamiyama, H., 1989. Amino acid sequence of a presynaptic neurotoxin,  $\alpha$ -kistrodotoxin, from the venom of *Aekistrodon halys pallas*. *J. Biochem* 105, 196-203.
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Landucci, E.C.T., Tovama, M.H., Marangoni, S., Benedito, O., Giuseppe, C., Antunes, E., de Nucci, G., 2000. Effect of crotoxin and heparin on the rat paw oedema induced by different secretory phospholipases A2. *Toxicon* 38, 199-208.
- Lewis, R.L., Gutmann, L., 2004. Snake venoms and the neuromuscular junction. *Sem. Neurol* 24, 175-179.
- Lomonte, B., Gutierrez, J.M., Furtado, M.F., Otero, R., Rosso J.P., Vargas, O., Carmona, E., Rovira, M.E., 1990. Isolation of basic mvotoxins from *Bothrops mooieni* and *Bothrops atrox* snake venoms. *Toxicon* 28, 1137-46
- Lomonte, B., Angulo, Y., Calderón, L., 2003. An overview of lysine-49 phospholipase A2 mvotoxins from crotalid snake venoms and their structural determinants of mvotoxic action. *Toxicon* 42, 885-901.
- Marangoni, S., Tovama, M.H., Arantes, E.C., Giglio, J.R., da Silva, C.A., Carneiro, E.M., Goncalves, A.A., Oliveira, B., 1995. Amino acid sequence of TsTX-V, an alpha-toxin from *Titivus serrulatus scorpion* venom, and its effect on K<sup>+</sup> permeability of beta-cells from isolated rat islets of Langerhans. *Biochim Biophys Acta*, 13, 309-14.
- Matsui, T., Fujimura, Y., Titani, K., 2000. Snake venom proteases affecting hemostasis and thrombosis. *Biochim Biophys Acta*, 1477, 146-56.
- McDiarmid, R.W., Campbell, J.A., Touré, T., 1999. *Snake Species of the World: A Taxonomic and Geographic Reference*, 1, 511.
- Mebis, D., Owby, C.L., 1980. Mvotoxic components of snake venoms: Their biochemical and biological activities. *Pharm. Ther* 48, 223 – 236
- Mezna, M., Ahmad, T., Chettibi, S., Drinas, D., Lawrence, A.J., 1994. Zinc and barium inhibit the phospholipase A2 from *Naja naja atra* by different mechanisms. *Biochem J*, 301, 503-8.
- Ministério da Saúde 2008. *Coordenação de controle de Zoonoses e Animais Peconhentos- Análise Epidemiológica Brasília D.F.*

- Montecucco, C., Rossetto, O., 2000. How do presynaptic PLA2 neurotoxins block nerve terminals. *Trends Biochem Sci* 25, 266-70.
- Monterrey, F., 2001. Trabalho de Grado. Facultad de Ciencias. UCV, Caracas, Venezuela.
- Narahashi, T., Hass, H.G., e Therrien, E.F., 1967. Saxitoxin and tetrodotoxin: comparison of nerve blocking mechanism. *Science* 22, 1441-2.
- Pellegrini Filho, A., Vital Brazil, O., 1976. Origem da paralisia respiratória causada pela picada de *Micrurus frontalis*. *Ciênc. Cult.* 28: 199.
- Pereira, M.F., Novello, J.C., Landucci, E.T., Giglio, J.R., Cintra, A.C.O., Oliveira, B., Marangoni, S., 1998. The amino acid sequence of bothropstoxin-II na Asp49 mvotoxin from *Bothrops ijaracussu* snake venoms. *J. Protein Chem* 17, 381-386.
- Ponce-Soto, L.A., Martins, D., Novello, J.C., Marangoni, S., 2007. Structural and biological characterization of two crotamine isoforms IV-2 and IV-3 isolated from the *crotalus durissus cumanensis* venom. *Protein J* 26, 533-40.
- Ponce-Soto, L.A., Tovama, M.H., Hvslop, S., Novello, J.C., Marangoni, S., 2002. Isolation and preliminary enzymatic characterization of a novel PLA2 from *Crotalus durissus collileneautus* venom. *J. Protein Chem* 21, 131-6.
- Ponce-Soto, L.A., Bonfim, V.L., Rodrigues-Simioni, L., Novello, J.C., Marangoni, S., 2006. Determination of primary structure of two isoforms 6-1 and 6-2 PLA2 D49 from *Bothrops ijaracussu* snake venom and neurotoxic characterization using in vitro neuromuscular preparation. *The Protein Journal* 25, 147-155.
- Ponce-Soto, L.A., Lomonte, B., Gutiérrez, J.M., Rodrigues-Simioni, L., Novello, J.C., Marangoni, S., 2007. Structural and functional properties of BaTX, a new lys49 phospholipase A2 homologue isolated from the venom of the snake *Bothrops alternatus*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – General Subjects* 1770, 585-593.
- Prado-Franceschi, J., Hvslop, S., Cogo, J.C., Andrade, A.L., Assakura, M.T., Reichl, A.P., Cruz-Hofling, M.A., Rodrigues-Simioni, L., 1998. Characterization of a mvotoxin from the Duvernoy's gland secretion of the xenodontine colubrid *Philodryas olfersii* (green snake): effects on striated muscle and the neuromuscular junction. *Toxicon* 36, 1407-1421.
- Rigden, D.J., Hwa, L.W., Marangoni, S., Tovama, M.H., Polikarnov, I., 2003. The structure of the D49 phospholipase A2 piratoxin III *Bothrops pirai* reveals unprecedented structural displacement of the calcium binding loop possible relationship to cooperative substrate binding *Acta Crvstllogr D Biol Crvstallogr* 59, 255-62
- Rochat, H., Rochat, C., Miranda, F., Lissitzky, S., Edman, P., 1970. The amino acid sequence of neurotoxin I of *Androctonus australis* Hector. *Eur. J. Biochem* 17, 262.
- Rodrigues-Simioni, L.; Prado-Franceschi, J.; Cintra, A.C.O.; Giglio, J.R.; Jiang, M.S.; Fletcher, J.E., 1995. No role for enzymatic activity or dantrolene-sensitive Ca<sup>2+</sup> stores in

- the muscular effects of bothropstoxin, a Lys49 phospholipase A2 mvotoxin. *Toxico* 33. 1479-1489.
- Rodriguez-Acosta..Alexis2001.  
<http://caibo.ucv.ve/vitaenueve/articulos/medicinatropical/archivosPDF>. acessado em 19/05/2010 às 15:45hrs.
- Rosemberg. P.. 1986. The Relationship between enzymatic activity and pharmacological properties of phospholipases in natural poisons. In: Havis. J.B.. (Ed.). *Animal, Plant and microbial toxins*. Oxford University Press. Oxford. pp. 129-140.
- Rosenfeld. G., Kalen. E.M.. 1971. Measurement of the coagulation activity of snake venoms: importance to scientific research and the therapeutic application. *Rev Paul. Med* 77. 149-50.
- Sanches. E.F., Magalhães. A., Diniz.. C.R.. 1987. Purification of hemorrhagic factor (LHF.1) from the venom of the bush máster snake. *Lachesis muta muta*. *Toxicon* 25. 611-618.
- Scott. D.L., White. S.P., Otwinowski. Z., Yuan. W., Gelb. M.H., Sigler. P.B.. 1990. Interfacial catalysis: the mechanism of phospholipase A2. *Science* 14: 250. 1541-1546.
- Selistre de Araújo. H.S., White. S.P., Ownby. C.L.. 1996. cDNA cloning and sequence analysis of a lysine 49 phospholipase A2 mvotoxin from *Aekistrodon cnotortrix laticinctus* snake venom. *Arch Biochem Biophys*. Feb 1: 326. 21-30.
- Six. D.A., Dennis. E.A.. 2000. The expanding superfamily of phospholipase A2 enzymes: classification and characterization. *Biochim Biophys Acta*. 1488. 1-19.
- Soares. A.M., Andrião-Escarso. S.H., Angulo. Y., Lomonte.B., Gutiérrez. J.M., Marangoni. S., Tovama. M.H., Arni. R.K., Giglio. J.R.. 2000. Structural and functional characterization of mvotoxin I from *Bothrops mooieni* ( Caissaca) sanke venom. *Arch. Biochem. Biophys* 373. 7-15.
- Strichartz. G.R., Wang. G.K.. 1986. Rapid voltage-dependent dissociation of scorpion  $\beta$ -toxin coupled to Na channel inactivation in myelinated nerve. *J. Gen. Physiol* 88.413 - 435.
- Tu. A.T.. 1991.. *Handbook of natural toxins*. vol.5. Peptide venoms and toxins. Marcel Dekker. New York. NY. 827.
- Tu.A.T.. 1977. *Venoms: Chemistry and Molecular Biology*. E: Jonh Wiley & Sons. New York.
- Tzeng. M.C., Hseu. M.J., Yang. J.H., Guillory. R.J.. 1986. Specific binding of three neurotoxins with phospholipase A2 activity to synaptosomal membrane preparations from the guinea pig brain. *J. Protein Cheim* 5. 221-228.
- Vital Brazil. O.. 1972. Neurotoxins from the South American rattlesnake venom. *J. Formosan Med. Assoc.* 71. 394-400.

- Winstead, M.V.; Balsinde, J.; Dennis, E.A., 2000. Calcium-independent phospholipase A2 structure and function. *Biochim Biophys Acta* 1488, 28-39.
- Zamunér, S.R.; da Cruz-Höfling, M.A.; Corrado, A.P.; Hyslop, S.; Rodrigues-Simioni, L., 2004. Comparison of the neurotoxic and myotoxic effects of Brazilian *Bothrops* venoms and their neutralization by commercial antivenom. *Toxicon* 44, 259-71.
- Zlotkin, E.; Fraenkel, F.; Miranda, F.; Lissitzky, S., 1971. The effect of scorpion venom on blowfly larvae—a new method for the evaluation of scorpion venom potency. *Toxicon* 9, 1-8.



UNICAMP



CEEA/Unicamp

**Comissão de Ética na Experimentação Animal  
CEEA/Unicamp**

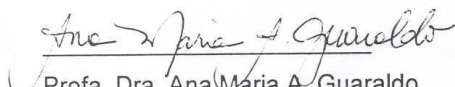
**CERTIFICADO**

Certificamos que o Protocolo nº **1931-1**, sobre "Caracterização bioquímica e estudo da atividade farmacológica na junção neuromuscular de uma miotoxina PLA2 isolada do veneno de *Bothriopsis bilineata*", sob a responsabilidade de **Prof. Dr. Sérgio Marangoni / Victor Corasolla Carregari**, 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 **31 de agosto de 2009**.

**CERTIFICATE**

We certify that the protocol nº **1931-1**, entitled "Biochemical characterization and study of the pharmacological activity in the junction neuromuscular of an isolated miotoxin from the *Bothriopsis bilineata* venom", 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 31, 2009**.

Campinas, 31 de agosto de 2009.

  
Prof. Dra. Ana Maria A. Guaraldo  
Presidente

  
Fátima Alonso  
Secretária Executiva

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

Telefone: (19) 3521-6359  
E-mail: [comisib@unicamp.br](mailto:comisib@unicamp.br)  
<http://www.ib.unicamp.br/ceea/>