

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

LUIS ALBERTO PONCE SOTO

*Caracterização bioquímica e biológica de uma crotoxina
"like" do veneno total de *Crotalus durissus collilineatus*.*

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
Luis Alberto Ponce Soto
e aprovada pela Comissão Julgadora.

Sérgio Marangoni

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

Orientador : Prof. Dr. Sérgio Marangoni

2001

UNIDADE 30
Nº CHAMADA T/UNICAMP
P773c
V _____ EX _____
TOMBO BCI 49476
PROC 16-837/0 @
C _____ DX _____
PREÇO R\$ 11,00
DATA _____
Nº CPD _____

CM00168734-2

318 ID 242780

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP.

P773c **Ponce-Soto, Luis Alberto**
Caracterização bioquímica e biológica parcial de uma crotoxina de veneno total de *Crotalus durissus collilineatus*. / Luis Alberto, Ponce-Soto. -- Campinas, SP. [s.n.], 2001.
88f: ilus.

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

1. Crotoxina. 2. Fosfolipase A₂. 3. Purificação. I. Marangoni, Sérgio. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

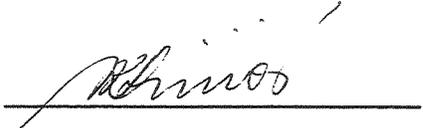
LOCAL E DATA: Campinas, 23 de novembro de 2001.

BANCA EXAMINADORA

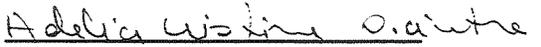
Prof. Dr. Sérgio Marangoni (Orientador)


Assinatura

Profa. Dra. Léa Rodrigues-Simioni


Assinatura

Profa. Dra. Adélia Cristina Oliveira Cintra


Assinatura

Prof. Dr. Marcos Hikari Toyama

Assinatura

9975280

A Deus, nosso criador

A minha esposa Gladis e meu filho Emilio, por suportar com paciência nossa separação esquecendo distância, saudade e por me incentivar para a realização desta tese.

A meus pais Emilio e Felicita, por sempre acreditarem e incentivarem todos os momentos de minha vida profissional, pela confiança e apoio em todo, para a realização deste grande projeto.

Agradecimentos

À Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP)

À FAPESP, pelo apoio financeiro.

Ao Prof. Dr. Sergio Marangoni, prof. Titular do Departamento de Bioquímica do Instituto de Biologia (UNICAMP), a quem agradeço por ter me acolhido no laboratório de sua responsabilidade, me depositado confiança e ter me dedicado sua grande amizade.

Ao Dr. Marcos Hikari Toyama, pela introdução na atividade da pesquisa, ensinamentos, grande amizade desenvolvida no decorrer de nossa convivência; pela influência e contribuição na minha formação científica.

A Prof. Dra. Léa Rodrigues Simioni, pela valiosa contribuição nos estudos de neuroxicidade e por acolher-me no laboratório de sua responsabilidade; pela sua paciência, apoio moral e incentivo constante e sobre todo pela confiança e sua amizade.

A Prof. Dra. Adélia Cristina Oliveira Cintra, da faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo USP por ter aceitado o convite para participar da minha banca examinador, e valorizado assim o meu trabalho.

Ao Prof. Dr. José Camillo Novello, pela participação na banca de qualificação, pelas sugestões e correções da tese.

Ao meu grande amigo: José Antonio da Silva, pelo auxílio em todos os momentos de dúvida laboratoriais, e pela sua amizade. A Dulcinéia Aparecida Ribeiro e Glaucia Coelho Mello, minhas boas amigas que dentre outras coisas ajudaram a preencher os vazios que minha solidão deixou.

Aos meus amigos os quais ficarão em meu coração: Paulo Aparecido Baldasso e Marino Forner, pelo apoio técnico constante, amizade e confiança.

Ao Melchor pela sua ajuda para a realização deste objetivo de minha vida profissional assim como pela convivência que permitiu conhecermos melhor. A Gladys por sua amizade.

A todos meus companheiros LAQUIP que me brindaram sua confiança e amizade, como por ter convivido, e pelas possíveis contribuições.

A Sara pela ajuda nos experimentos no laboratório da Junção Neuromuscular assim como sua amizade.

Ao biólogo Gildo Bernardo Leite, pelo suporte técnico, paciência e amizade dedicados, a minha pessoa, bem como todos meus companheiros do laboratório da junção neuromuscular, da farmacologia que me brindaram seu apoio em todo momento.

Índice

	Pag.
Lista de Abreviações -----	IX
Resumo -----	X
Abstrac -----	XII
I-Introdução -----	01
1.1-Ação e composição do veneno -----	
Oxidoredutases -----	01
Hidrolases -----	02
Glicosidases -----	02
Proteases -----	02
Lipases -----	03
1.2-Neurotoxinas -----	
1.2.1 Inibidores da condução axónica -----	04
1.2.2 Inibidores da transmissão sináptica -----	04
- Toxinas pré-sinápticas -----	04
- Toxinas pós-sinápticas -----	05
1.3-Neurotoxinas como Ferramentas Moleculares -----	05
1.4-Crotalus durissus -----	06
1.5-Toxinas e neurotoxinas de <i>Crotalus durissus terrificus</i> -----	07
Giroxina -----	07
Convulxina -----	07
Crotamina -----	07
Crotoxina -----	08
1.6-Estrutura e função das Fosfolipases A₂ -----	11
1.7-Classificação das Fosfolipases -----	12
1.8-Fosfolipases A₂ neurotóxicas -----	18
II-Objetivos -----	
Objetivos Gerais -----	19
Objetivos Específicos -----	19
III-Materiais e métodos -----	
3.1 Animais -----	20
3.2 Venenos e reagentes -----	20
3.3 Purificação do veneno total de <i>Crotalus durissus terrificus</i> e <i>Crotalus durissus collilineatus</i> -----	
3.3.1 Cromatografia de exclusão molecular em Sephadex G-75 -----	20
3.3.2 Cromatografia de exclusão molecular em HPLC -----	21
3.3.3 Cromatografia em HPLC-RF -----	21

3.4 Eletroforese em PAGE-SDS	22
3.5 Determinação da atividade PLA₂	22
3.6 Medida da atividade inibitoria da crotapotina sobre a atividade PLA₂	23
3.7 Estudos cinéticos da PLA₂ de Cdcoll	
3.7.1 Efeito do tempo de reação de PLA ₂	23
3.7.2 Efeito da Concentração de PLA ₂ de Cdcoll	24
3.7.3 Efeito do pH na atividade da PLA ₂ de Cdcoll	24
3.7.4 Efeito da temperatura na atividade da PLA ₂ de Cdcoll	24
3.7.5 Efeito da concentração de substrato na atividade PLA ₂ de Cdcoll	24
3.7.6 Efeito de alguns íons na atividade PLA ₂ de Cdcoll.	24
3.8 Medida da atividade neurotoxica em nervo frênico diafragma isolado de camundongo	25
3.9 Medida da atividade neurotoxica em músculo <i>biventer cervicis</i> de pintainho --	25
IV-Resultados	29
4.1 Purificação do veneno de <i>Crotalus durissus terrificus</i> e <i>Crotalus durissus collilineatus</i> em cromatografia de exclusão molecular Sephadex G-75	29
4.2 Cromatografia em HPLC (exclusão molecular e fase reversa)	31
4.3 Eletroforese em gel SDS-PAGE	32
4.4 Determinação e comparação da atividade fosfolipásica de PLA₂ de <i>Crotalus durissus terrificus</i> e <i>Crotalus durissus collilineatus</i>	33
4.5 Determinação e comparação da atividade inibitória das crotapotinas sobre a atividade fosfolipásica A₂	34
4.5.1 Atividade inibitória das crotapotinas CdcollF3, CdcollF4, CdtF5, CdtF7, CdcasF3 e CdcasF4 sobre a atividade PLA ₂ de CdcollF6	34
4.5.2 Atividade inibitória das crotapotinas CdcollF3, CdcollF4, CdtF5, CdtF7, CdcasF3 e CdcasF4 sobre a atividade PLA ₂ de CdcascF6	35
4.5.3 Atividade inibitória das crotapotinas CdcollF3, CdcollF4, CdtF5, CdtF7, CdcasF3 e CdcasF4 sobre a atividade PLA ₂ de CdtF15	36
4.5.4 Atividade inibitória das crotapotinas CdcollF3, CdcollF4, CdtF5, CdtF7, CdcasF3 e CdcasF4 sobre a atividade PLA ₂ de CdtF16	37
4.5.5 Atividade inibitória das crotapotinas CdcollF3, CdcollF4, CdtF5, CdtF7, CdcasF3 e CdcasF4 sobre a atividade PLA ₂ de CdtF17	38
4.6 Estudos cinéticos da PLA₂ de Cdcoll	
4.6.1 Efeito do tempo de Incubação e concentração da PLA ₂	39
4.6.2 Efeito do pH na atividade da PLA ₂	39
4.6.3 Efeito da temperatura na atividade da PLA ₂	39
4.6.4 Efeito da concentração de substrato na atividade PLA ₂	41
4.6.5 Efeito de alguns íons na atividade PLA ₂	41
4.7 Estudo da atividade neurotoxica em nervo frênico-diafragma isolado de camundongo (NF-DIC).	43
4.7.1 Registro miográfico do veneno total e crotoxina de Cdcoll	43
4.7.2 Registro miográfico do efeito das isoformas de crotapotina (F3 e F4) e da fração PLA ₂ (F6) isoladas a partir da crotoxina de Cdcoll	46
4.7.3 Registro miográfico das frações reassociadas: F3 + F6 e F4 + F6 isoladas a partir da crotoxina de Cdcoll	49

4.8 Estudo neurotoxico em músculo <i>biventer cervicis</i> de pintainho.	53
4.8.1 Efeito neurotoxico da crotoxina de Cdcoll nas doses de 1, 5, 10 e 20 µg/ml.	53
4.8.2 Resposta contraturante à adição de Ach e K ⁺ -----	56
V-Discusão	
Purificação e caracterização bioquímica -----	58
Estudo cinético da PLA2 de Cdcoll (Cdcoll F6) -----	61
Caracterização biológica. Estudos de neurotoxicidade -----	62
VI-Conclusão	68
VII-Bibliografia -----	69
VIII-Congressos e Publicações	
8.1 Congressos -----	77
8.2 Publicações -----	78

Lista de Abreviações

Lista de Abreviações - Purificação, Cromatografias

Sephadex G-75	Coluna de exclusão molecular com matriz composta de dextrano.
PDA 991	Photodiode Array Detector
LC	Sistema cromatografico HPLC de purificação de proteínas biocompatível da Waters, similar ao sistema FPLC da Pharmacia.
HPLC	High (Pressure/ Performace) Liquid Chromatography
Protein-Pak 300SW	Serie de Coluna da Waters baseadas em sílica em coluna de aço inox polido.
RP HPLC	Reverse Phase HPLC
C18	18 High Carbon Load, High activity sílica
μ-Bondapak C18	Coluna de HPLC com <i>n</i> -octadecyl como base da fase estacionária

Lista de Abreviações - Reagentes, Sais, Tampões

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

Lista de Abreviações – Serpentes, frações, isoformas

Cdcoll	Serpente <i>Crotalus durissus collilineatus</i>
Cdcas	Serpente <i>Crotalus durissus cascavella</i>
Cdt	Serpente <i>Crotalus durissus terrificus</i>
crotoxina	Crotoxina de <i>Crotalus durissus terrificus</i> o <i>Crotalus durissus collilineatus</i>
Crtx	Crotoxina
Crtp	Crotapotina
PLA₂	Fosfolipase A ₂
F5, F7	Isoformas de crotapotina de <i>Crotalus durissus terrificus</i>
F15, F16 e F17	Isoformas de PLA ₂ de <i>Crotalus durissus terrificus</i>
F3 F4	Isoformas indistintas de crotapotina de <i>Crotalus durissus collilineatus</i> e <i>Crotalus durissus cascavella</i> .

RESUMO

Crotalus durissus collilineatus é uma serpente de grande importância médica na região Centro Oeste do Brasil. Desta forma justifica-se o interesse em isolar e caracterizar compostos como a crotoxina que representa a principal fração do veneno bruto, com importantes atividades farmacológicas. Aproximadamente 20 mg de veneno total foram aplicados em uma coluna Protein Pack SW 300 (0,78X30cm Waters) acoplada a um sistema HPLC (Waters) resultando no isolamento da crotoxina. Nessa fase o perfil cromatográfico não mostrou a fração correspondente á crotamina o que reforça a importância do estudo da crotoxina desse veneno.

O isolamento das frações crotapotina e fosfolipase A₂ a partir da crotoxina purificada foi realizado em uma coluna de fase reversa, C-18 μ -Boundapak em HPLC. Quatro isoformas de crotapotina, sendo as isoformas F3 e F4 majoritariamente recuperadas e apenas uma de fosfolipase A₂, (F6) foram purificadas com um alto grau de pureza segundo a caracterização bioquímica e estudos eletroforéticos como SDS-PAGE revelando a massa molecular a crotoxina de 24 kDa e da PLA₂ de 15 kDa e das crotapotinas F3 e F4 com 9 kDa.

O estudo em forma cruzada do efeito inibitório das crotapotinas sobre as PLA₂ provenientes de Cdcoll, Cdt e Cdcas, sugere que as diferenças estruturais são responsáveis pelas diferenças no mecanismo de inibição. A caracterização cinética da fosfolipase A₂ de Cdcoll evidencia um comportamento de enzima alostérica em nossas condições experimentais, dado não relatado ainda na literatura especializada. Este fato reforçou nosso interesse em estabelecer comparações entre outras fosfolipases dependentes de calcio provenientes de veneno de serpentes que possuam um comportamento michaeliano.

O efeito neurotóxico do veneno total, crotoxina, isoformas de crotapotina (F3 e F4); assim como a fração, PLA₂ (F6) isolados, suas reassociações com a PLA₂ (F6) de Cdcoll, foi estudada em registros miográficos, em preparações nervo frênico-diafragma isolado de camundongo e *biventer cervicis* de pintainho. Evidenciou-se ainda que a reassociação das isoformas da crotapotina de Cdcoll (F3 e F4) e a PLA₂ (F6) restabelece o efeito bloqueador neuromuscular característico da crotoxina nativa.

Foram realizadas abordagens bioquímica e farmacológica comparando as duas isoformas de crotapotina (F3 e F4) e reassociação de ambas com a fosfolipase isolada da mesma crotoxina de Cdcoll, são resultados ainda não registrados na bibliografia. Portanto este trabalho é importante para compreender a integridade ou pureza dos componentes isolados, assim como para identificar o efeito neurotóxico. É importante ressaltar que a reassociação entre as isoformas de crotapotina e fosfolipase (PLA₂) não implicou em perda do efeito biológico, o que mostra que a metodologia utilizada foi satisfatória para a purificação das proteínas, preservando a integridade estrutural e funcional das isoformas estudadas.

Abstract

Crotalus durissus collilineatus is a serpent of great medical importance in the region Center West of Brazil. Of this form the interest in isolating and characterizing components as the crotoxin like that they present the main fraction of the raw poison, with important pharmacology activities. Approximately 20 mg of total poison had been applied in a column Protein Pack SW 300 (0,78X30cm Waters) coupled to a system HPLC (Waters) resulting in the isolation of the crotoxin. In this phase the chromatographic profile did not show crotoxin to the corresponding fraction as what it strengthens the importance of the study of the crotoxin of this poison.

The isolation of the fractions crotoxin and phospholipase A₂ from the crotoxin purification was carried through in a phase column reverse, C-18 μ -Bondapak in HPLC. Four isoforms of crotoxin (F3 and F4) to greater recover, and only one of phospholipase A₂, (F6) they had been purified with one high degree of purity according to characterization electrophoretic biochemist and studies as SDS-PAGE disclosing relative the molecular mass of the 24 kDa crotoxin of 15 kDa PLA₂ kDa and the crotoxins F3 and F4 with 9 kDa respectively.

The inhibitory effect of the crotoxins on the PLA₂ in crossed form proceeding from Cdcoll, Cdt and Cdcas discloses to differences structured in the inhibition mechanism. The kinetic characterization of phospholipase A₂ de Cdcoll evidences an allosteric enzyme behavior in our experimental conditions, still dates not told in specialized literature. This fact strengthened our interest in establishing matchings among others phospholipases dependents of calcium proceeding from poison of serpents that possess a Michaelis-Menten behavior.

The neurotoxicity effect of the total poison, as well as of the crotoxin, beyond the components of the crotoxin; isoforms of crotoxin (F3 and F4); as well as the fraction, PLA₂ (F6) isolated, as of of these reassociations with PLA₂ (F6) of Cdcoll, was studied in micrographs registers, red tapes isolated nerve frenic-diaphragm of mouse and to *biventer cervicis* of chick. It was still proven that the to reconstruct of isoforms of the crotoxin of Cdcoll (F3 and F4) and PLA₂ (F6) commit the effect choke to neuromuscular characteristic of the native crotoxin.

Boardings the two biochemist and pharmacology comparing isoformas of crotopotina (F3 and F4) and to reconstruct of both with phospholipase isolated of the same crotoxina of Cdcoll, still not registered in the bibliography, for in such a way this whork were important to comprender the integrity or purity of the isolated components, as well as identifying the neurotoxocity effect. It is important to resaltar that the to reconstruct enters isoformas of crotapotina and phospholipase (PLA₂) did not imply in loss of the biological effect, what sample that the used methodology was satisfactory for the purification of proteins, preserving studied the structural and functional integrity of isoformas.

I INTRODUÇÃO

1.1 – Ação e composição do veneno

Cerca de 90 a 95% do peso seco do veneno de serpentes é constituído por proteínas, as quais apresentam importantes funções biológicas quando comparadas com a fração não protéica (Tu, 1982).

Os venenos de serpentes apresentam-se como uma mistura heterogênea e complexa contendo: substâncias simples como íons (magnésio, cálcio e zinco). O magnésio e o zinco são importantes íons para ação das principais metaloproteases do veneno, como as hemorraginas, e substâncias complexas (enzimas e proteínas). A ação de algumas enzimas proteolíticas, fosfolipases A₂, e neurotoxinas potencializam o efeito tóxico do veneno, principalmente as neurotoxinas que atuam em sinergismo aumentando a ação tóxica (Tu, 1977 e Jia *et al.*, 1996).

Dentro dos compostos simples temos várias substâncias orgânicas como aminoácidos livres, peptídeos, nucleotídeos, carboidratos, lipídios e aminas biogênicas, (Ferreira *et al.*, 1992).

Do ponto de vista bioquímico são encontradas algumas classes de enzimas nos venenos de serpentes sendo a maior parte delas de natureza hidrolítica.

- Oxidoredutases: responsáveis pelas reações de oxido-redução, tais como as L-aminoácido-oxidase e a lactato desidrogenase (Meister, 1965; Mebs, 1970). As L-aminoácido oxidases convertem o aminoácido livre em um α -cetoácido. Muitos venenos de serpentes possuem L-aminoácido oxidase muito ativas, devido à presença de seu cofator a riboflavina; a presença desta enzima dá a cor amarela ao veneno seco, contudo sua atividade biológica não é totalmente esclarecida.

Li *et al.* (1994) descobriram que as L-amino oxidases (LAO) são capazes, em determinadas condições experimentais, de induzirem a agregação plaquetária e a apoptose em determinadas células (Suhr e Kini, 1996). Mclean *et al.*, (1971) descreveram que o veneno de algumas serpentes catalisa a conversão do lactato a piruvato. A presença da

lactato desidrogenase foi demonstrada em vários venenos, principalmente em serpentes do gênero *Naja* e *Dendroaspis*.

- Hidrolases (fosfatases, fosfodiesterases, endonucleases e 5-nucleotidase). As mais conhecidas são as fosfodiesterases que são largamente utilizadas no sequenciamento ou caracterização de oligonucleotídeos e polinucleotídeos (Lasckowski, 1971). A 5-nucleotidase é uma enzima específica encontrada na maioria dos venenos de serpentes, e é mais instável do que as fosfodiesterases (Mebs, 1970).

Fosfatases são hidrolases que utilizam como substrato fosfomonoésteres. Essas enzimas são classificadas como fosfatases ácidas e fosfatases alcalina, baseando-se no pH ótimo para catálise e mecanismo de reação (Vicent, 1992). As endonucleases são específicas para o RNA (Ribonucleases) e para o DNA (Desoxiribonucleases), são enzimas relativamente mais estáveis do que as outras fosfatases (Willians *et al.*, 1961).

- Glicosidasas: a hialuronidase é uma enzima que catalisa reações de hidrólise do ácido hialurônico que é um mucopolissacarídeo, presente na pele, tecido conjuntivo e nos tendões. Esta enzima tem a função de facilitar a difusão das toxinas do veneno para dentro do tecido de suas vítimas (Mayer *et al.*, 1960).

- Proteases: As proteases encontradas no veneno das serpentes podem ser agrupadas em dois grandes grupos: as endopeptidases e as exopeptidases (Iwanaga *et al.*, 1976). As proteases presentes no veneno total não são responsáveis pela ação tóxica do veneno, mais são responsáveis por vários danos, tais como: as hemorragias e as necroses teciduais.

Assim, várias metaloproteases têm sido isoladas de diferentes venenos e caracterizadas como hemorraginas. As metaloproteases são de dois tipos, conforme a especificidade do substrato: enzimas de alta especificidade por substratos que induzem hemorragia quando injetadas em animais. Dentro das hemorraginas existem aquelas com alta especificidade por determinados tipos de substratos e que induzem hemorragias quando injetadas em animais (Mandelbaum *et al.*, 1976; Mori *et al.*, 1987; Sanches *et al.*,

1987; Tu, 1982); e outras proteases que não induzem hemorragia e também não possuem especificidade em relação ao substrato (Asskura *et al.*, 1985; Mandelbaum *et al.*, 1976; Sanches *et al.*, 1987; Tu, 1982).

O veneno de serpentes, particularmente aqueles da família Crotalidae e Viperidae contêm muitas proteinases que agem em diferentes pontos da cascata da coagulação sangüínea (Iwanaga & Suzuki, 1979; Seegers & Ouyang, 1979; Kornalik, 1990). No Brasil, os estudos destas enzimas têm sido realizados principalmente com as peçonhas das serpentes do gênero *Bothrops* e *Crotalus*. As enzimas isoladas de veneno de serpentes que possuem atividade tipo trombina-like apresentam a capacidade de atuar sobre a molécula de fibrinogênio encontrada no plasma, transformando-a diretamente em fibrina (Seegers & Ouyang, 1979).

- Lipases: são enzimas responsáveis pela degradação de lipídios e são comumente encontradas nos venenos de serpentes. São representantes deste grupo de enzimas as fosfolipases e as acetilcolinesterases, sendo as fosfolipases A₂ (PLA₂), as enzimas mais estudadas (Tu, 1977a).

Além das enzimas hidrolíticas o veneno total possui também outras moléculas de importância biológica sem atividade enzimática como as desintegrinas e as lectinas. As desintegrinas possuem massa molecular variada, com um alto conteúdo de resíduos de cisteínas. São proteínas que inibem a interação do fibrinogênio ao complexo glicoproteico IIb-IIIa (receptores), durante a coagulação sangüínea. Possuem uma seqüência característica de três resíduos de aminoácidos Arg-Gly-Asp responsáveis pela atividade biológica (Musial *et al.*, 1990; Kamiguti *et al.*, 1998).

As proteínas denominadas de Lectina tipo C constituem um grupo de proteínas ou glicoproteínas estruturalmente homólogas, mas com funções distintas por exemplo algumas possuem a capacidade de aglutinar células, outras podem precipitar polissacarídeos e glicoproteínas, pelo fato de se ligarem específica e reversivelmente a determinados carboidratos (Carvalho *et al.*, 1998). Outras induzem efeitos anticoagulantes e agregação de plaquetas (Kini, 1997).

1.2 Neurotoxinas

As neurotoxinas podem ser classificadas em dois grandes grupos de acordo com Tu, (1977b).

1.2.1 Inibidores da condução axônica

A estimulação do axônio resulta na despolarização da membrana celular e envolve uma mudança na condutância dos íons Na^+ , K^+ , e Ca^{2+} . Assim qualquer substância que altere o movimento normal, principalmente dos íons Na^+ e K^+ pode ser considerada como neurotóxica. Como exemplo podemos citar a tetrodotoxina, (TTX) que é uma neurotoxina isolada do baiacu ou "puffer fish". A TTX caracteriza-se pelo bloqueio dos canais de sódio (Narahashi, 1967 e Hass, 1986). Toxinas de escorpiões podem também afetar a condutividade do axônio, devido a sua atuação sobre os canais de sódio e potássio (Rochat *et al.*, 1970, Zlotkin *et al.*, 1971, Strichartz *et al.*, 1986).

1.2.2 Inibidores da transmissão sináptica

Além das toxinas que atuam sobre a condução axônica existem aquelas que atuam na transmissão sináptica na região da placa motora da junção neuromuscular, afetando a liberação do neurotransmissor, a acetilcolina.

Estas toxinas afetam, portanto, a contração muscular, esta classe de toxinas são divididas em dois grandes grupos: as neurotoxinas pré-sinápticas (β -neurotoxinas) e pós-sinápticas (α -neurotoxinas) (Tu, 1997b).

- **Toxinas Pré-sinápticas:** conhecidas também como β -neurotoxinas, que genericamente inibem o processo de liberação da acetilcolina. A sua potência é maior que a das toxinas pós-sinápticas (α -neurotoxinas).

A inibição da liberação de acetilcolina leva a um evento chamado de bloqueio da transmissão neuromuscular. Estas toxinas são encontradas nos venenos de serpentes da família Elapidae, tais como: as β -bungarotoxinas e notexinas (Karlsson *et al.*, 1979). As β -neurotoxinas também são encontradas em venenos de serpentes crotálicas e o principal exemplo é a crotalina. (Fraenkel-Conrad, H. 1982; Breithaupt, 1976, Faure e Bon, 1988 e Faure *et al.*, 1991).

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

1.3 – Neurotoxinas: Como ferramentas moleculares

Sabe-se que as neurotoxinas interagem especificamente com receptores, inibindo ou estimulando várias funções celulares, portanto são ferramentas moleculares valiosas dentro da fisiologia e farmacologia. As neurotoxinas em particular, têm sido utilizadas como ferramentas para diferentes finalidades, como por exemplo, a síntese de novas drogas, ou como agentes terapêuticos (tubocurarina e a toxina botulínica) ou na forma de medicamentos como o Captopril, que foi sintetizado a partir do modelo molecular da toxina de *Bothrops jararaca* (Harvey *et al.*, 1998).

As neurotoxinas de peçonhas de escorpiões e serpentes foram largamente usadas na investigação dos canais iônicos. Desde 1952, quando os canais de sódio foram descritos por Hodgkin e Huxley (1952), as neurotoxinas têm contribuído para o isolamento, a caracterização e a determinação de um modelo de estrutura molecular dos canais iônicos bem como na elucidação do papel fisiológico e farmacológico (Vassilev, *et al.*, 1989).

Por meio das várias neurotoxinas determinou-se a existência de quatro sítios receptores distintos nos canais de sódio (Catteral *et al.*, 1984). Ao sítio 1 ligam-se as neurotoxinas guanidínicas solúveis em água (Tetrodotoxina e Saxitoxina), que inibem o transporte iônico pelo canal. Ao sítio 2 ligam-se várias toxinas lipossolúveis (Graynotoxina, Veratridina, Acotina e Batracotoxina), que causam a ativação permanente do canal de sódio com conseqüente redução dos valores do potencial de repouso da membrana, por bloquear a inativação da corrente de sódio e alterar a dependência de voltagem para potenciais de membrana mais negativos.

As α -toxinas de escorpião e da anêmona do mar ligam-se ao sítio 3 causando o retardo ou bloqueio da inativação dos canais de sódio. E as neurotoxinas β escorpiônicas

ligam-se ao sítio 4 alterando, principalmente, a ativação dos canais de sódio. dependência de voltagem.

A sinopse realizada por Catterall (1984) é uma valiosa visão da maioria dos trabalhos fisiológicos, farmacológicos e bioquímicos realizados até então, e só foi possível pelo uso de neurotoxinas na forma pura. Estas neurotoxinas somente foram obtidas com o desenvolvimento de várias metodologias de purificação e isolamento.

Como exemplos importantes podemos citar a crotamina, miotoxina, a cardiotoxina, melitina e as fosfolipases A₂, que são toxinas que evidenciam grande potencial para sua utilização como ferramentas moleculares no estudo de determinadas patologias como a mionecrose.

Os estudos feitos por Homsí-Brandeburgo, *et al.*, (1988), Cintra, A. C.O. *et al.*, (1993), confirmados por Rodrigues-Simioni *et al.*, (1995), mostraram que a BthTX-I é uma miotoxina com estrutura de PLA₂ mas sem atividade catalítica. Esta toxina pode interagir com a membrana da fibra muscular e causar mionecrose.

1.4 – *Crotalus durissus*

Esta espécie e as subespécies próximas são as únicas cascavéis na América do Sul. O gênero *Crotalus* compreende espécies que são encontradas em terras baixas e secas, e se encontram distribuídas desde o sul do México até o Brasil e Paraguai, com interrupções zoogeográficas no Panamá e ao norte do Brasil. As serpentes do gênero *Crotalus* medem aproximadamente 1,80 m. e se alimentam principalmente de mamíferos e outros répteis menores (Janzen, Daniel H. 1991).

Do ponto de vista toxicológico, as serpentes peçonhentas do Brasil da família *Crotalidae* pertencem a quatro gêneros: *Bothrops*, *Crotalus*, *Lachesis*, e da família *Elapidae* temos ao gênero *Micrurus*. As serpentes do gênero *Crotalus* estão distribuídas em:

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

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

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

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

Crotalus durissus trigonicus.- Encontrada em Roraima.

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

1.5 – Toxinas e Neurotoxinas de *Crotalus durissus terrificus*

Desde 1938 foram isoladas e purificadas a partir do veneno total de *Crotalus durissus terrificus* as frações denominadas de:

Giroxina: É farmacologicamente pouco conhecida, produz uma síndrome convulsiva, em condições experimentais em camundongos. Seu isolamento foi descrito por Barrio, A. (1961), Barrabin *et al.*, (1978) e , Alexander, *et al.*, (1988). Não é afetada por congelamento ou por tratamento com temperaturas próximas a 40°C por 15 min.

Convulxina: Foi caracterizada por induzir convulsões e distúrbios respiratórios e circulatórios, é uma toxina de alta massa molecular, que se comporta como uma proteína homogênea. (Vital Brazil O. *et al.*, 1967; Vital Brazil.O. 1972b; Prado-Franceschi, J. e Vital Brazil O. 1981).

Crotamina: É uma proteína neurotóxica de baixo peso molecular de caráter básico caracterizada pela primeira vez por Gonçalves e Vieira, (1950).. Esta toxina é encontrada no veneno de *Crotalus durissus terrificus*, de certas regiões do Brasil, Argentina e Bolívia. É uma proteína de ponto isoelétrico de 10,3 uma massa molecular de 4,8 kDa e três pontes dissulfeto, (Gonçalves, 1956). Apresenta um pequeno número de resíduos de aminoácidos comparados com outras neurotoxinas (Ryden *et al.*, 1973, Yang, 1974). É uma molécula resistente ao calor, suportando uma temperatura de 70°C por 18 horas sem perder sua propriedade tóxica. Toyama, M.H. *et al.* (2000) identificaram duas isoformas F2 e F3 da Crotamina.

Estudos mostraram que quando é injetada intraperitonealmente em ratos causa depressão respiratória, lacrimejamento, paralisia das patas posteriores, convulsão e morte. Recentemente Macin *et al.*, (1997) mostraram que a Crotamina em baixas concentrações é capaz de induzir um efeito anestésico local cujo mecanismo de ação é desconhecido. Assim como existe a presença de isoformas detectadas por cromatografia convencional (Smith and Schmidt 1990).

A espécie *Crotalus durissus ruruima* têm mostrado dois tipos de venenos, uma de coloração amarela e a outra branca, trazendo como consequência diferenças bioquímicas, e biológicas quando comparado com o veneno de *Crotalus durissus terrificus* (Dos Santos M. C., *et al.*, 1993).

Crotoxina: é a principal neurotoxina, representa quase 50% do peso seco do veneno total, e foi a primeira neurotoxina a ser purificada e analisada em 1938 por Fraenkel-Conrat. A crotoxina é a responsável pela alta toxicidade do veneno, atuando nas terminações nervosas, respondendo pelas paralisias motoras e respiratórias, em condições experimentais.

Esta proteína é um heterodímero composto por duas diferentes subunidades: uma fosfolipase A₂ (PLA₂) (componente básico) com uma massa molecular de 14,5 kDa e um componente denominado crotapotina, (componente ácido) com uma massa molecular de 9 kDa. (Breithaupt 1976, Bon *et al.*, 1979).

Quando um componente da crotoxina é separado do outro, seu efeito tóxico é praticamente anulado, sendo dez vezes menor que a sua forma associada (Slottay Fraenkel-Conrat 1938. Chang e Lee 1977, Hawood e Santana de Sá S. 1979). A fosfolipase A₂ (PLA₂) é o componente principal e responsável pelo desencadeamento dos efeitos farmacológicos elucidado pelo complexo crotoxina (Hendan e Fraenkel-Conrat 1971).

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

- Modificação pós-traducional que ocorre sobre uma única forma do transcrito primário levando a formação de isoformas de crotapotina (Bouchier *et al.*, 1991).

- Expressão de diferentes RNAs mensageiros, levando a formação de isoformas de PLA₂ (Faure *et al.*, 1994).

De acordo com alguns modelos os efeitos farmacológicos das PLA₂ poderiam ser desencadeados pela presença de um sítio farmacológico presente nas moléculas de PLA₂ e que é independente da atividade do sítio catalítico. O sítio farmacológico da enzima teria alta ou baixa afinidade por determinado sítio alvo presente na membrana celular.

A crotapotina foi inicialmente descrita como uma molécula “chaperone” das fosfolipases A₂ de *Crotalus durissus terrificus*. A crotapotina potencializa a toxicidade da PLA₂ (Bon, *et al.*, 1979); e este fenômeno de potencialização é interpretado como um fenômeno farmacocinético, onde o componente ácido pode proteger a fosfolipase A₂ da inativação por ligação a sítios de baixa afinidade. No entanto, a crotapotina inibe a atividade enzimática da PLA₂. (Laure, 1990).

Landucci *et al.*, (1995), mostraram que a crotapotina também possui uma atividade antiinflamatória, e que esta não é devida à liberação de corticosteróides endógenos ou inibição da atividade ciclo - oxigenase. Um possível mecanismo desse efeito antiinflamatório talvez seja decorrente da interação da crotapotina com fosfolipases A₂ extracelulares geradas durante o processo inflamatório. Entretanto, o papel da crotapotina, como um antiinflamatório ou sua real participação no processo de neurotoxicidade da PLA₂ ainda não está totalmente esclarecido (Landucci, *et al.*, 2000).

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

A crotoxina, principal neurotoxina das serpentes de *Crotalus durissus terrificus*, possui várias isoformas, que podem ser, na verdade, combinações das subunidades de crotapotina e fosfolipase A₂. O grande problema para o estudo desta neurotoxina é se obter um material com alto grau de homogeneidade molecular, tanto para o estudo da ação

isolada do complexo crotapotina-fosfolipase bem como para estudar a atividade biológica de suas subunidades.

Até o momento a crotapotina está sendo considerada farmacologicamente inativa quando se encontra isolada do complexo, crotoxínico e bioquimicamente inibe a atividade PLA₂, (Haberman and Breithaupt 1978; Bon, *et al.*, 1979; Verheij, *et al.*, 1981; e Gopalakrishnarone, *et al.*, 1984), sua função seria o de facilitar a união da PLA₂ aos sítios específicos presentes nas membranas biológicas envolvidos em suas atividades fisiológicas bem como farmacológicas. (Bon, *et al.*, 1979).

Estes sítios são de natureza protéica ou glicoprotéica e estariam localizados na superfície da membrana plasmática das células alvos (Kini e Evans 1989). Estudos mais recentes, porém, demonstraram que a crotapotina quando administrada "in vivo" (através de injeção subplantar, intraperitoneal ou por via oral) apresenta propriedades antiinflamatória. Provavelmente a crotapotina interage com as PLA₂ extracelulares geradas durante o processo inflamatório levando a uma redução da atividade hidrolítica destas últimas. (Landucci, *et al.*, 1995).

A crotoxina considerada então como uma substância neurotóxica é do ponto de vista farmacológico e fisiológico, uma toxina que exibe uma atividade inibitória principalmente podendo apresentar um bloqueio da transmissão neuromuscular ao nível pré sináptica observado por Vital, O. e Excell, B. J. (1971); Vital, B. (1972b); Chang, C. C. and Dong Lee, J. (1977b); Hawgood, B. J. e Smith, J. W. (1977); e pós-sináptica desencadeando algum efeito na região sub sináptica à semelhança do curare (Vital, B. *et al.*, 1966; Hanley, 1978, Hawgood e Santana de Sá S. 1979 ; Bon, *et al.*, 1979 e Simpson, *et al.*, 1993).

A crotoxina pode inibir a transmissão axônica afetando fortemente o fluxo normal de íons Na⁺ e K⁺ ao longo da ação. O efeito da crotoxina na transmissão pré-sináptica causa uma modificação trifásica na liberação de neurotransmissores das terminações nervosas motoras. Esta modificação trifásica é caracterizada por uma depressão fugaz na liberação de acetilcolina seguida de um ligeiro aumento que precede o bloqueio irreversível da transmissão neuromuscular (Chang e Lee 1977a, Chang e Su 1982).

Os efeitos da crotoxina ao nível pós-sináptico, caracteriza-se pelo bloqueio da resposta da acetilcolina através de uma estabilização do receptor de acetilcolina de um estado conformacional inativo (Bon, *et al.*, 1979).

São descritos dois modelos para explicar a interação da crotoxina com a membrana pré-sináptica. O primeiro modelo chamado de Dissociação explica que quando a crotoxina se aproxima do receptor da membrana ocorre uma dissociação do complexo crotapotina-PLA₂, permitindo a PLA₂ se ligar a vários receptores de baixa especificidade na membrana das células; de acordo com a literatura este mecanismo é muito improvável. O segundo modelo, designado por Complexo Ternário Transitório, estabelece que a crotoxina liga-se primeiramente ao receptor da membrana e só então ocorre a dissociação de seus componentes, liberando crotapotina ao meio, enquanto a PLA₂ permanece ligada ao receptor (Delot, E. e Bon, C. 1993).

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

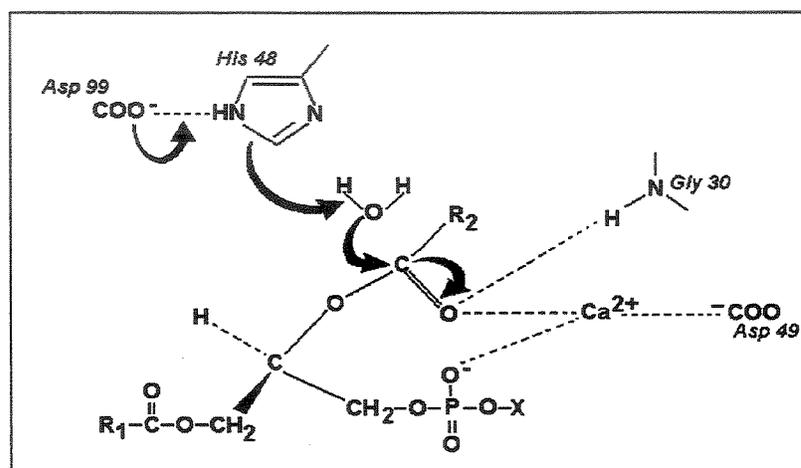
1.6 - Estrutura e Função das Fosfolipases A₂

As fosfolipases A₂ (PLA₂) são enzimas amplamente distribuídas na natureza, podendo ser encontradas em bactérias, plantas, tecidos de mamíferos (pulmão, fígado, baço, coração, eritrócitos, plaquetas e leucócitos polimorfonucleares). No entanto, as mais conhecidas e amplamente estudadas são aquelas encontradas nos tecidos pancreáticos de mamíferos e nos venenos de serpentes e insetos (Verheij, *et al.*, 1981; Van der Bosch, 1980).

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

forte interação com o grupo carboxílico da Asp-99, impedindo que ocorra uma rotação no anel imidazol (que está envolvido com a catalise), deixando o nitrogênio da posição 1 deste anel na posição espacial própria.

Uma molécula de água promove então um ataque nucleofílico ao carbono do grupo éster do substrato e nesse momento o anel imidazol da His-48 recebe um próton da molécula de água facilitando a reação. Logo após ocorre a hidrólise da união acil-éster na posição sn-2 do fosfoglicerídeo (substrato), este próton é doado pelo anel imidazol para o oxigênio que forma então um grupo álcool de lisofosfolípídeo a ser liberado, quadro 1, (Verheif, *et al.*, 1980).



Quadro 1. Representação esquemática do mecanismo catalítico proposto para as PLA2. (Verheij *et al.*, 1980).

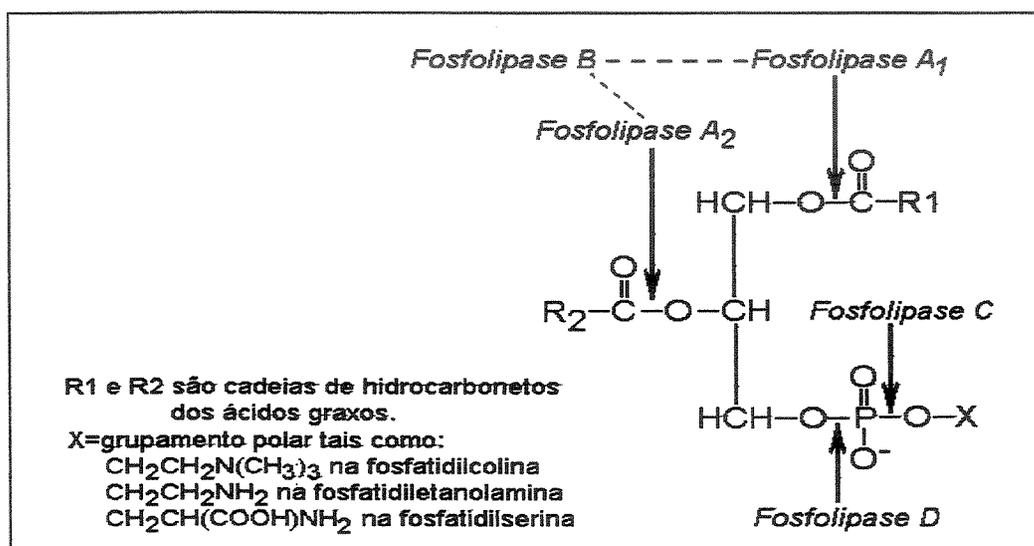
O sítio para união do cálcio, importante para a catálise, apresenta um cátion ligado pelo oxigênio do grupo carbônico dos resíduos Tyr-28, Gly-30, Gly-32 e por oxigênio da cadeia lateral do resíduo Asp-49. No mecanismo de catalise, o cálcio tem dupla função: primeiro: fixar o fosfato e segundo: estabilizar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

1.7 - Classificação das Fosfolipases.

As fosfolipases são classificadas dependendo de sua estrutura e de seu mecanismo de catálise. De acordo com seu sítio de hidrólise sobre o triacilglicerol se

dividem: em fosfolipase A₁, fosfolipase A₂ (PLA₂), fosfolipase B, fosfolipase C, e fosfolipase D. As PLA₂ são as mais abundantes lípases do nosso organismo e são capazes de metabolizar vários tipos de lipídios tais como: fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilinositol, fosfatidilglicerol, plasminogênio (Quadro 2).

Estas enzimas possuem várias pontes dissulfeto e são extremamente estáveis ao tratamento com calor e ácidos, apresentando uma homologia seqüencial entre si e especialmente na região do sítio catalítico (Chang *et.al.*, 1977).



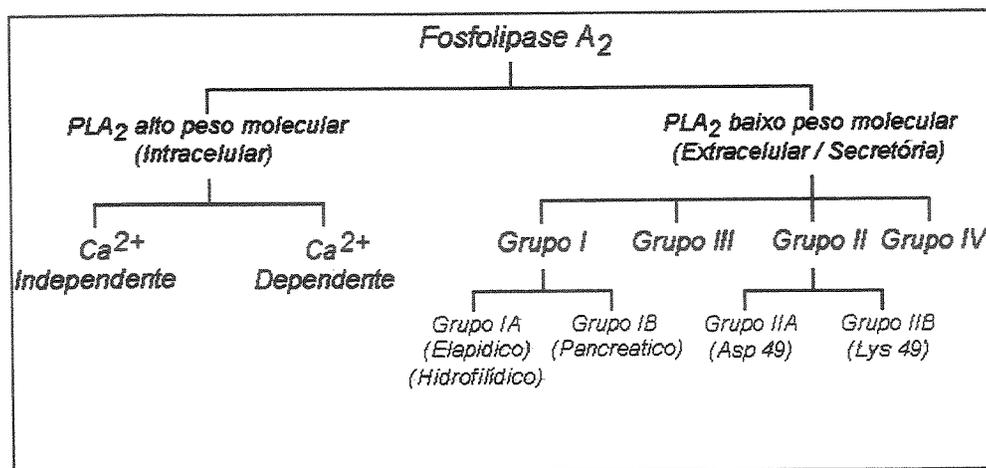
Quadro 2. Sítio de hidrólise das fosfolipases (Kini, 1997).

As PLA₂ (E.C. 3.1.1.4) catalisam especificamente as reações de hidrólises de uma ligação acil-éster em uma posição sn2 de fosfoglicerídeos em uma reação dependente de cálcio liberando quantidades equimolares de ácidos graxos livres e lisofosfolípídeos.

As fosfolipases A₂ (PLA₂) também podem ser classificadas de acordo com a sua estrutura em dois grandes grupos: uma de alta massa molecular, intracelular e uma de baixa massa molecular. As PLA₂ de alto peso molecular estão bem caracterizadas e podem ser subdivididas do ponto de vista catalítico, em dois grandes subgrupos: as que necessitam de cálcio para sua atividade, com uma massa molecular que vai de 140 a 400

kDa, e as que não necessitam, apresentando massa molecular que vai de 85 a 100 kDa, quadro 3, (Kini, 1997).

De acordo com Kini (1997) as PLA₂ de baixa massa molecular relativa podem ser subdivididas em quatro subgrupos: Grupo I, Grupo II, Grupo III e Grupo IV.



Quadro 3. Classificação das PLA₂ (Kini, 1997)

As PLA₂ do grupo I englobam as isoladas dos venenos elapídicos, hidrofilídicos (Grupo IA) e a isoladas do pâncreas de mamífero (Grupo IB). Estas enzimas contêm cerca de 115 – 120 resíduos de aminoácidos e sete pontes dissulfeto.

As fosfolipases A₂ do grupo II são encontradas nos venenos de serpentes crotálicas e viperídicas e em células humanas como as plaquetas. Estas enzimas possuem cerca de 120 a 125 resíduos de aminoácidos e sete pontes dissulfeto. Fazem parte deste grupo as enzimas PLA₂ miotóxicas Asp 49 (D49) e Lys 49 (K49), que possuem uma atividade enzimática baixa ou residual.

As PLA₂ do grupo III englobam aquelas isoladas de abelhas, diferentemente das outras classes de PLA₂ estas são glicoproteínas, contendo de 130 a 135 resíduos de aminoácidos. Estas possuem uma baixa homologia com as outras PLA₂.

As PLA₂ do grupo IV podem ser consideradas as mais recentes dentro da família das PLA₂, do ponto de vista estrutural. Estas PLA₂ têm duas cadeias polipeptídicas: uma longa com 77 resíduos de aminoácidos e uma curta com 42 resíduos de aminoácidos,

ligados por pontes dissulfeto intercadeias. Estas enzimas mostram dependência de cálcio para sua atividade (McIntosh, 1995).

Segundo Dennis (1994) as PLA₂ também podem ser classificadas de acordo com sua função, localização, regulação, mecanismo, seqüência de aminoácidos, estrutura e papel dos íons divalentes, quadro 4, (Dennis, 1994).

Características	Classes		
	I, II, III	IV	V ? ^a
Localização	Extracelular	Intracelular	Intracelular
Massa molecular	~ 14 kDa	~ 85 kDa	~ 40 kDa
Aminoácidos	~125	~750	----
Cisteínas	10 – 14	9	----
Pontes sulfeto	5 – 7	0	----
Sensibilidade ao DTT	+	-	-
Preferência por ácido araquidônico	-	+	+
Requerimento de Ca ²⁺	~ mM	~ μM ^b	Nenhuma
Papel do Ca ²⁺	Catálise	Assoc Membrana	Nenhuma
Proteína regulatória	-	-	PFK (?)
Cofatores regulatórios	-	-	ATP
Fosforilação regulatória	-	+	-
Atividade de liso - PLA ₂	-	Alta	+
Atividade de PLA ₁	-	+	-
Atividade transacilase	-	+	-
Hidrólise de Acil-CoA graxo	-	-	+

Quadro 4. Propriedades dos diferentes grupos de PLA₂ (Dennis, 1994).

^a Dados obtidos para PLA₂ miocárdica canina. ^b Outros metais e sais podem, in vitro, substituir o cálcio. (-) ausente, (+) presente.

PFK = fosfofructoquinase.

Dentro do grupo de PLA₂ de alta massa molecular intracelular (Kini, 1997) podemos colocar as fosfolipases A₂ da classe IV assim como da classe V isolada do músculo cardíaco de cães, classificadas por Dennis, (1994).

Estas fosfolipases ocorrem abundantemente na natureza, e são do ponto de vista bioquímico e biológico, as mais estudadas. As fosfolipases A₂ foram as primeiras fosfolipases a serem reconhecidas, sua descoberta foi baseada na observação da ação do suco pancreático e do veneno de serpentes na hidrólise da fosfatidilcolina (Wittcoff, 1951).

Estudos subsequentes mostraram que as fosfolipases A₂ são abundantemente encontradas em venenos de várias serpentes, nas glândulas exócrinas, onde estas enzimas têm um papel importante na digestão de lipídios (Wittcoff, 1951, Dennis, 1983 e Harris, 1991).

Nestes últimos anos as pesquisas sobre fosfolipases A₂ têm sido impulsionadas principalmente pela ação destas em várias atividades biológicas (Quadro 5).

Neurotoxicidade Neurotoxinas pré-sinápticas Neurotoxinas pós-sinápticas Miotoxicidade Mionecrose local Miotoxicidade sistêmica Cardiotoxicidade Efeito anticoagulante Iniciador da agregação plaquetária Inibidor da agregação plaquetária Atividade hemolítica Hemorragia Interna Atividade antihemorrágica Atividade convulsionante Atividade hipotensiva Atividade edematogênica Lesão de órgãos e tecidos.

Quadro 5. Efeitos farmacológicos das enzimas PLA₂ isoladas do veneno total de serpentes. (Kini 1997).

As fosfolipases A₂ também têm grande importância nos processos de fertilização (Fry *et al.*, 1992); proliferação celular (Arita *et al.*, 1991); contração da musculatura lisa (Nakajima *et al.*, 1992; Vadas *et al.*, 1993); hipersensibilização e processos inflamatórios crônicos (Vadas *et al.*, 1986 e Vadas *et al.*, 1993).

As PLA₂ têm um papel fundamental no metabolismo de lipídeos e estão intimamente relacionados com a liberação de ácido araquidônico que é um precursor comum de uma série de lipídios bioativos tais como as prostaglandinas, leucotrenos e tromboxanos (eicosanoides), compostos de vida média curta, embora de resposta fisiológica importante.

Os efeitos farmacológicos, observados pela ação das fosfolipase A₂ (PLA₂) não são necessariamente gerados pela quebra de fosfolipídeos e pela ruptura das membranas biológicas. As fosfolipases A₂ parecem apresentar além do sítio catalítico característico, um sítio (s) farmacológico (s) distinto (s) do catalítico. (Yang 1994) e são portanto, mecanismos independentes da atividade catalítica (Gutiérrez e Lomonte, 1995).

A presença do sítio específico distinguiria uma célula alvo de uma célula não alvo, isso determinaria a união de uma enzima com sua célula alvo (presença do sítio ativo com alta especificidade) e da não união da célula alvo (ausência do sítio e baixa especificidade, ocorrendo apenas quando há um excesso de enzima).

Os diferentes efeitos farmacológicos promovidos pelas fosfolipase A₂ podem ser explicados também pela presença de sítios alvos específicos, que estão localizados na superfície das células ou do tecido alvo. Estes sítios alvos seriam reconhecidos por sítios farmacológicos localizados na superfície das PLA₂, que de forma geral são independentes, mas algumas vezes estes se sobrepõem com o catalítico (Kini e Evans, 1989). De acordo com esta hipótese haveria uma necessidade de complementaridade entre o (s) sítio (s) farmacológico (s) e o sítio alvo em termos de equilíbrio de cargas, interação hidrofóbica e interações de Van der Waals.

Segundo Kini e Evans (1989) a natureza química deste sítio de ligação entre as PLA₂ e as células ou tecido alvo poderia estar entre um lipídio ou uma proteína (glicoproteínas). Devido à alta especificidade das interações pode se supor que as glicoproteínas podem estar diretamente relacionadas com o reconhecimento, contudo lipídios próximos ao sítio de ligação também podem contribuir para o aumento da especificidade. Muitos dos receptores para estas PLA₂ já foram identificados e caracterizados tanto estruturalmente como funcionalmente. Um dos mais bem caracterizados e conhecidos é a proteína do canal de potássio (Kini, 1997).

Trabalhos recentes tem mostrado que algumas PLA₂, cataliticamente ativas podem ter um papel importante na morte de células bacterianas gram negativas, como a *Staphylococcus aureus* (Harwing, *et.al.*, 1995). Recentemente, um efeito bactericida de PLA₂ humanas não pancreáticas foi demonstrado sobre linhagens de *S. aureus*. De acordo

com estes resultados, esta ação bactericida parece estar diretamente relacionada com a atividade catalítica das PLA₂ (Weinrauch, *et.al.*, 1996).

1.8 - Fosfolipases A₂ neurotóxicas.

Dentro das PLA₂ neurotóxicas são consideradas as β neurotoxinas por ser potentes bloqueadores da transmissão neuromuscular. As PLA₂ neurotóxicas podem ser divididas em dois grandes grupos:

β - Neurotoxinas Monoméricas, compostas unicamente por PLA₂, um exemplo desta classe está a Notexin de *Notechis s. scutatus* (Bon, 1997 e Kini, 1997).

β - Neurotoxinas Multiméricas, compostas por uma molécula de PLA₂ associada com uma outra molécula, sem atividade enzimática. Como exemplo destas neurotoxinas considera-se a crotoxina isolada de *Crotalus durissus terrificus* (Bon, 1997).

Até hoje, poucos são os estudos sobre o veneno de *Crotalus durissus collilineatus* e de sua principal fração a crotoxina usando-se uma abordagem bioquímica ou biológica.

Desta maneira, o modelo utilizado torna-se muito interessante para estudos sobre a caracterização bioquímica, farmacológica, assim como sobre a interação estrutura-atividade no processo de neurotoxicidade.

II OBJETIVOS

2.1 - OBJETIVOS GERAIS.

- Isolamento e purificação da crotoxina like de veneno total de *Crotalus durissus collilineatus* através de cromatografia convencional.
- Desenvolvimento de novas metodologias para o fracionamento do veneno total de *Crotalus durissus collilineatus* e a padronização de um processo de purificação em larga escala dos principais componentes neurotóxicos bem como de suas sub-unidades.
- Caracterização da atividade da crotoxina like de *Crotalus durissus collilineatus* através de estudos físico-químicos, bioquímicos e farmacológicos.

2.2 - OBJETIVOS ESPECIFICOS.

- Determinação e comparação da atividade da PLA₂ de *Crotalus durissus collilineatus* com *Crotalus durissus cascavella* e *Crotalus durissus terrificus*.
- Determinação da atividade inibitória da crotopotina sobre a atividade PLA₂ de *Crotalus durissus collilineatus* com *Crotalus durissus cascavella* e *Crotalus durissus terrificus*.
- Determinação da neurotoxicidade da crotoxina like.
- Determinação preliminar da atividade cinética da PLA₂ de crotoxina like de *Crotalus durissus collilineatus* em relação à atividade cinética de PLA₂ de Crotoxina de *Crotalus durissus terrificus*, *Crotalus durissus cascavella*

III MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 - Animais

Foram utilizados para os ensaios biológicos e farmacológicos ratos machos Winstar (120-150g) e camundongos Swiss (18-20g) obtidos no biotério central da UNICAMP.

3.2 - Venenos e Reagentes

O veneno total de *Crotalus durissus terrificus* foi adquirido do Sigma Chemical Co (USA) O veneno total de *Crotalus durissus collilineatus* foi adquirido da Bio-Agents Serpentário Proteínas Bioativas Ltda (Fazenda Boa Esperança, Batatais, São Paulo).

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

3.3 - Purificação do veneno total *Crotalus durissus collilineatus* e *Crotalus durissus terrificus*.

3.3.1 - Cromatografia de exclusão molecular em Sephadex G75

O veneno total de *Crotalus durissus collilineatus* (100mg) foi dissolvido em 2,0ml de tampão Bicarbonato de Amônio (0,1M, pH 7.8) até sua homogeneização. O veneno homogeneizado foi então submetido a uma clarificação por centrifugação a 250X g durante 5 minutos, o sobrenadante obtido foi guardado para posterior aplicação na coluna cromatográfica e o precipitado descartado.

O sobrenadante (veneno bruto) foi aplicado em uma coluna de Sephadex G75 (1.6 x 100cm), previamente equilibrada com tampão bicarbonato de amônio (0,1M pH 7,8). A eluição do material foi realizada usando-se o tampão bicarbonato de amônio 0,1M, pH 7,8, a um fluxo constante 12ml/h. As amostras com 3ml por tubo foram coletadas em um coletor de frações Redi Frac da Amersham Pharmacia Biotech. A corrida cromatográfica foi

monitorada usando-se absorvância a 280 nm e as frações obtidas liofilizadas e guardadas a -20°C .

Este procedimento também foi adotado para a purificação do veneno total de *Crotalus durissus terrificus*.

3.3.2 - Cromatografia de exclusão molecular em HPLC

Cerca de 20mg do veneno bruto de *Crotalus durissus collilineatus* foram homogeneizados em tampão bicarbonato de amônio 0,1M, pH 7,9. Esta solução de veneno foi então centrifugada a 250X g por 5 minutos para clarificação da solução. O sobrenadante obtido foi então aplicado à coluna pré-empacotada de exclusão molecular em HPLC, Protein Pack SW 300 (0.78 x 30cm) (Waters). A coluna cromatográfica acoplada ao sistema HPLC-biocompatível, APPS LC 650E (Waters), foi previamente equilibrada com o tampão bicarbonato de amônio, pH7,9, 0,1M, 60 minutos antes da corrida. A eluição do material foi realizada a um fluxo constante de 0,2ml/min e monitorada a uma absorvância de 280 nm. As frações coletadas em um coletor de frações automático Foxy 200 foram liofilizadas e guardadas a -20°C .

Este procedimento também foi realizado para o veneno total de *Crotalus durissus terrificus*.

3.3.3 - HPLC de fase reversa

Tanto a crotoxina like de *Crotalus durissus collilineatus*, assim como a crotoxina de *Crotalus durissus terrificus*, foram re-purificadas em uma coluna HPLC de Fase Reversa preparativa. O sistema cromatográfico utilizado foi o HPLC - PDA 991 (Waters), equipado com duas bombas Waters modelo 510/B, um injetor automático de amostras U6K com um "loop" de 2,0 ml e uma coluna μ -Boundapak C-18 0,78 X 30 cm preparativa Waters), previamente equilibrada com ácido trifluoroacético 0,1%, pH 3,5 (Tampão A). Inicialmente realizamos a eluição das amostras com um gradiente linear de acetonitrila 66% (Tampão B) posteriormente este gradiente foi modificado para a otimização da purificação das frações, bem como do veneno total. As frações eluídas foram monitoradas a 280 nm.

3.4 - Eletroforese em PAGE-SDS

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

A corrida eletroforética foi realizada em um Sistema High Small II SE 250 (Hoefer Scientific). Tanto as amostras quanto os marcadores foram dissolvidos no tampão de amostra (Tris-HCl, 0,075M, pH 6,8; 10% de Glicerol; 4% de SDS; 0,001% de Bromofenol). A corrida eletroforética foi realizada usando-se uma amperagem constante de 40 mA, durante 60 minutos, ao final da eletroforese os géis foram corados com solução de Coomassie Blue 0,05% a 37°C, em seguida o gel foi descorado (solução de ácido acético 7%).

Também foi utilizada, para análise do grau de homogeneidade molecular da amostra, a eletroforese em gel de PAGE-SDS-Tricina, de acordo com o método descrito por Schägger e Von Jagow (1987) através de um sistema de eletroforese descontínuo e um gel de corrida a 10%. A corrida eletroforética foi realizada a uma amperagem constante de 20 mA durante 3 horas, após a corrida os géis foram corados e descorados como descrito anteriormente.

3.5 Determinação da atividade PLA₂

A determinação da atividade fosfolipásica foi realizada segundo o método descrito por Cho e Kézdy, (1991) e Holzer e Mackessy (1996), utilizando-se como o substrato o ácido 4-nitro-3-(octanoiloxi) benzóico. Foram utilizadas amostras com uma concentração de 1,0 mg/ml de amostra, no caso do veneno total, crotoxina like e fosfolipase A₂ isoladas. As amostras foram incubadas junto com o substrato, tampão de reação (Tris-HCl 0,1M Ca²⁺ 0,01M pH 8) por 20 minutos. Logo em seguida a reação foi paralisada com ácido acético 30% e a absorbância medida a 425 nm.

3.6 - Medida da atividade inibitória da crotapotina sobre a atividade PLA₂.

Para avaliação do efeito inibitório das crotapotinas obtidas foram utilizados os mesmos protocolos para determinação da atividade fosfolipásica A₂. As PLA₂ isoladas 1,0 mg/ml como descrito anteriormente foram préincubadas por 20 minutos no tampão de reação com as crotapotinas na razão de 1:1 (M/M), o meio de pré-incubação foi o mesmo do ensaio enzimático sem a enzima. Após este tempo de incubação as amostras de PLA₂ e crotapotina foram colocadas no meio de reação. A velocidade da reação enzimática foi expressa em quantidade de produto formado por mg de enzima por minuto (nmoles/min/mg).

3.7. Estudos Cinéticos da PLA₂ de Cdcoll

A fração de PLA₂ purificada foi submetida a estudos cinéticos, os quais foram feitos em triplicatas, e os resultados obtidos a partir de suas médias.

A atividade fosfolipásica A₂ (PLA₂) foi avaliada de acordo com o método descrito por Holzer e Mackessy (1996). Usando SpectraMax 340 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) para microplaca 96-well. Foram utilizadas amostras com uma concentração de 1,0 mg/ml de PLA₂. O ensaio padrão continha 200 µl de tampão (10 mM de Tris-HCl, 10 mM de CaCl₂, 100 mM NaCl, pH 8.0), 20 µl de substrato, 20 µl de água deionizada e 20 µl de amostra em um volume final de 260 µl. Depois da adição da PLA₂ (20 µl), a mistura foi incubada por 40 min a 37°C, e lida com absorbância de 425 nm em intervalos de 10 minutos, sendo a atividade enzimática ótima observada em 20 min.

3.7.1. Efeito do Tempo de Reação da PLA₂ de Cdcoll

A atividade enzimática foi determinada nas condições de ensaio descritas no método 3.6, com exceção do tempo de incubação que teve uma variação de 10 a 40 minutos. A cada dez minutos foi feita a leitura.

3.7.2. Efeito da Concentração da PLA₂ de Cdcoll

A concentração da fração PLA₂ foi variada até uma concentração em que se pôde ter uma linearidade da reta da atividade PLA₂ lida a 425 nm. A atividade foi determinada como descrito no método 3.6.

3.7.3. Efeito do pH na atividade da PLA₂ de Cdcoll

Ensaio para observação do efeito do pH sobre atividade de PLA₂ foi realizado em meios de reação preparados com diferentes valores de pH (4,0-10,0). A atividade foi determinada como descrito em 3.6, e foi feito um controle para cada pH. A concentração de enzima utilizada foi idêntica a do item 3.6. Os tampões utilizados foram: Tampão Citrato de sódio-HCl pHs 4,5; 5,0 e 5,5; Tampão Fosfato-NaCl pHs 6,0; 6,5 7,0 e 7,5; Tampão Tris-HCl pHs 8,0 e 8,5; e Tampão Glicina-NaOH pHs 9,0; 9,5 e 10,0.

3.7.4. Efeito da Temperatura na Atividade da PLA₂ de Cdcoll

O teste foi realizado em tubos de ensaio nas mesmas condições descritas no método 3.6, com ensaio padrão contendo: 100ul de substrato, 100ul de água deionizada, 1000ul de tampão (Tris-HCl 10 mM, CaCl₂ 10mM, NaCl 100mM, pH 8,0) e 100ul de PLA₂. A temperatura, variada de 30-70°C, foi mantida por 20 minutos e em seguida feita a leitura à 425nm.

3.7.5. Efeito da concentração de substrato na atividade PLA₂ de Cdcoll

Esse ensaio foi feito variando-se a concentração do substrato 3-nitro-4(octanoiloxi) ácido benzóico de acordo com o método 3.6.

3.7.6. Efeito de alguns íons na Atividade da PLA₂ de Cdcoll

A atividade da PLA₂ na presença de íons divalentes (Ca²⁺, Mn²⁺, Mg²⁺, Zn²⁺ e Cu²⁺) foi determinada de acordo com o método 3.6.

3.8 - Medida da atividade neurotóxica da crotoxina em nervo frênico-diafragma de camundongo

Para estes experimentos foram utilizados preparações com nervo frênico de diafragma de camundongo. A preparação foi removida cirurgicamente de animais anestesiados com hidrato de cloral (3 mg/kg) e sacrificados por seção e sangria dos vasos cervicais. A preparação (músculo diafragmático, juntamente com seu nervo motor-o nervo frênico) foi cuidadosamente retirada como descrito por Bülbring (1946) para ratos, e colocada em uma cuba contendo 5,0 ml de solução de Tyrode e, em seguida presa, através dos músculos da costela, por dois ganchos existentes na base da cuba. A temperatura foi mantida a 37°C e a preparação aerada com carbogênio (mistura de 95% O₂ e 5% de CO₂).

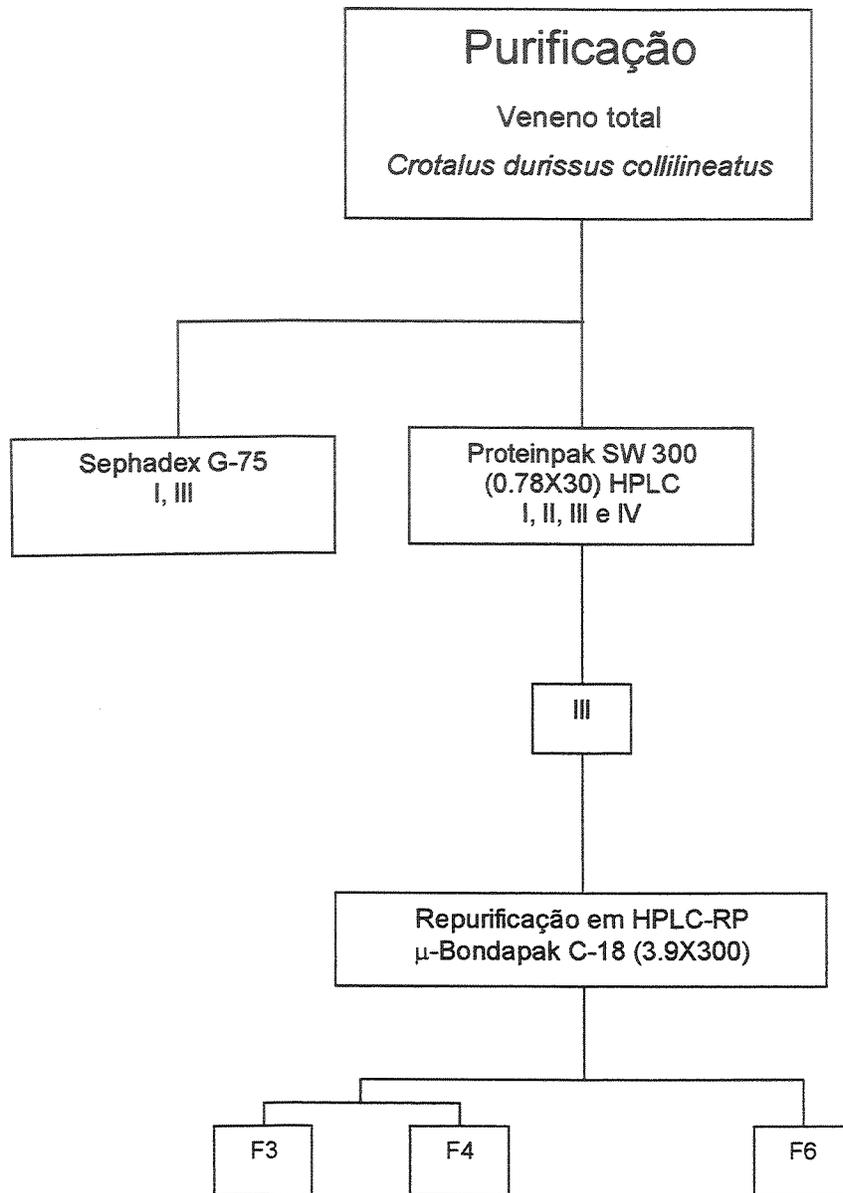
O registro da força de contração muscular, em resposta a estímulos foi realizado através de transdutor isométrico load bell BG 10GM, acoplado a um fisiógrafo Gold Universal Amplifier Model RS 3400. O músculo foi submetido à tensão constante de 5g/cm por meio de um fio preso à porção tendinosa ligado ao transdutor isométrico, sendo a estimulação indireta, com pulsos supramaximais, gerados por estimuladores S48F (Grass Instruments), de 0,2 ms de duração e 0,1 HZ de freqüência, durante 20 minutos para estabilização. Ao término do período de incubação foram aplicadas as amostras obtidas do fracionamento. Para cada experimento foram utilizados no mínimo 3 animais.

3.9 - Medida da atividade neurotóxica em músculo biventer cervicis de pintainho

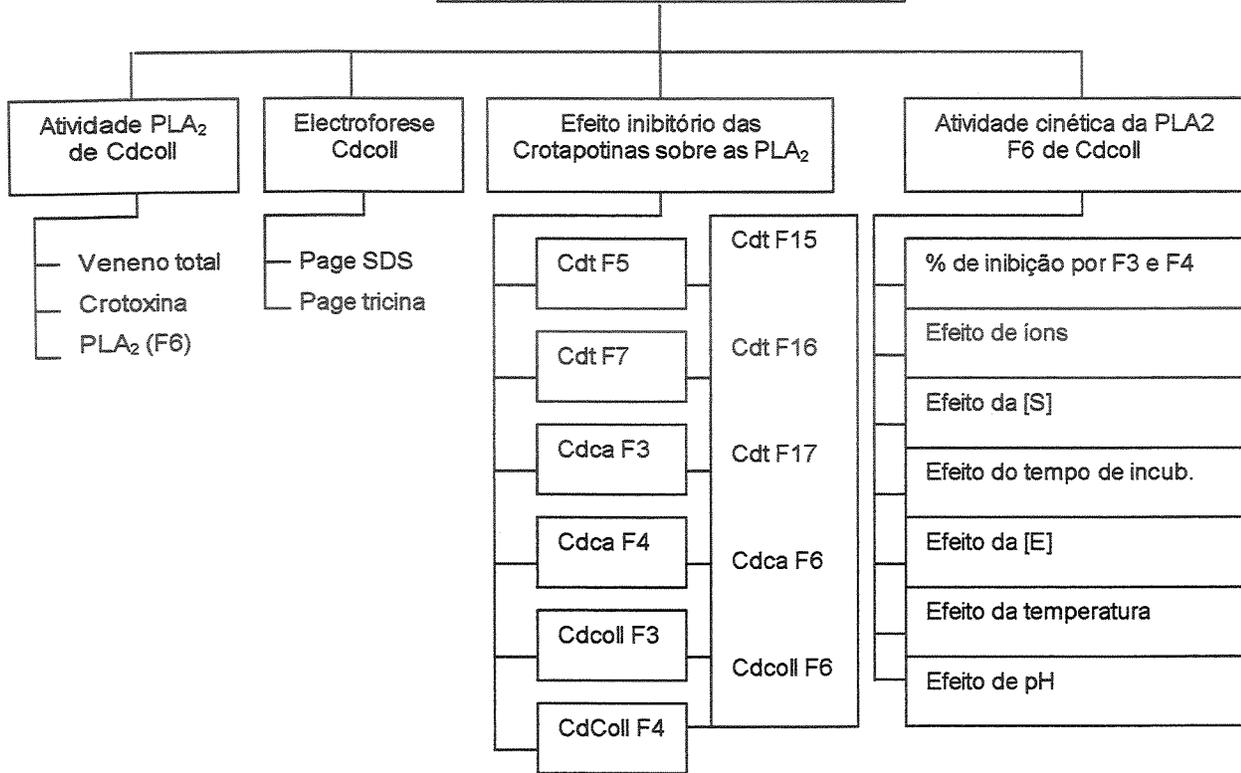
A preparação foi isolada e montada de acordo com o método de Ginsborg e Warriner (1960). Os pintainhos foram anestesiados com éter etílico e, após o isolamento, o músculo foi suspenso em uma cuba de 5 ml contendo solução nutritiva de Krebs com a seguinte composição em mM: NaCl 118,6; KCl 4,69; CaCl₂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

Foram aplicados pulsos supramaximais de 0,1 Hz de freqüência e 0,2 ms de duração (estimulador Grass S48). As contrações musculares resultantes de estímulos

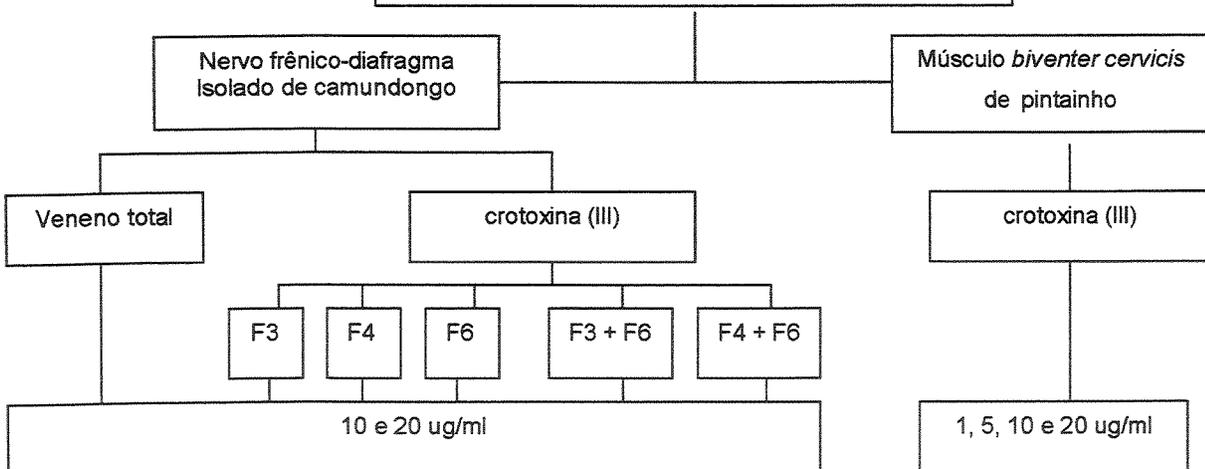
elétricos maximais e as contraturas em resposta à adição de KCl (13,4 mM) e ACh (14,6 μ M) foram registradas em fisiógrafo Gould RS 3400, por meio de transdutores isométricos Load Cell BG-10 GM. Os registros das contraturas para KCl e ACh foram realizados com ausência de estimulação elétrica, no início (antes da adição de veneno) e no final do experimento (após 120 min, de incubação com o veneno). As concentrações de crotoxina like utilizadas foram 1, 5, 10 e 20 μ g/ml.



**CARACTERIZAÇÃO
BIOQUÍMICA**



**CARACTERIZAÇÃO FARMACOLÓGICA
Junção Neuromuscular**



IV RESULTADOS

4.1 - Purificação do veneno total de *Crotalus durissus terrificus* (Cdt) e *Crotalus durissus collilineatus* (Cdcoll) em cromatografia de exclusão molecular em Sephadex G-75

O fracionamento do veneno total de Cdcoll em coluna Sephadex G-75 mostrou a presença de dois picos principais I e III (Fig. 1a). As atividades farmacológicas das frações I e III foram avaliadas e fração I apresenta atividade de convulsina caracterizada pelas convulsões e fração III apresenta atividade de crotoxina caracterizada pela parada respiratória por paralisia flácida do diafragma.

Este procedimento também foi adotado para a purificação do veneno total de Cdt. O perfil cromatográfico do veneno total de Cdt mostrou a eluição de 4 picos principais, que foram identificados como convulsina, giroxina, crotoxina (pico III) e Crotamina (pico IV). (Fig. 1b).

Ambas corridas foram realizadas sobre as mesmas condições cromatográficas permitindo correlacionar os resultados obtidos pelas duas cromatografias e mostrando que o pico III obtido da purificação do veneno total de Cdcoll foi similares a eluição do pico III de Cdt, ambos caracterizados como crotoxina.

4.2 - Cromatografia em HPLC (exclusão molecular e fase reversa).

O perfil cromatográfico proveniente da purificação dos venenos de Cdcoll e Cdt em coluna de exclusão molecular em HPLC, Protein Pack SW 300 (0,78X30cm) (Waters) mostra a presença de 4 picos denominados de (Cdcoll I, II, III e IV) e foram identificados como: Pico I convulsina, pico II giroxina, pico III crotoxina e pico IV como Inter-cro (Fig. 2a,b).

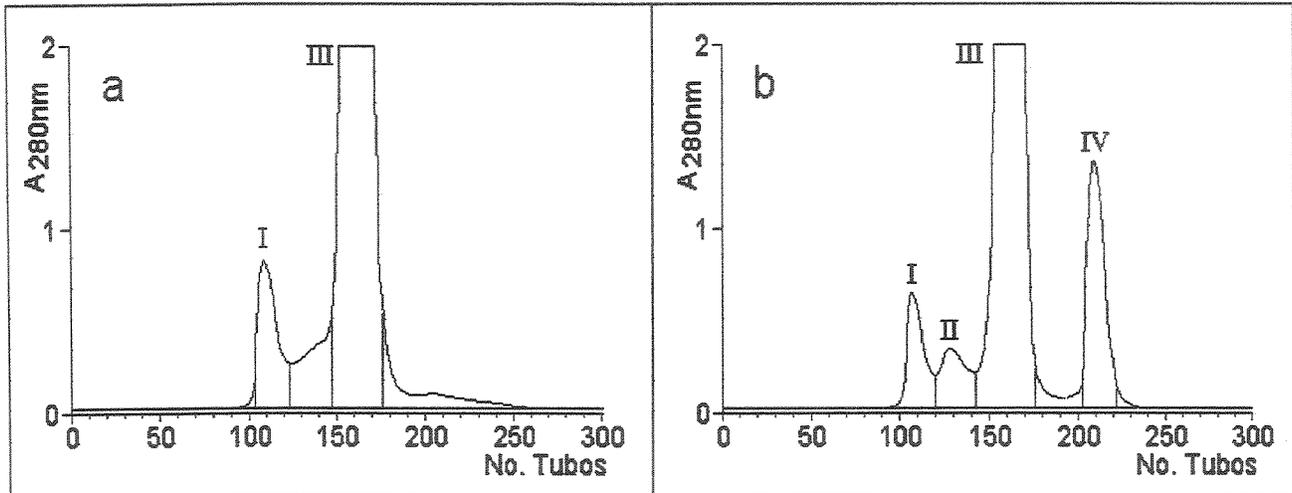


Figura 1. Cromatografia de exclusão molecular do veneno total de Cdcoll (a) e Cdt (b) 100 mg. De veneno total (Cdcoll e Cdt) foram aplicados em uma coluna de Sephadex G-75. A corrida foi realizada com tampão bicarbonato de amônio (0,1M. pH=7,8), a um fluxo constante 12ml/h.

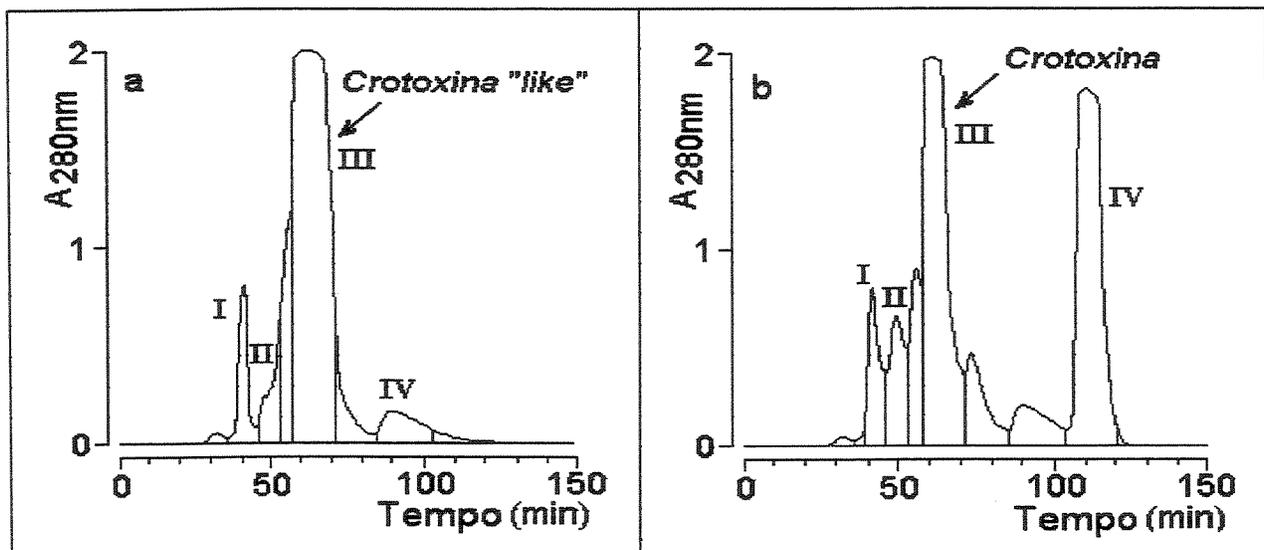


Figura 2. Cromatografia de exclusão molecular em HPLC, Protein Pack SW 300 (0,78 x 30cm Waters). 20 mg. do veneno total de Cdcoll (a) e Cdt (b) foram aplicados. A corrida foi realizada com tampão bicarbonato de amônio (0,1M. pH=7,9), a um fluxo constante 0,2 ml/min. monitorado a uma absorvância de 280 nm.

A figura 3 mostra os perfis cromatográficos das crotoxinas de Cdcoll e Cdt em uma coluna μ -Boundapak C-18 0,78 X 30 cm preparativa, acoplada a um sistema de HPLC de Fase Reversa - PDA 991 (Waters). A fração de crotoxina (III), previamente obtida em coluna de exclusão molecular em HPLC mostra similaridades, mas a eluição dos picos indica uma heterogeneidade e diferenças entre as crotopotinas e PLA₂ de ambas serpentes.

As crotopotinas de Cdcoll F3 e F4 foram eluídas em 41 e 46% do solvente B, de modo que a PLA₂ F6 foi eluída em 55% do solvente B. As crotopotinas de Cdt F5 e F7 foram eluídas em 45 e 47,5 do solvente B; e as PLA₂ F15, F16 e F17 foram eluídas em 54, 56 e 57% do solvente B, respectivamente.

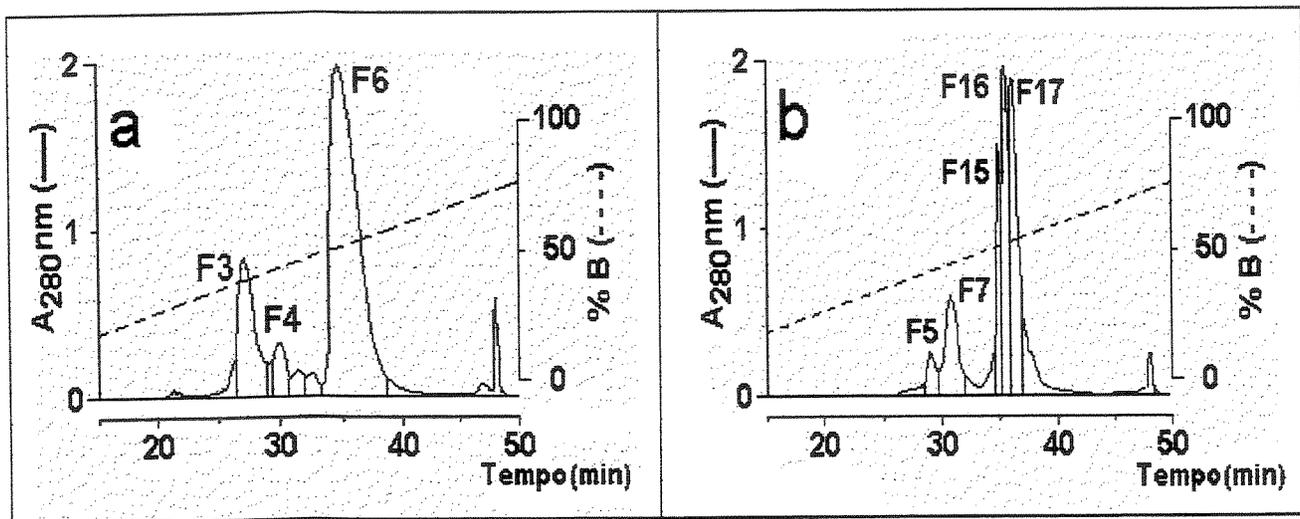


Figura 3. Cromatografia da crotoxina (fração III), em HPLC-FR em uma coluna μ -Boundapak C-18 (0,78 X 30 cm preparativa Waters) equilibrada com ácido trifluoroacético 0,1%, pH 3,5 (Tampão A) e eluída com um gradiente linear de acetonitrila 66% (Tampão B). a) O perfil de crotoxina de Cdcoll onde temos F3 e F4 (crotopotina) e F6 (PLA₂). b) O perfil crotoxina purificada de Cdt, F5 e F6 como crotopotina e F15, F16 e F17 como isoformas de PLA₂.

4.3 - Eletroforeses em gel de poliacrilamida SDS-PAGE.

O perfil massa molecular em PAGE-SDS, de veneno total, crotoxina, crotopotina e PLA₂ de Cdcoll está mostrado na (Fig.4a), onde a crotoxina de Cdcoll apresenta uma massa molecular de 24 kDa, além de mostrar a presença de duas frações majoritárias, uma de 14 kDa e a outra de 10 kDa unidas por interações não covalentes.

Em relação as PLA₂ a eletroforese em gel de Tricina (Fig. 4b) mostra a presença de uma única banda de 15 kDa, demonstrando alta homogeneidade molecular. As crotopotinas (F3, F4) mostram uma única banda de 9kDa (Fig. 4b).

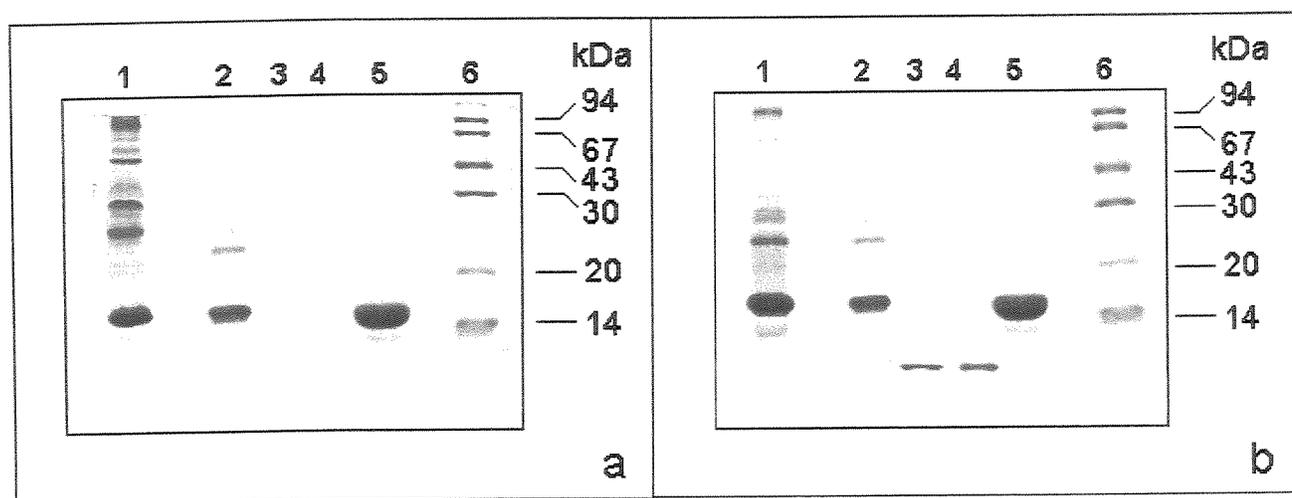


Figura 4. 4a Eletroforese em gel de poliacrilamida 12,5% (M/V). 1: veneno total de Cdcoll; em 2: crotoxina; em 3 e 4 crotopotinas: F3; e F4; em 5: F6 (PLA₂); em 6 marcadores de massa molecular. 4b Eletroforese em gel de Tricina (16,5%) em SDS-PAGE, corado com comassie blue. Pista 1: veneno total de Cdcoll; em 2: crotoxina; em 3 e 4 crotopotinas: F3; e F4; em 5: F6 (PLA₂); em 6 marcadores de massa molecular.

4.4 - Determinação e comparação da atividade fosfolipásica de PLA₂ de Cdcoll, Cdcas e Cdt.

A medida da atividade PLA₂ para o veneno total foi de: Cdcoll 0,7482 nmoles/min/mg. ; Cdcas 1,4362 nmoles/min/mg. e Cdt 1,5337 nmoles/min/mg. No caso das crotoxinas foram: Cdcoll 2,4338 nmoles/min/mg.; Cdcasca 2,0124 nmoles/min/mg. e Cdt 2,5671 nmoles/min/mg(Fig.5a).

A ordem na atividade fosfolipásica para as PLA₂ isoladas da maior para a menor foi de: Cdcoll (F6) 9,87 nmoles/min/mg., Cdt (F15) 9,40 nmoles/min/mg, Cdcas (F6) 9,26 nmoles/min/mg, Cdt (F16) 9,10 nmoles/min/mg e finalmente Cdt (F17) 7,84 nmoles/min/mg (Fig. 5b).

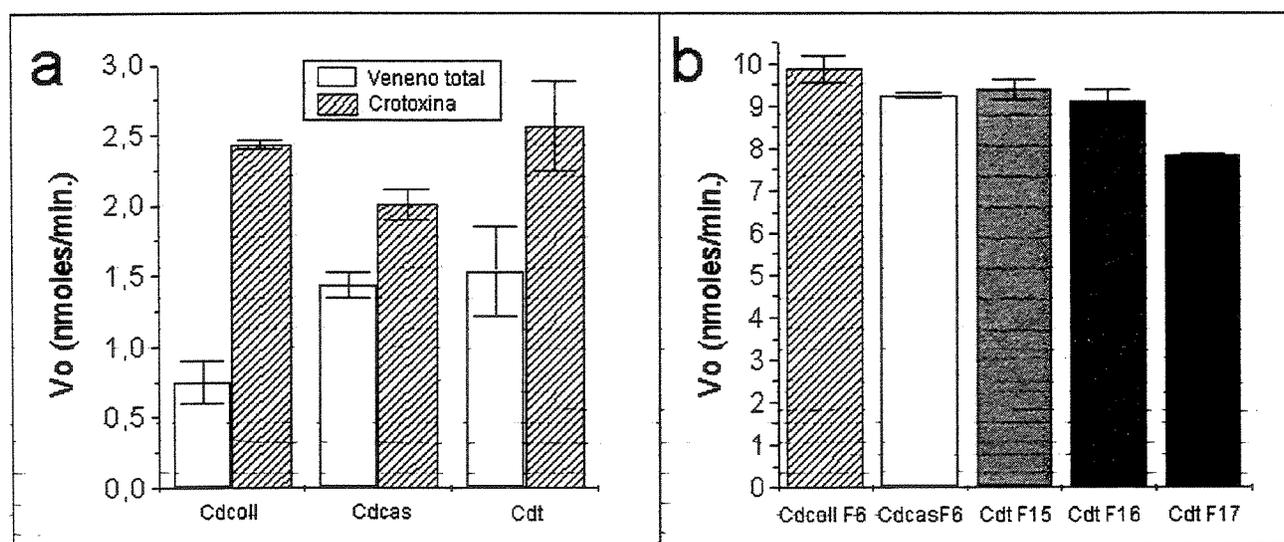


Figura 5. a) Atividade PLA₂ proveniente de veneno total e crotoxina de Cdcoll, Cdcasca e Cdt, b) Atividade das PLA₂ isoladas provenientes de Cdcoll, Cdcas, e Cdt; (CdcollF6, CdcasF6, CdtF15, CdtF16 e CdtF17).

4.5 - Determinação e comparação da atividade inibitória das crotapotinas sobre a atividade fosfolipásica de PLA₂ de Cdcoll, Cdcas e Cdt.

A inibição da atividade fosfolipásica pelas crotapotinas foi determinada incubando as duas proteínas na razão molar de 1:1, por 20 min a 37°C e medindo a atividade enzimática residual pelo mesmo método descrito em 3.6. A concentração usada para as PLA₂ foi de 0,02 mg/ml e para as crotapotinas foram 0,03 mg/ml.

4.5.1 - Atividade inibitória das crotapotinas CdcollF3, CdcollF4, CdtF5, CdtF7, CdcasF3 e CdcasF4 sobre a atividade PLA₂ de CdcollF6

A porcentagem da inibição sobre a PLA₂ de CdcollF6, foi superior à 50% por ação das crotapotinas das três sub espécies, sendo que a crotapotina CdcollF3 apresentou maior efeito inibitório 89,96% ± 0,02 (Fig. 6).

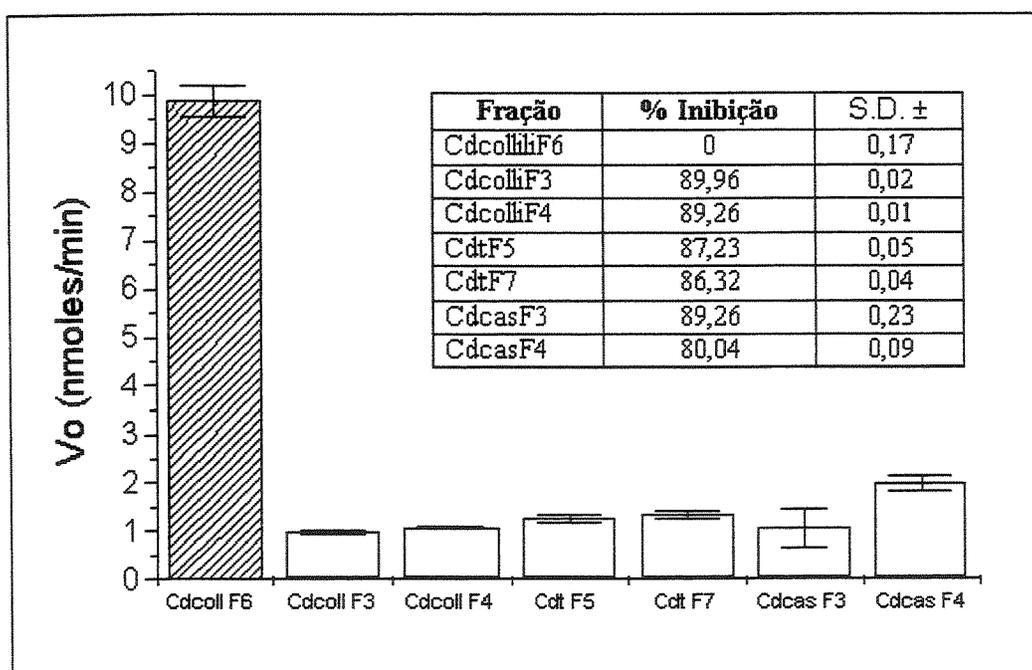


Figura 6. Inibição da PLA₂ CdcollF6 pelas isoformas das crotapotinas de Cdcoll, (CdcollF3 e CdcollF4); Cdcas (CdcasF3 e CdcasF4) e Cdt (CdtF5 e CdtF7).

4.5.2 - Atividade inibitória das crotapotinas CdcollF3, CdcollF4, CdtF5, CdtF7, CdcasF3 e CdcasF4 sobre a atividade PLA₂ de CdcasF6

A porcentagem da inibição sobre a PLA₂ de Cdcas F6 foi superior ao 50% por ação das crotapotinas das três sub espécies, sendo que a crotapotina CdcollF3 a que mostrou a maior porcentagem de inibição $89,30\% \pm 0,02$. (Fig. 7).

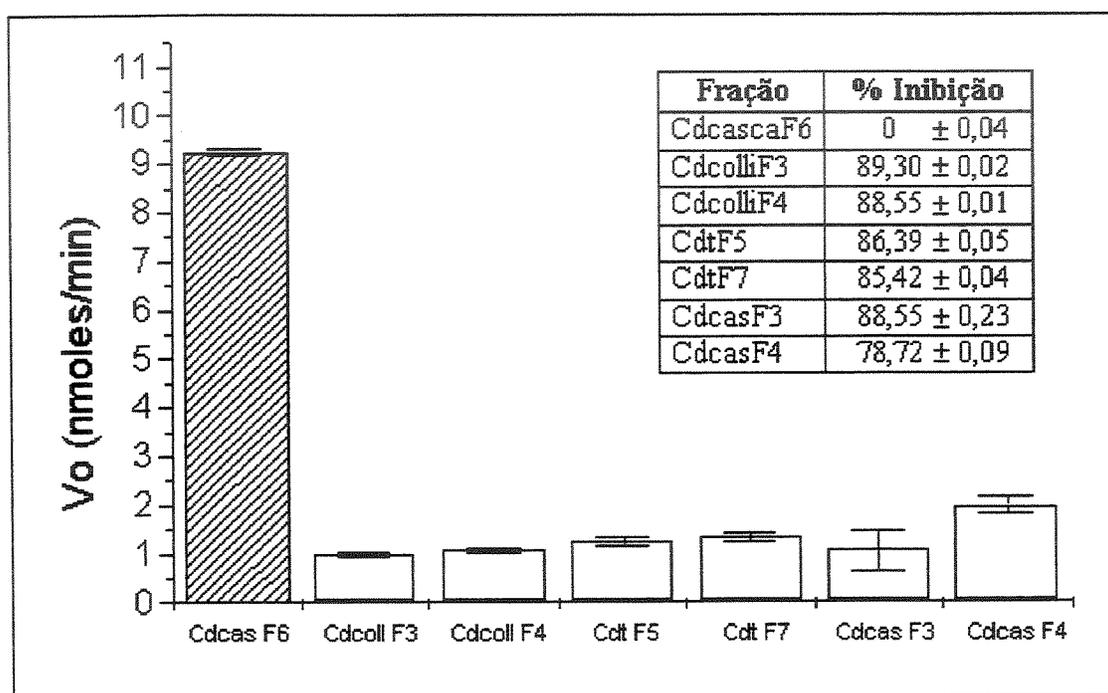


Figura 7. Inibição da PLA₂ Cdcas F6 pelas isoformas das crotapotinas de Cdcoll, (CdcollF3 e CdcollF4); Cdcas (CdcasF3 e CdcasF4) e Cdt (CdtF5 e CdtF7).

4.5.3 - Atividade inibitória das crotapotinas CdcollF3, CdcollF4, CdtF5, CdtF7, CdcasF3 e CdcasF4 sobre a atividade PLA₂ de CdtF15

A porcentagem da inibição sobre a PLA₂ de CdtF15, foi superior ao 50% por ação das crotapotinas das três sub espécies, sendo que a crotapotina CdcollF3 a que exibiu a maior porcentagem de inibição $92,97\% \pm 0,08$. (Fig. 8).

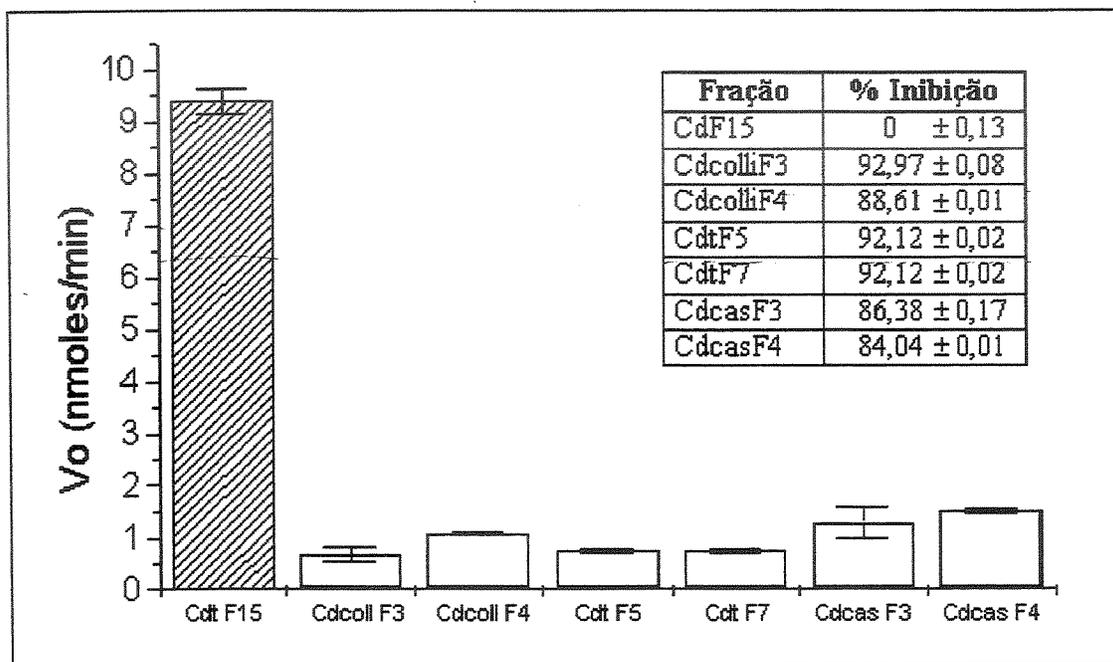


Figura 8. Inibição da PLA₂ Cdt F15 pelas isoformas das crotapotinas de Cdcoll, (CdcollF3 e CdcollF4); Cdcas (CdcasF3 e CdcasF4) e Cdt (CdtF5 e CdtF7).

4.5.4 - Atividade inibitória das crotopotinas CdcollF3, CdcollF4, CdtF5, CdtF7, CdcasF3 e CdcasF4 sobre a atividade PLA₂ de CdtF16.

A porcentagem da inibição sobre a PLA₂ de CdtF16, foi superior ao 50% por ação das crotopotinas das três sub espécies, sendo que a crotopotina CdcollF3 a que teve maior porcentagem de inibição $85,38\% \pm 0,01$. (Fig. 9).

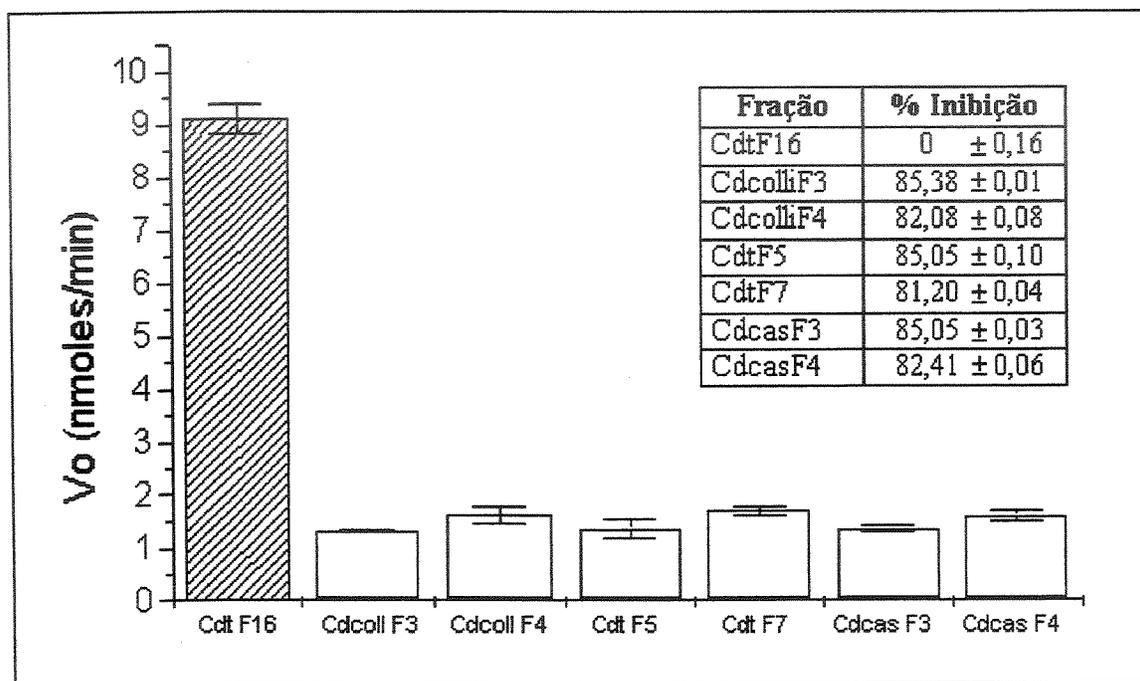


Figura 9. Inibição da PLA₂ Cdt F16 pelas isoformas das crotopotinas de Cdcoll, (CdcollF3 e CdcollF4); Cdcas (CdcasF3 e CdcasF4) e Cdt (CdtF5 e CdtF7).

4.5.5 - Atividade inibitória das crotapotinas CdcollF3, CdcollF4, CdtF5, CdtF7, CdcasF3 e CdcasF4 sobre a atividade PLA₂ de CdtF17

A porcentagem da inibição sobre a PLA₂ de CdtF17, foi superior ao 50% por ação das crotapotinas das três sub espécies, sendo que a crotapotina CdcollF3 a que teve maior porcentagem de inibição 82,88% \pm 0,03. (Fig 10).

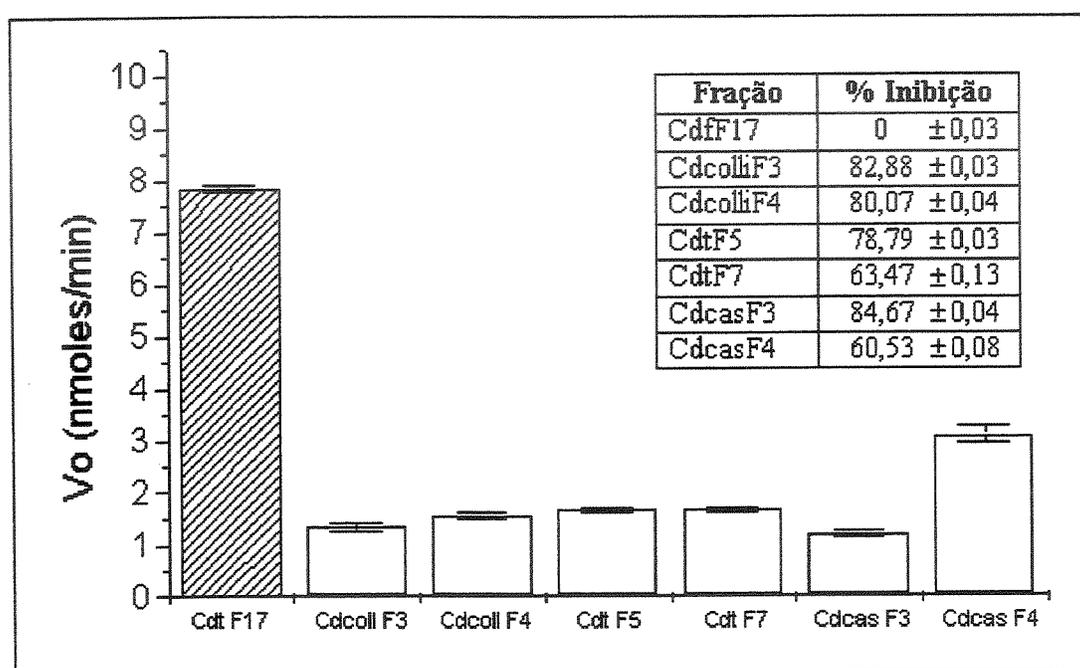


Figura 10. Inibição da PLA₂ Cdt F17 pelas isoformas das crotapotinas de Cdcoll, (CdcollF3 e CdcollF4); Cdcasca (CdcasF3 e CdcasF4) e Cdt (CdtF5 e CdtF7).

A inibição das PLA₂ isoladas das três sub-espécies foi superior ao 50% para todos os casos, correspondendo a maior porcentagem de inibição a isoforma CdcollF3 de Cdcoll sobre a isoforma de CdtF15 de Cdt. (Fig. 8).

4.6. Estudos Cinéticos da PLA₂ de Cdcoll

4.6.1 - Efeito do Tempo de reação e concentração da PLA₂

A atividade enzimática foi determinada nas condições de ensaio descritas no método 3.6, com exceção do tempo de incubação que teve uma variação de 10 a 40 minutos. A cada dez minutos foi feita a leitura e observou-se um tempo de incubação ótimo de aproximadamente 20 minutos, segundo a linearidade da reta.

As concentrações das frações foram variadas até uma concentração em que se pôde ter uma absorbância a 425 nm. A atividade fosfolipásica foi observada em uma concentração mínima de 24 µg/ml. Resultados não mostrados.

4.6.2 - Efeito do pH na atividade da PLA₂

O pH ótimo da PLA₂ foi determinado, incubando a enzima em diferentes valores de pHs [4-10], sendo feito um controle para cada pH, e o pH ótimo registrado foi de 8.3 (Fig. 11a).

4.6.3 - Efeito da Temperatura na Atividade da PLA₂

O efeito da temperatura na atividade da PLA₂ foi determinado incubando em diferentes temperaturas (30-50°C). A atividade da enzima a 37°C foi considerado 100%. (Fig.11b).

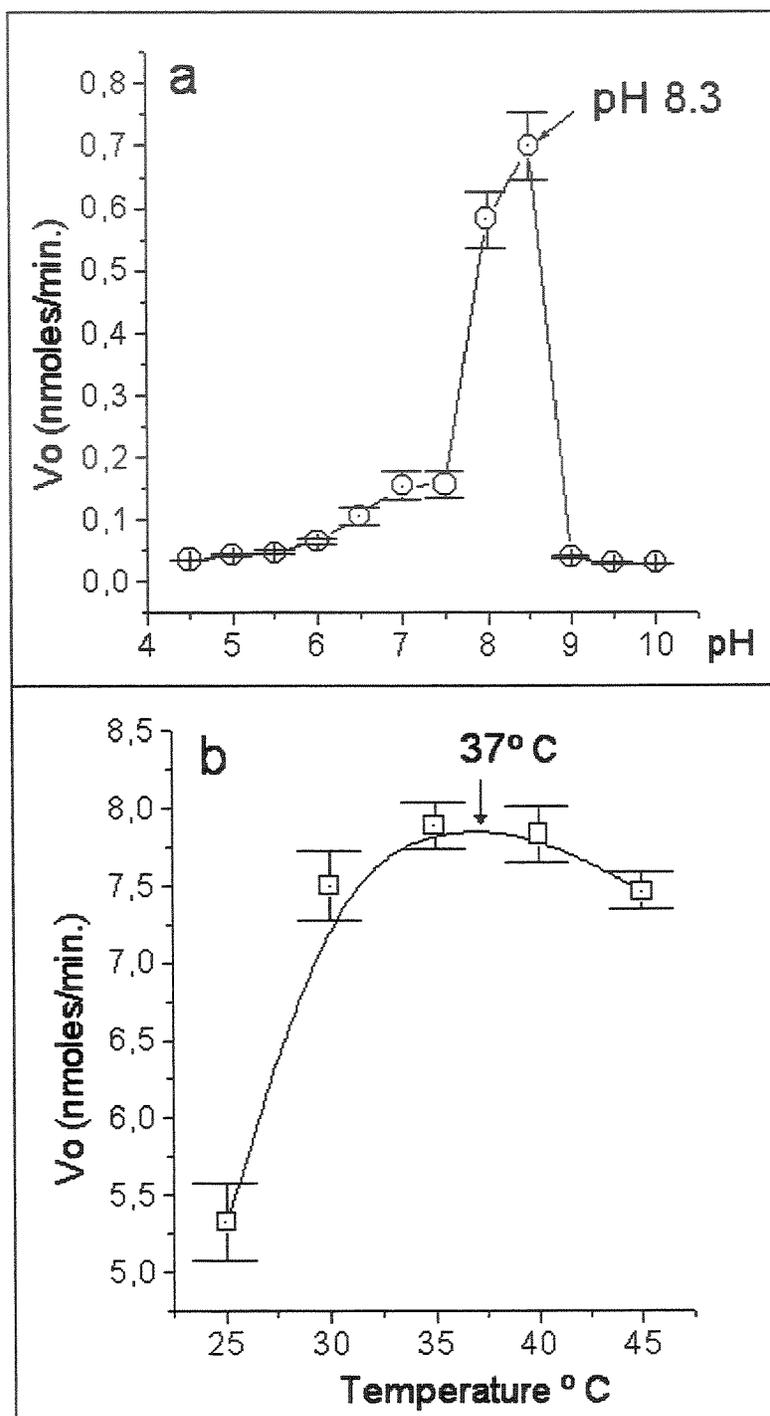


Figura 11. a) Efeito de diferentes pHs e b) Efeito da temperatura; na atividade PLA₂ de Cdcoll.

4.6.4 - Efeito da concentração de substrato na atividade PLA₂

Os resultados em nossas condições experimentais mostram que a PLA₂ de Cdcoll tem um comportamento tipo alostérico detalhamento ampliado na figura inserida (Fig. 12a).

4.6.5 - Efeito de alguns íons na atividade PLA₂

A atividade da PLA₂ foi determinada na presença de alguns íons tais como Mn²⁺, Mg²⁺, Zn²⁺, e Cu²⁺ (10mM), na presença de Ca²⁺ (1mM). Sendo que a atividade normal foi feita com Ca²⁺ 10mM.

A atividade PLA₂ frente aos íons Mn²⁺ e Mg²⁺ (10 mM) na presença de Ca²⁺ (1mM) foi; 6,33 nmoles/min e 5,97 nmoles/min. A presença de cálcio aumenta ligeiramente a atividade Mn²⁺ e Mg²⁺ (10 mM), e no caso dos íons Zn²⁺ e Cu²⁺ (10 mM), na presença de Ca²⁺ (1mM), observa-se uma marcada diminuição 1,33 nmoles/min/mg e 2,25 nmoles/min/mg. A substituição Ca²⁺ por Mg²⁺ e Cu²⁺ levou a uma redução considerável da atividade, 0,63 nmoles/min e 1,83 nmoles/min, níveis similares na ausência total de Ca²⁺ 0,5 nmoles/min (Fig. 12b).

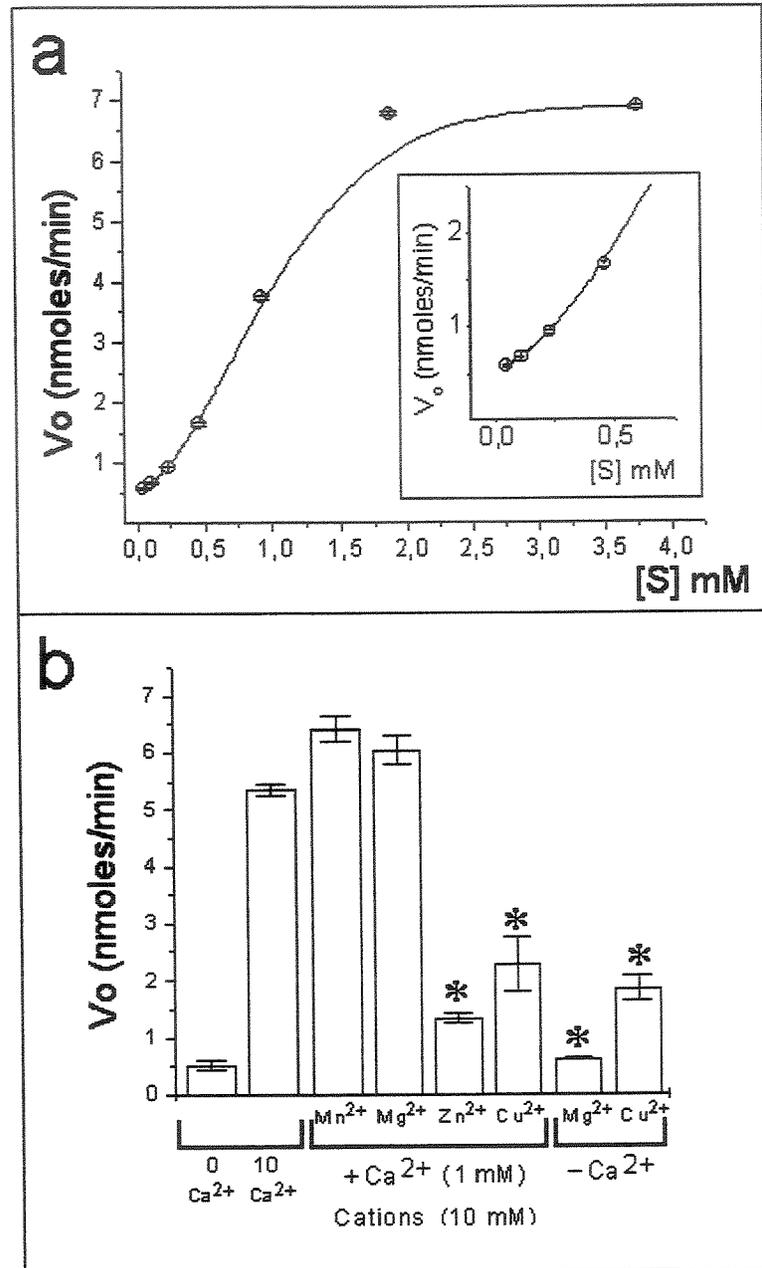


Figura 12. a) Efeito da concentração de substrato e b) Efeito de alguns íons metálicos na presença e ausência de cálcio, na atividade PLA $_2$ de Cdcoll.

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

4.7.1 - Registro miográfico do efeito do veneno total e crotoxina de Cdcoll

As doses ensaiadas foram 10 e 20 $\mu\text{g/ml}$ conforme a Figura 13a. Os resultados do veneno total evidenciaram que o efeito pré-sináptico decorrente da ligeira facilitação inicial da liberação de acetilcolina traduzido pelo aumento da amplitude da contração muscular, precede o bloqueio neuromuscular que é dose-dependente e irreversível. O bloqueio neuromuscular ocorre principalmente ao nível pré-sináptico pela inibição da liberação de acetilcolina. A medida da liberação quântica de acetilcolina mostra que a liberação do neurotransmissor está diminuída.

O tempo necessário para se obter um bloqueio de 50% (10 $\mu\text{g/ml}$) foi de $73,73 \pm 12,50$ min. e para a dose de 20 $\mu\text{g/ml}$ foi $61,65 \pm 7,24$ min. As figuras 13b, c, d, e, mostram os registros da resposta contrátil com uma ligeira facilitação, seguida de um bloqueio da transmissão neuromuscular.

Com a crotoxina de Cdcoll procedente da purificação por exclusão molecular em HPLC em uma coluna Protein Pack SW300 (0,78 X 30 cm Waters), todos os ensaios foram realizados nas doses de 10 e 20 $\mu\text{g/ml}$ conforme mostrado na figura 13a, tanto na dose de 10 como na de 20, a crotoxina like de Cdcoll, mostrou o mesmo efeito de bloqueio com a diferença de que na dose de 20 evidenciou-se uma discreta facilitação da transmissão neuromuscular. O tempo de bloqueio de 50% foi de $82,24 \pm 12$ e $74,19 \pm 18$ min. para as doses de 10 e 20 $\mu\text{g/ml}$. para a crotoxina de Cdcoll respectivamente.

Ambos causaram bloqueio irreversíveis pós-lavagem como se observa nos registros miográficos da figura 13b, c e 14a e b.

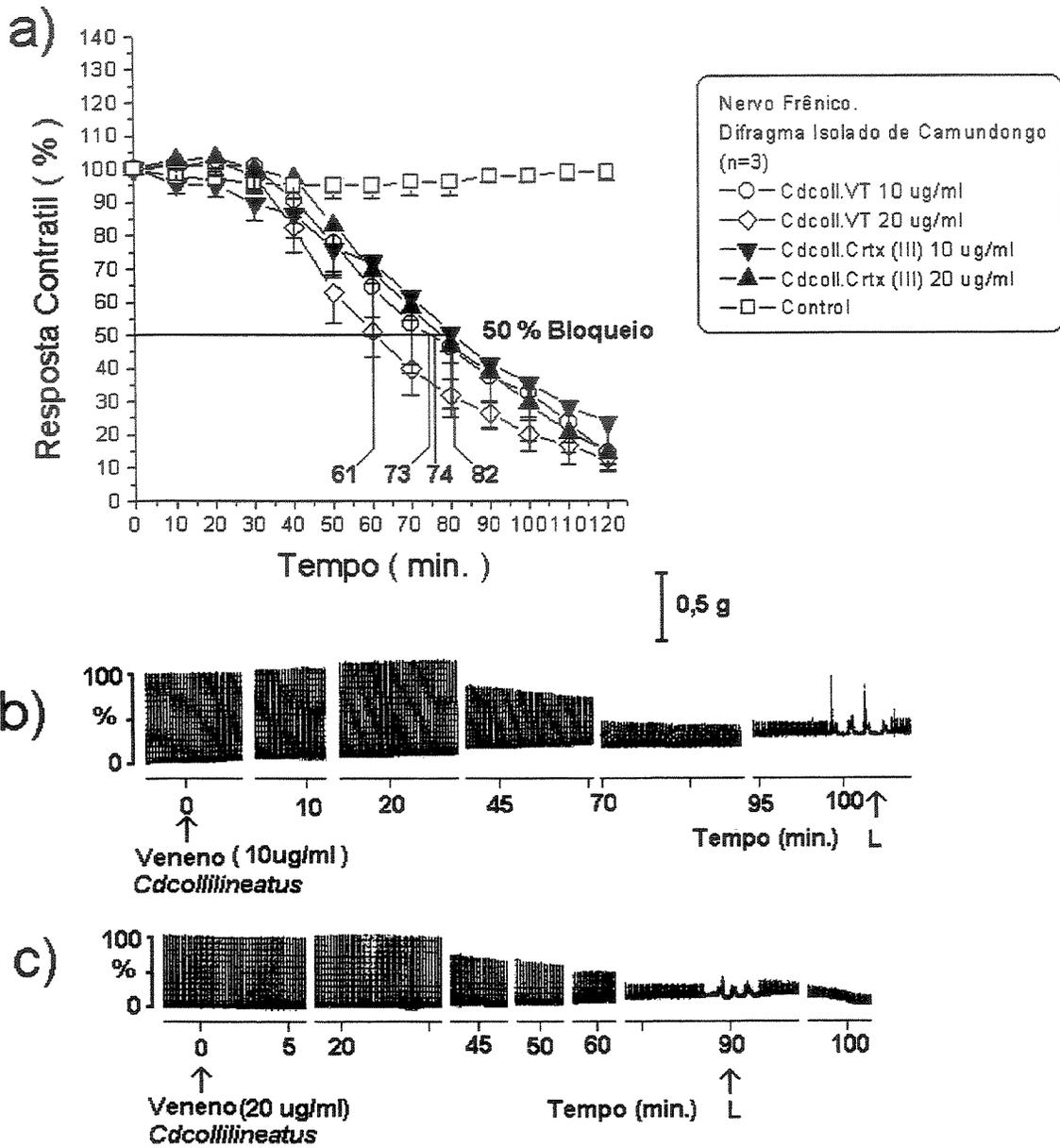


Figura 13. Bloqueio da Resposta Contrátil em Preparação NF-DIC (Estímulo indireto). O bloqueio neuromuscular é dose-tempo-dependente. Cada ponto corresponde à média \pm erro padrão de 3 experimentos. a) representação gráfica do 50% do bloqueio de veneno total e crotoxina de *Cdcoll* nas doses de 10 e 20 $\mu\text{g/ml}$. b e c) registro miográfico de veneno total dose de 10 e 20 $\mu\text{g/ml}$ \uparrow adição da mostra L lavagem.

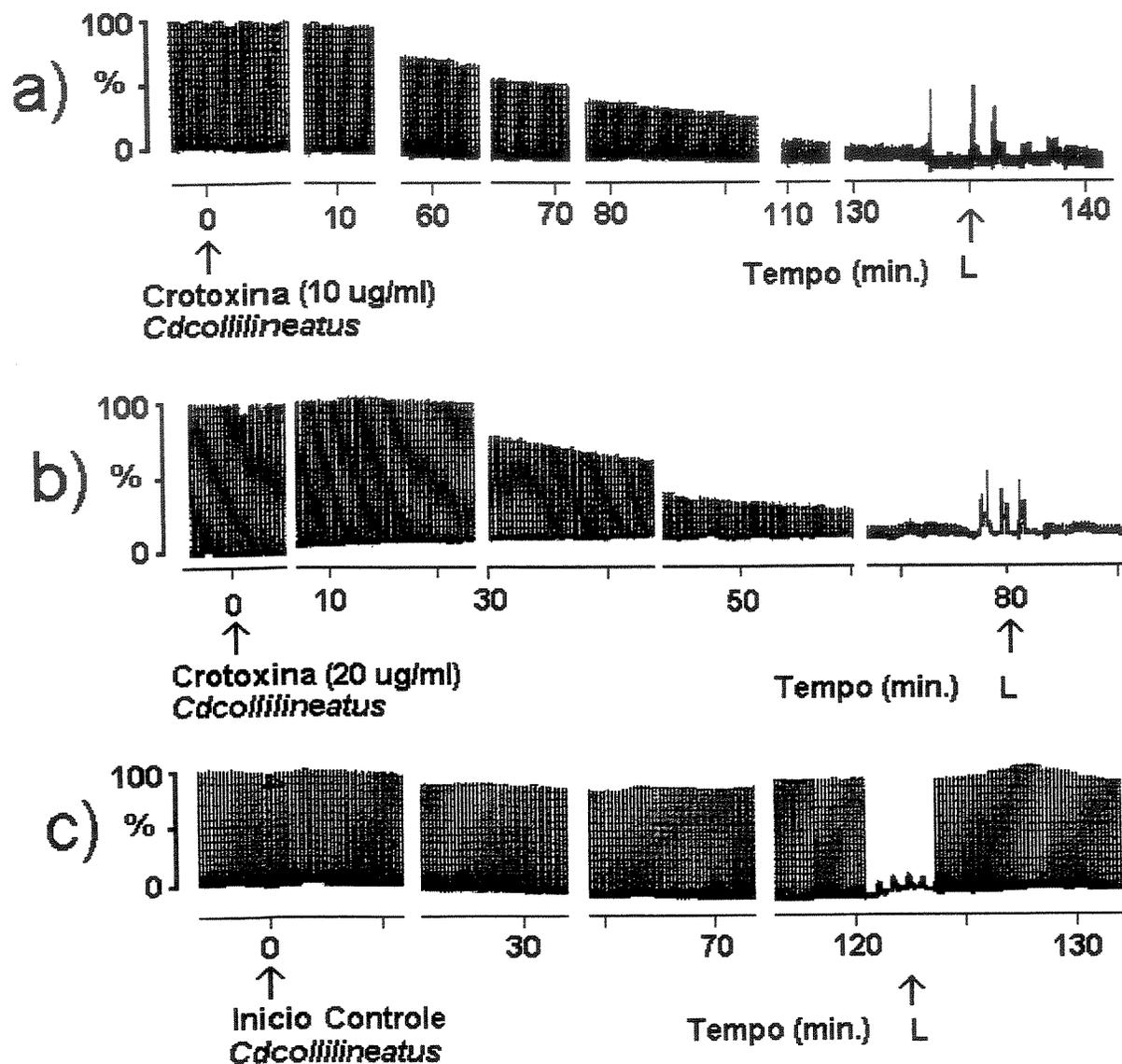


Figura 14. Registros da força de Contração Muscular em Preparação NF-DIC (Estímulo indirecto). a e b ilustram o perfil miográfico dos efeitos da a crotoxina de *Cdcolli* nas doses de 10 e 20 $\mu\text{g/ml}$ demonstrando o bloqueio. No controle \uparrow adição da mostra L lavagem.

4.7.2 - Registros miográficos do efeito das isoformas de crotapotina (F3 e F4) e da fração PLA₂ (F6) isoladas a partir da crotoxina de Cdcoll.

As doses ensaiadas foram 10 e 20 µg/ml conforme a figura 15 e 16. Os resultados mostram a ausência do efeito neurotóxico das isoformas de crotapotina (F3 e F4) assim como da PLA₂ (F6), em ambas doses. Não se observou qualquer mudança na amplitude da resposta contrátil, ao longo dos 120 minutos do experimento.

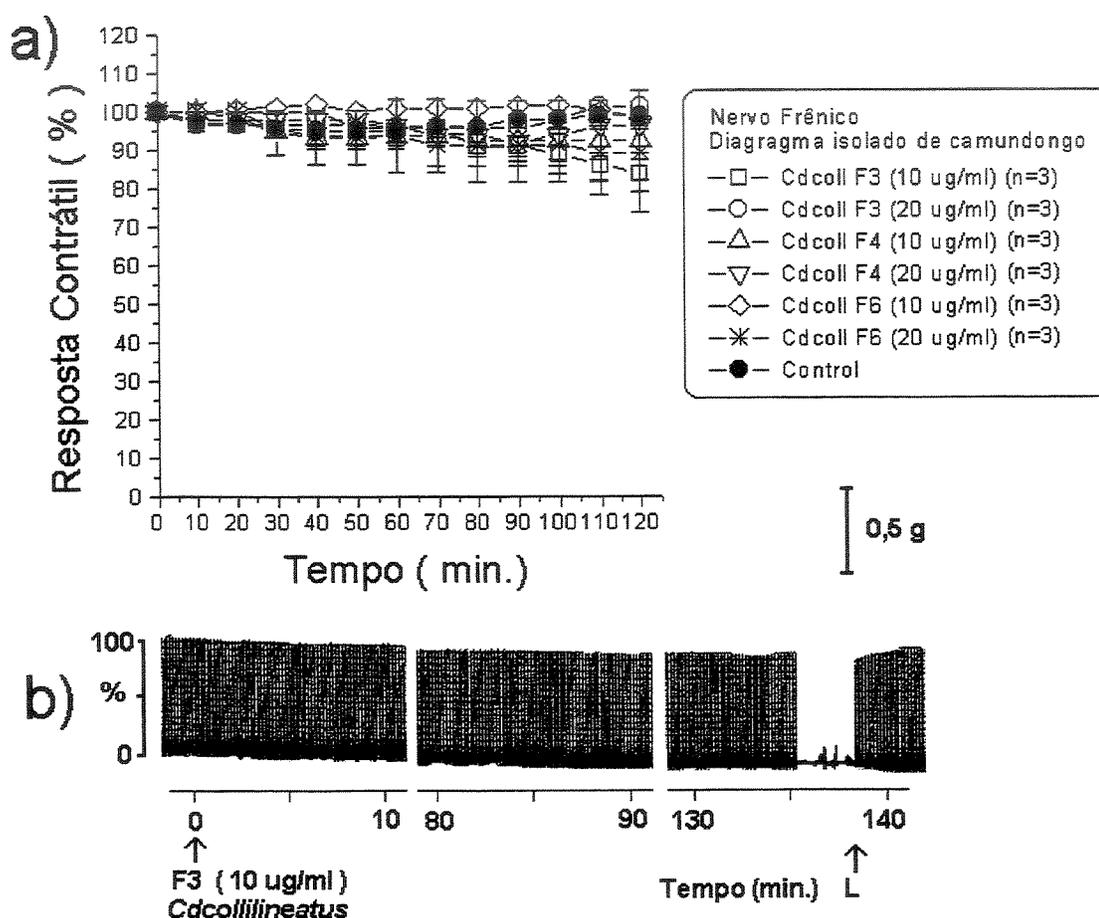


Figura 15. Efeito das isoformas de crotapotina (F3 e F4) e PLA₂ (F6) da crotoxina like de Cdcoll isoladas sobre a preparação NF-DIC. (Estimulação indireta) na representação gráfica da ausência do efeito neurotóxico, em b registro miográfico da isoforma de crotapotina F3 isolada, cada ponto corresponde à média ± erro padrão de 3 experimentos. ↑ adição da mostra L lavagem.

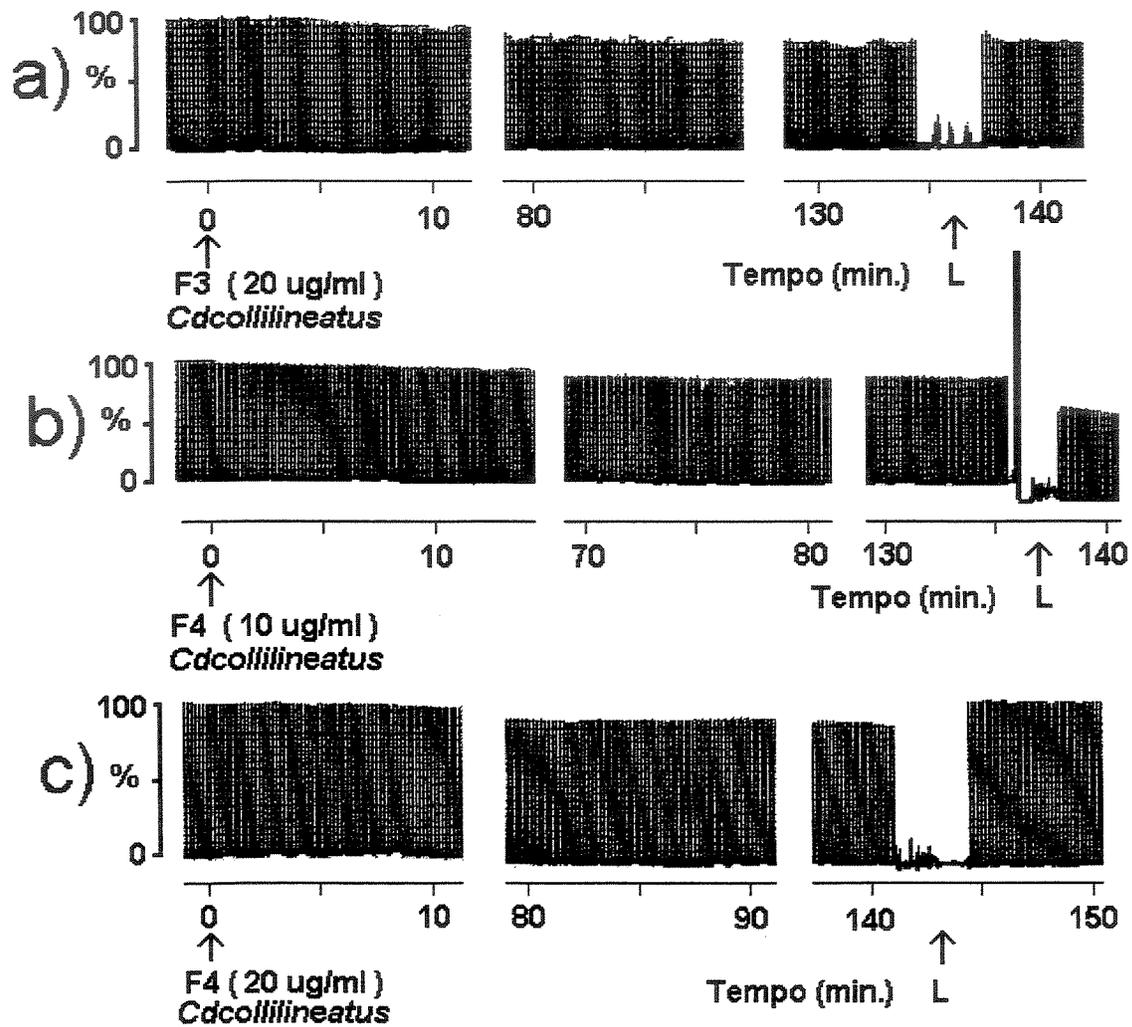


Figura 16. Registros da força de Contração Muscular em Preparação NF-DIC (estímulo indireto). Em a, b, e c ilustram o perfil miográfico dos efeitos das frações isoladas das isoformas de crotafotina (F3 e F4) nas doses de 10 e 20 $\mu\text{g/ml}$ demonstrando a ausência do bloqueio. \uparrow adição da mostra L lavagem.

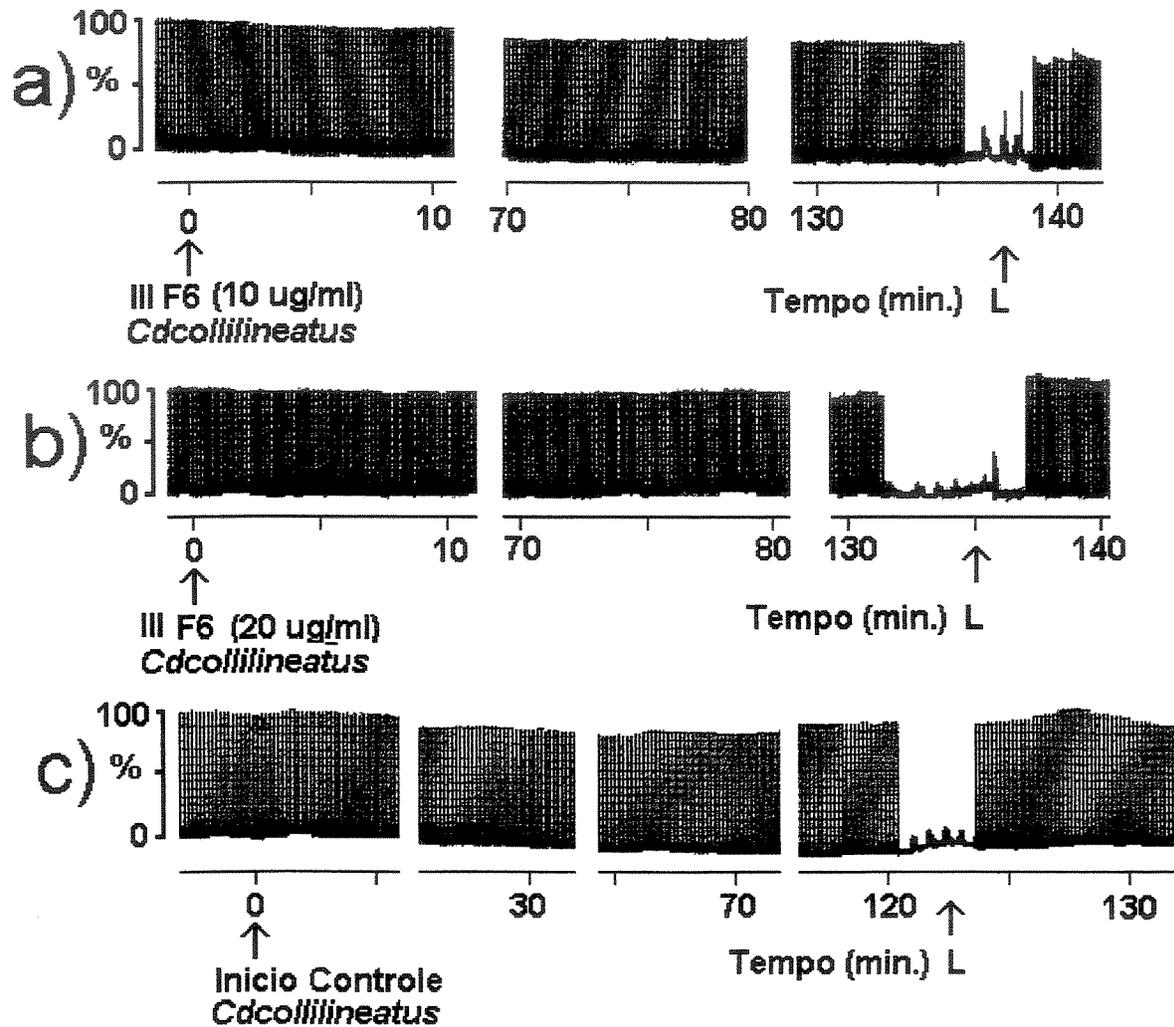


Figura 17. Registros da força de Contração Muscular em Preparação NF-DIC (estímulo indireto). Em a, e b ilustram o perfil miográfico dos efeitos das frações isoladas da crotoxina de *Cdcolliineatus* (F6) nas doses de 10 e 20 µg/ml demonstrando a ausência do bloqueio. Em c controle ↑ adição da mostra L lavagem.

4.7.3 - Registros miográficos das frações re-associadas F3 + F6 e F4 + F6 isoladas a partir da crotoxina de Cdcoll.

As doses ensaiadas foram 10 e 20 $\mu\text{g/ml}$ na razão molar 1:1 conforme a figura 18, 19 e 20. Os resultados evidenciam o efeito neurotóxico da crotoxina a partir da reassociação de suas frações isoladas de crotapotina (isoformas) F3 e F4 com a PLA_2 (F6).

A reassociações F4 + F6 (10 $\mu\text{g/ml}$) mostrou uma ligeira facilitação da ordem de 30% procedendo ao bloqueio da resposta contrátil. A reassociação F3 + F6 (10 $\mu\text{g/ml}$) (Fig. 18) não mostrou efeito facilitatório mas determinou 50% de bloqueio em quase a metade do tempo ($49,76 \pm 6$ min.) quando comparada com F4 + F6 (10 $\mu\text{g/ml}$).

O tempo necessário para se obter um bloqueio de 50% (10 $\mu\text{g/ml}$) para F4 + F6 foi $82,1 \pm 10,78$ min e (20 $\mu\text{g/ml}$) foi $44,00 \pm 1,28$ min (Fig. 18). Também mostrou um bloqueio irreversível da resposta contrátil pós-lavagem (Fig. 20a e b)

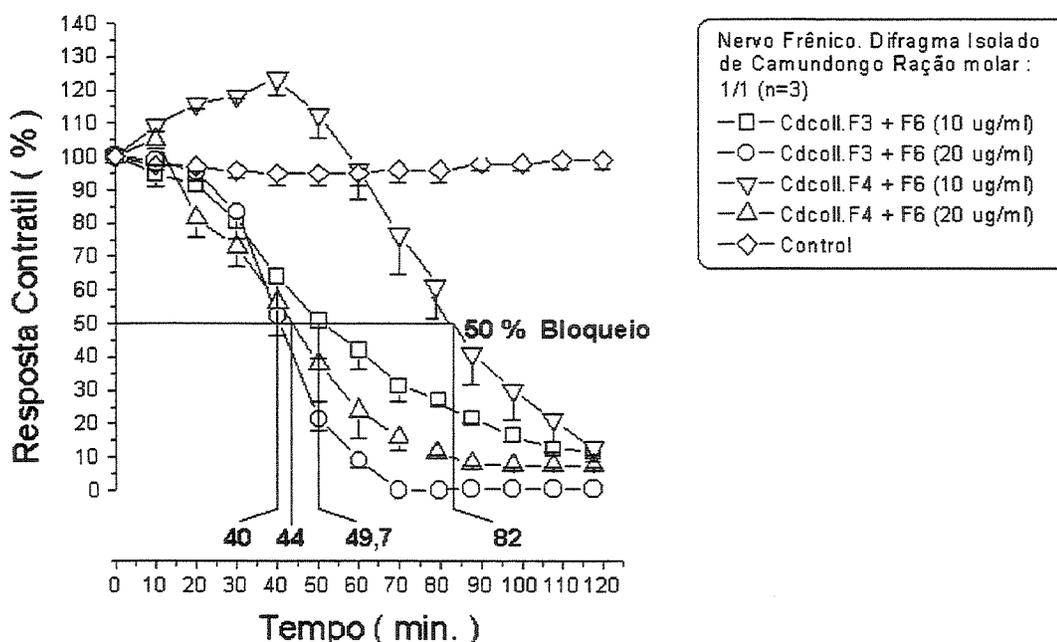


Figura18. Representação gráfica do bloqueio da Resposta Contrátil em Preparação NF-DIC (Estímulo indireto). O bloqueio neuromuscular é tempo-dose-dependentes. Cada ponto corresponde à média \pm erro padrão de 3 experimentos. Representação gráfica do 50% do bloqueio das recombinações das isoformas de crotapotina (F3 e F4) e a PLA_2 (F6) de Cdcoll na dose de 10 e 20 $\mu\text{g/ml}$. \uparrow adição da mostra L lavagem.

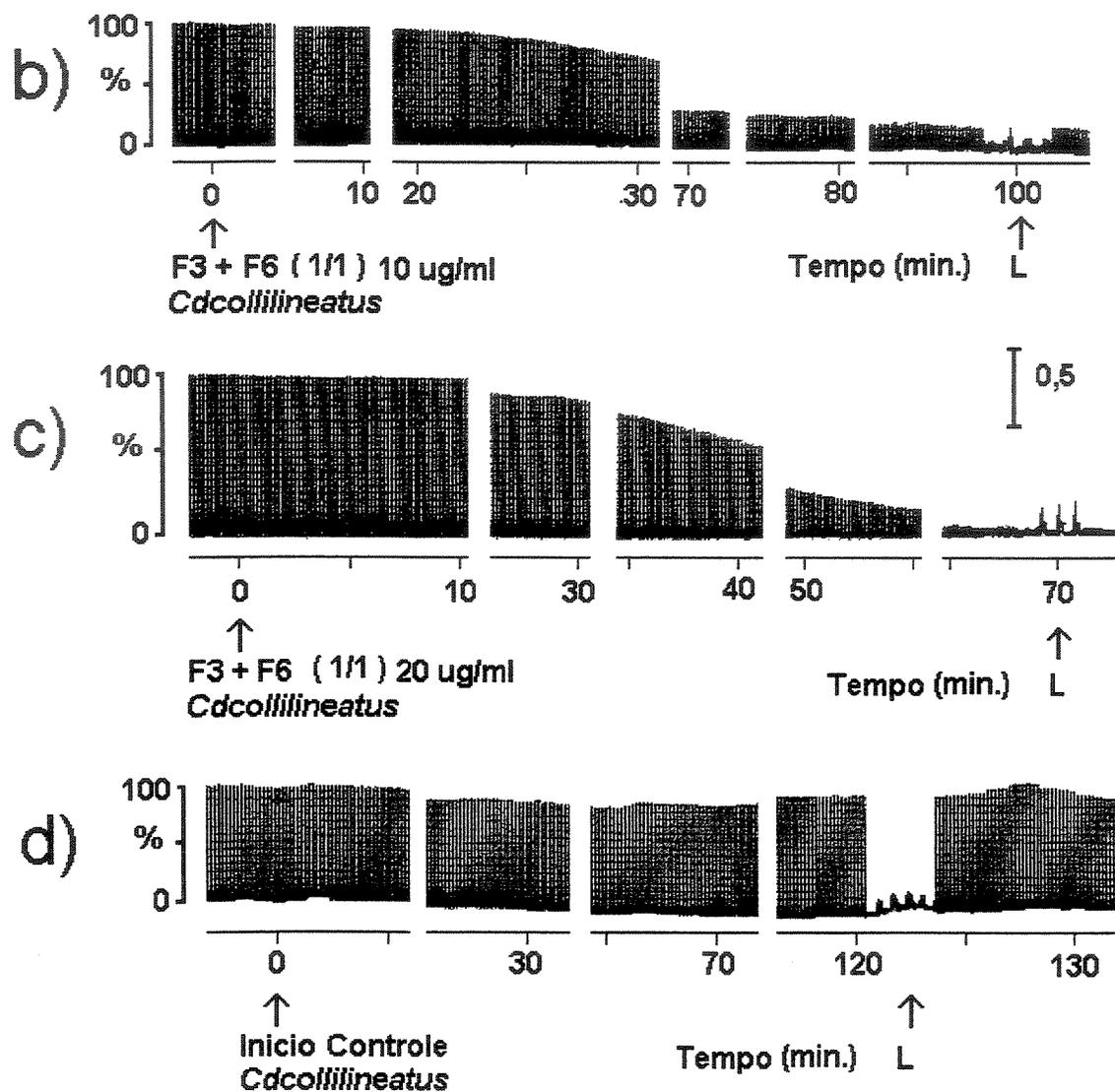


Figura 19. Registros da força de Contração Muscular em Preparação NF-DIC (estímulo indireto). Em a e b ilustram o perfil miográfico dos efeitos das recombinações da isoforma de crotopotina F3 e PLA₂ (F6) na doses 10 e 20 µg/ml demonstrando o bloqueio. Em c controle ↑ adição da mostra L lavagem.

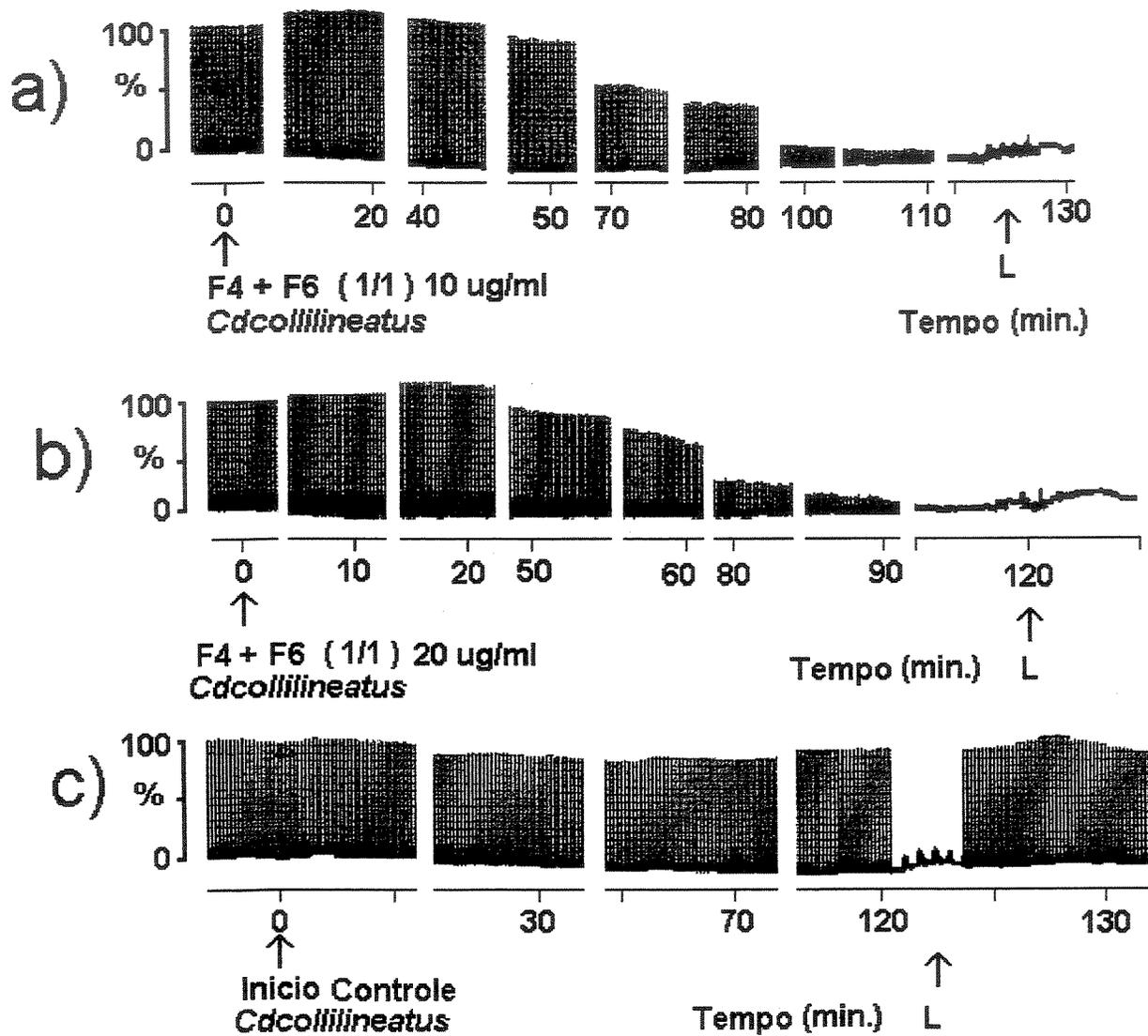


Figura 20. Registros da força de Contração Muscular em Preparação NF-DIC (estímulo indireto). Em a e b ilustram o perfil miográfico dos efeitos das recombinações da isoforma de crotopatina F4 e PLA₂ (F6) na doses 10 e 20 µg/ml demonstrando o bloqueio. Em c controle ↑ adição da mostra L lavagem.

A Tabela 1 mostra o tempo necessário para se obter 50% de bloqueio utilizando veneno total, crotoxina, componentes isolados e reassociados da crotoxina (isoformas de crotapotina F3 e F4; e PLA₂ F6) em preparação nervo frênico-diafragma isolado de camundongo evidenciando-se ser doses-dependente.

Veneno de Cdcoll	Dose ($\mu\text{g/ml}$)	Tempo de bloqueio 50% (min.)	n
veneno total	10	73,73 \pm 12,50	3
veneno total	20	61,65 \pm 07,24	3
crotoxina like	10	82,24 \pm 12,50	3
crotoxina like	20	74,19 \pm 18,89	3
Cdcoll F3	10	-	3
Cdcoll F3	20	-	3
Cdcoll F4	10	-	3
Cdcoll F4	20	-	3
Cdcoll F6	10	-	3
Cdcoll F6	20	-	3
Cdcoll F3 + Cdcoll F6	10	49,76 \pm 06,16	3
Cdcoll F3 + Cdcoll F6	20	40,29 \pm 01,28	3
Cdcoll F4 + Cdcoll F6	10	82,10 \pm 10,78	3
Cdcoll F4 + Cdcoll F6	20	44,00 \pm 01,28	3

Tabela 1 Tempo para o bloqueio de 50% da resposta contrátil do veneno total, crotoxina like, componentes isolados a partir da crotoxina like (isoformas de crotapotina F3 e F4; e PLA₂ F6), e frações recombinadas da crotoxina like de Ccoll, sobre a preparação nervo frênico-diafragma isolado de camundongo (NF-DIC).

4.8 – Estudo neurotóxico em músculo *biventer cervicis* de pintainho

4.8.1 - Efeito neurotóxico da crotoxina de Cdcoll nas doses de 1, 5, 10 e 20 $\mu\text{g/ml}$

Foi utilizada a crotoxina like (III) de Cdcoll proveniente da purificação na coluna Protein Pack SW300 (0.78x30cm) (Waters) acoplado ao sistema HPLC – biocompatível, APPS LC 650E (Waters). Nos experimentos realizados para a determinação do tempo necessário para a obtenção de 50% de bloqueio da resposta contrátil do músculo esquelético *biventer cervicis* de pintainho, foram utilizadas quatro doses diferentes de crotoxina like de Cdcoll, 1, 5 10 e 20 $\mu\text{g/mL}$. No entanto foi possível estabelecer uma ordem de potência da atividade, como a melhor dose capaz de levar a cabo a maior atividade bloqueadora neuromuscular. Todas as doses mostraram ser capazes de induzir um bloqueio significativo ($p < 0,05$) em relação ao controle (Fig. 21a).

Considerando a potência das doses, o bloqueio neuromuscular mostrou-se irreversível e, em geral, dose-dependente (Fig. 21a, b e c; Fig. 22a e b).

Assim, determinou-se 50% de bloqueio para cada uma das doses. A dose de 1 $\mu\text{g/mL}$ levou $30,95 \pm 4,15$ minutos; a dose de 5 $\mu\text{g/mL}$ levou $22,75 \pm 1,11$ minutos, a dose de 10 $\mu\text{g/mL}$ levou $19,44 \pm 0,98$ minutos, e a dose de 20 $\mu\text{g/mL}$ levou um tempo para o 50% de bloqueio $16,6 \pm 0,68$ minutos (Tabela 2).

A figura 21a mostra a gráfica do efeito neurotóxico no músculo *biventer cervicis* de pintainho, de crotoxina quando comparadas com o controle mostram um efeito bloqueador da resposta muscular, das doses de 1, 5, 10 e 20 $\mu\text{g/mL}$. Na figura 21b e 21c registros miográficos da resposta contrátil da crotoxina like nas doses de 1 e 5 $\mu\text{g/mL}$ mostrando o efeito neurotóxico pré-sináptico comumente conhecido. Para todos os casos o efeito de bloqueio foi irreversível pós-lavagem, tal como se pode apreciar na figura 21b e.

Na figura 22a e 22c observa-se registros miográficos da resposta contrátil da crotoxina like nas doses de 10 e 20 $\mu\text{g/mL}$ durante 80 e 40 minutos respectivamente.

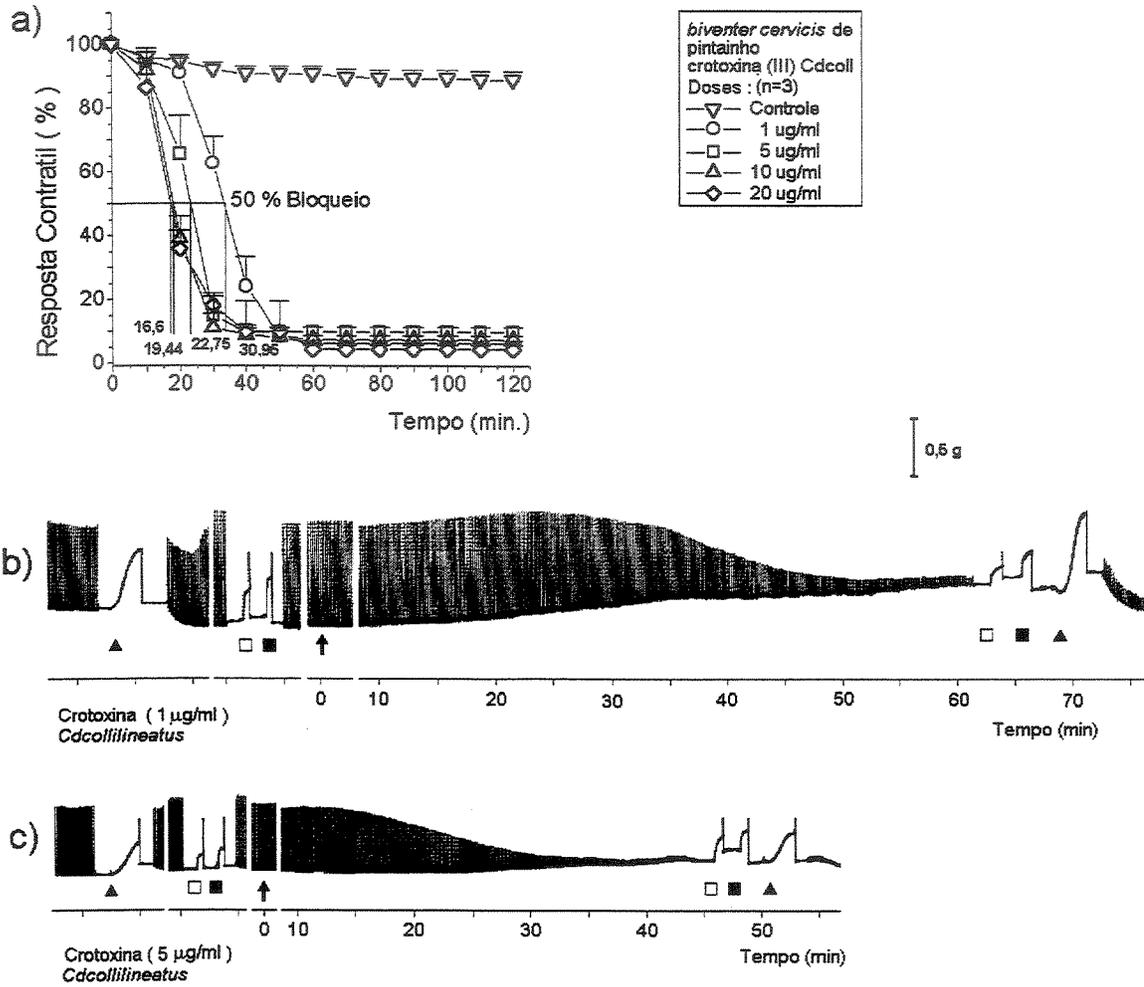


Figura 21. Porcentagem do bloqueio e resposta muscular na preparação de *biventer cervicis* de pintainho em na presença de crotoxina de veneno de Cdcoll. A resposta contrátil a Acetilcolina [ACh, 10 µg/ml. □ e 20 µg/ml ■ e KCl ▲ 13,4 mM. Agregados antes e depois da adição da crotoxina like. A Porcentagem do bloqueio 50%; b) dose de 1 µg/ml e c) dose de 5 µg/m.

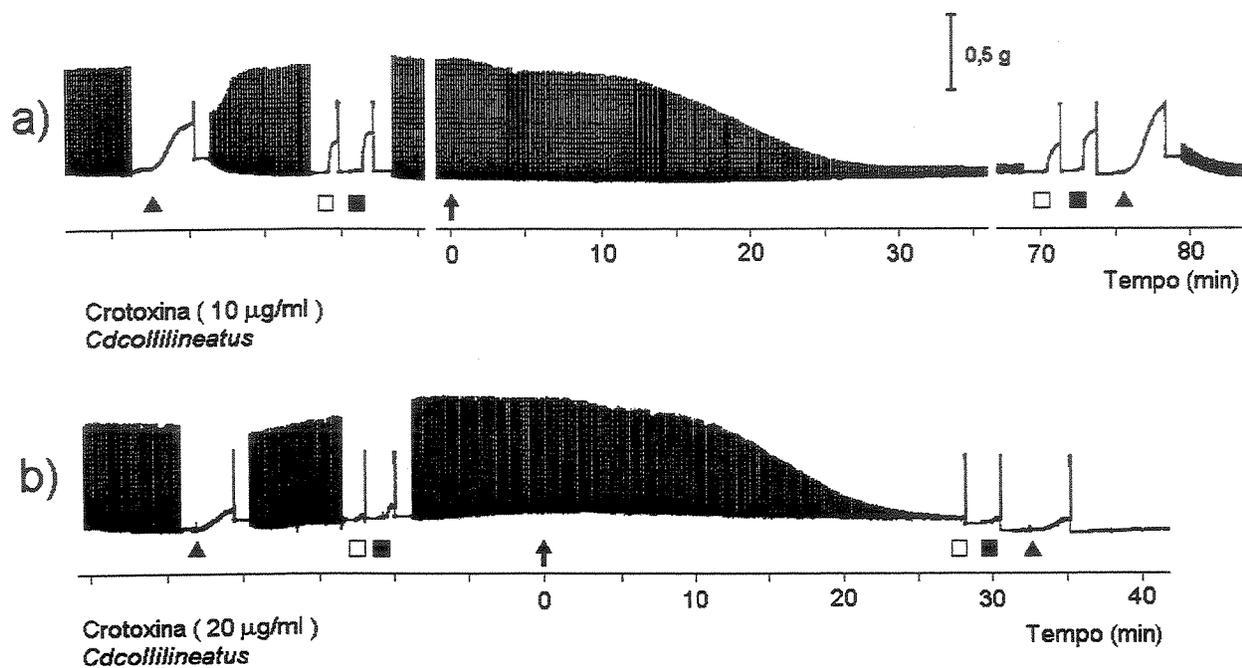


Figura 22. Resposta muscular na preparação de *biventer cervicis* de pintainho na presença de crotoxina de veneno de *Crotalus durissus collilineatus*. A resposta contrátil a Acetilcolina (ACh, 10 µg/ml. □ e 20 µg/ml ■ e KCl ▲ 13,4 mM. Agregados antes e depois da adição da crotoxina. Em a) dose de 10 µg/mL em b) dose de 20 µg/mL.

A tabela 2 mostra os respectivos tempos de bloqueio 50% da crotoxina, de Cdcoll comparados, na preparação biventer cervicis de pintainho, evidenciando-se ser dose-dependente.

Tabela 2 Tempo para o bloqueio de 50% da resposta contrátil da crotoxina de Cdcoll na preparação de *biventer cervicis* de pintainho.

Dose ($\mu\text{g}/\text{m}$)	Tempo para 50% de Bloqueio (min.)	n
1	30,95 \pm 04,15	3
5	22,75 + 01,11	3
10	19,44 \pm 00,98	3
20	16,60 \pm 00,68	3

4.8.2 - Resposta contraturante à adição de ACh e K^+

A preparação de *biventer cervicis* de pintainho, ao ser incubada, com as respectivas doses de crotoxina de Cdcoll, mantendo-se a resposta à adição de acetilcolina (ACh) (10 e 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$) assim como a adição de KCl (13,4 mM), sempre que a doses da crotoxina like utilizada fosse igual ou menor a 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$. No entanto, na dose de 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ apareceu um efeito contraturante tanto na adição de ACh (10 e 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$), assim como na adição de KCl (13,4 mM) na doses de 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ isso se pôde observar na Tabela 3.

Tabela 3. Porcentagem de bloqueio da resposta contraturante à acetilcolina (ACh) e ao potássio, na forma de KCl, obtida após 120 minutos de incubação com os diferentes doses de crotoxina de *Cdcoll*, em músculo *biventer cervicis* de pintainho

Dose ($\mu\text{g/ml}$)	KCl (13,4 mM) % Bloqueio	n
1	0 \pm 0,00	3
5	8 \pm 7,66	3
10	0 \pm 0,00	3
20	16 \pm 8,02	3

Dose ($\mu\text{g/ml}$)	ACh (10 $\mu\text{g/ml}$) % Bloqueio	n
1	17 \pm 16,66	3
5	0 \pm 0,00	3
10	0 \pm 0,00	3
20	17 \pm 16,66	3

Dose ($\mu\text{g/ml}$)	ACh (20 $\mu\text{g/ml}$) % Bloqueio	n
1	3 \pm 18,82	3
5	0 \pm 0,00	3
10	0 \pm 0,00	3
20	24 \pm 14,52	3

V - DISCUSSÃO

Purificação e caracterização bioquímica

A purificação e o conhecimento do mecanismo de ação das toxinas têm sido de grande importância na área biológica. As toxinas têm sido utilizadas, como instrumentos de pesquisa em diversos processos como a inflamação e ativação celular, no estudo dos canais de sódio, na marcação e classificação de tipos de receptores, processos de excitação e no estudo do metabolismo lipídico, através da utilização específica de fosfolipases.

As metodologias de purificação empregadas na obtenção das neurotoxinas, como a crotoxina de Cdt, têm sido descritas por Breithaupt, *et al.*, (1975), onde empregaram três passos cromatográficos: uma cromatografia de troca iônica CM-celulose (CM 32 Whatman) pH 3,5 tampão formiato de amônio 0,1 a 3M seguida por uma cromatografia de gel filtração Sephadex G-50 e finalmente usaram troca iônica DEAE-celulose (DE 32 Whatman).

Bercovici, *et al.* (1987) desenvolveu um outro método para a purificação da crotoxina; este protocolo consistiu em três passos cromatográficos iniciando com uma precipitação com sulfato de amônio de 30-60%, seguida por uma cromatografia de exclusão molecular em Sephadex G-75, tampão acetato 0,1M, pH 3,3 e finalmente por CM-sephadex pH=3,3 tampão formiato de amônio 0,1 e 3M.

Lennon e Kaiser (1990) usaram também dois passos cromatográficos, com várias diálises intercaladas, um de gel filtração Sephacryl S-200-SF, NaCl 0,1M pH=6,7 e outro Superose 12 HR NaCl 0,7M pH 6,5 e finalmente fizeram diálises à 4°C onde é possível ocorrer perda de parte significativa da fração e de sua atividade biológica.

Contudo essas metodologias não definem o grau de purificação das isoformas e nem dos componentes que fazem parte da crotoxina de Cdt. Um dos objetivos procurado neste trabalho foi o de desenvolver um novo protocolo de purificação da crotoxina e de seus componentes (isoformas de crotopotina F3 e F4; e PLA₂ F6) usando métodos em HPLC como método cromatográfico.

No presente trabalho as metodologias empregadas na purificação da crotoxina like e de seus componentes; crotapotina (isoformas F3 e F4) e fosfolipase A₂ (F6), diferem das descritas na literatura para Cdt.

De acordo com nossos resultados, ficou evidente a otimização da obtenção das frações de crotoxina e seus componentes através da utilização das cromatografias de exclusão molecular como etapa inicial e HPLC de fase reversa como etapa final, o que reverteu na obtenção das frações, após esse processo, sem perda da atividade biológica.

Os nossos resultados mostram que de acordo com o método desenvolvido é possível evidenciar de forma clara a diferença dos venenos de Cdt e Cdcoll (Fig.1 e 2), principalmente em relação a crotamina. A análise cromatográfica dos dois venenos (Fig.2a, b) mostra a presença de uma pequena fração, que no veneno de Cdcoll é eluído entre as frações de crotoxina e crotamina, que corresponde a fração IV na cromatografia de Cdcoll. (Fig.2a). Estes resultados preliminares indicam que esta proteína poderia ser a Inter-cro caracterizada parcialmente por Laure (1989).

A purificação da crotoxina do veneno total de Cdcoll, em HPLC de fase reversa (FR), mostra a presença de quatro isoformas de crotapotina, sendo as frações F3, F4 as mais abundantes que as isoformas F1 e F2 que não foram utilizadas neste trabalho devido à baixa concentração protéica e apenas uma isoforma de PLA₂ (Fig. 3a, F6) sugerindo a presença de duas isoformas de crotoxina maiores e duas isoformas de crotoxina menores.

A análise do perfil cromatográfico da purificação da crotoxina de Cdt evidenciou a presença de duas isoformas principais de crotapotina (F5 e F7), e de três isoformas para PLA₂ (F15, F16 e F17), Fig.3b, sugerindo a presença de seis isoformas de crotoxina.

Valente *et al.*, (1998) utilizando metodologias semelhantes sobre estudos de purificação das isoformas de PLA₂ de crotoxina de Cdt e seus efeitos em mitocôndrias isoladas, conseguiu obter uma forma de crotapotina (C) e três isoformas de PLA₂ (F1, F2 e F3), porém de acordo com nossas metodologias conseguiu-se purificar a partir de crotoxina de Cdt, duas isoformas de crotapotina (F5 e F7) e três isoformas de PLA₂.

A análise eletroforética em gel tricina mostra a crotoxina de cdcoll e a crotoxina de Cdt como um heterodímero formado pela associação não covalente de PLA₂ e crotapotina com uma massa molecular em torno de 25 e 26 kDa, a PLA₂ em torno a 14,5 kDa e a

crotapotina em torno de 9 kDa não sendo visualizadas devido ao caráter ácido das crotapotinas o provavelmente ao tempo de corrida, sendo necessário então, para poder evidenciar as mesmas, o uso de um gel SDS-PAGE tricina que devido à diferença de concentração permite visualizar tais proteínas que não foram vistas em um gel normal (Fig.4a, b).

Os estudos realizados por Lennon e Kaiser (1990) ao explorar as similaridades bioquímicas e biológicas das crotoxinas de Cdt e Cdcoll, mostraram propriedades muito similares entre ambas.

Santoro, *et al.*, (1999) apresentaram evidências bioquímicas e biológicas que suportam que as três subespécies: Cdcoll, Cdt e Cdcas são muito similares, salvo algumas particularidades relacionadas a estudos farmacológicos como, edema de pata.

Contudo, em nossas pesquisas de purificação realizadas em HPLC de exclusão molecular e de fase reversa mostraram que os venenos de Cdcoll e Cdt, do ponto de vista bioquímico possuem diferenças relacionadas provavelmente ao caráter estrutural, que podem ser observadas nas diferenças no tempo de retenção e eluição das isoformas de crotapotinas (F3 e F4) de Cdcoll e de Cdt assim como as PLA₂ de Cdt (F15, F16 e F17) e PLA₂ de Cdcoll (F6) (Fig.3).

Os resultados permitem sugerir que as crotapotinas de Cdcoll são ligeiramente menos hidrofóbicas que as crotapotinas de Cdt e a PLA₂ de Cdcoll é menos hidrofóbica que as PLA₂ de Cdt. (Fig. 3).

Outra diferença, de caráter bioquímico, que reforça a idéia da presença de diferenças estruturais entre a PLA₂ encontrada na crotoxina like de Cdcoll e Cdt, é que a atividade catalítica da PLA₂ de Cdcoll (CdcollF6) difere das PLA₂ de Cdt (F15, F16 e F17) e da PLA₂ de Cdcas, (CdcasF6), presentes no veneno total, crotoxina e PLA₂. (Fig.5).

Nossos estudos sobre inibição das isoformas de crotapotinas de Cdcoll, Cdt e Cdcasca de acordo com o método de Holzer e Mackessy (1996), feitos sobre as PLA₂ das três subespécies de forma cruzada, mostram diferenças não significativas na capacidade inibitória, inferindo desta forma diferenças estruturais entre as crotapotinas e conseqüentemente entre as PLA₂ e crotoxinas (Fig. 6,7,8,9 e 10). De acordo com os

nossos dados a crotapotina F3 de Cdcoll é relativamente, em relação às outras crotapotinas, mais potente das outras subespécies de cascavel.

Estudo cinético da PLA₂ de Cdcoll (CdcollF6)

As fosfolipases A₂ (E.C.3.1.1.4) provenientes do veneno de Cdt, desde que são consideradas como PLA₂ de baixa massa molecular, extracelulares, Asp (49), hidrolisam substratos em sua forma micelar ou lipídica, evidenciando assim um comportamento tipo Michaelis-Menten (Breithaupt, 1976; Deems e Dennis, 1995b; Holzer e Mackessy, 1996;). No entanto, frente a um substrato sintético, cromogénico, e não micelar, como o 4-nitro-3-(octanoiloxi) ácido benzóico, a PLA₂ de Cdcoll (CdcollF6), comportou-se como enzima alostérica (Fig.12a) o que poderia estar relacionado à própria característica não micelar do substrato ou a arranjo molecular da PLA₂, a formar agregados como dímeros, trimeros ou tetrameros, como apresentado para a PLA₂ de Cdcas descrito por Beghini, *et al.*, (2000) o que constitui uma diferença estrutural com as PLA₂ de Cdt.

Entretanto, nem toda enzima que mostra uma curva alostérica pode ser considerada uma enzima alostérica, fato este que faz sugerir um comportamento alostérico que precisa ser mais e melhor compreendido.

As PLA₂ procedentes de Cdt mostram ser cálcio-dependentes, uma vez que íon cálcio é um importante cofator para que ocorra a catálise (Kini, 1997; Tu, 1977;1982;1991; Breithaupt, 1976; Holzer e Mackessy 1996). No entanto, determinadas PLA₂ são ativas cataliticamente por ação de outros íons divalentes como descrito por Breithaupt, (1976), Tu, *et al.*, (1970) para PLA₂ de Cdt, *Crotalus atrox* e *Liticauda semifasciata*.

Em nossos experimentos observamos que além do Ca²⁺ (CaCl₂ 10mM) a PLA₂ de Cdcoll (CdcollF6) é ativada na presença de outros íons divalentes (como cofator), tais como Mn²⁺ e Mg²⁺ (10mM), mais foi necessário à adição mínima de CaCl₂ 1mM (Fig. 12b) e menos ativa frente a Zn²⁺ e Cu²⁺ (10mM) e em ausência de Ca²⁺ a PLA₂ de Cdcoll (CdcollF6) evidenciou uma baixa atividade mostrando ser cálcio-dependente. No entanto ao mostrar atividade frente a outros íons divalentes como Mg²⁺ e Mn²⁺ parece ser que o arranjo do sítio catalítico apresenta uma estrutura exclusiva para o íon Cálcio.

Apesar da PLA₂ de Cdcoll (CdcollF6) ser cálcio-dependente, o estudo do efeito de cátion mostrou que o sítio catalítico pode ser modificado estruturalmente tomando a enzima ativa na presença de outros íons como Mg²⁺ e Mn²⁺ ou gerando um desarranjo molecular com perda da atividade catalítica frente a Zn²⁺ e Cu²⁺ (Fig.12b).

Tem sido registrado que a PLA₂ de *Naja naja naja* é altamente estável a temperaturas extremas tal como 100°C (Deems e Dennis, 1975a) assim como para PLA₂ de Cdt mostra uma alta atividade em temperatura em torno de 53-57°C (Breithaupt, 1976). Em nossos experimentos encontramos que a PLA₂ de Cdcoll (CdcollF6) mostrou uma temperatura ótima para sua atividade catalítica na faixa de 30-40°C (Fig.11b), evidenciando uma perda da atividade muito lenta frente a um aumento da temperatura.

Outros parâmetros cinéticos conhecidos para PLA₂ (Asp49) como pH, mostraram ser comuns, cujos valores ótimos se encontram entre 7 a 8,5 (Kini,1997; Breithaupt, 1976; Beghini, *et al.*, 2000). Nossos resultados mostraram que a PLA₂ de Cdcoll (CdcollF6) tem um pH ótimo na faixa de 7 a 8,8. Em valores de pH acima de 8,5 a enzima PLA₂ de Cdcoll (CdcollF6) demonstrou ser relativamente instável (Fig. 11b).

Esta característica do perfil de atividade sugere que o sítio ativo da enzima contém um grupo ainda capaz de ionizar-se com um pK próximo de 7,5 e 8,5.

Caracterização biológica. Estudos de neurotoxicidade

Tem sido demonstrado que o veneno de Cdt caracteriza-se por apresentar elevada toxicidade muito superior à dos venenos das outras viperídeos e, em algumas espécies animais, à dos venenos da maioria das serpentes Elapidae (Vital, 1972b).

O efeito neurotóxico no caso de envenenamento por Cdt é causado fundamentalmente pela presença da fração crotoxina. A crotoxina possui uma PLA₂ (Asp 49) capaz de levar a um bloqueio neuromuscular a nível pré-sináptico, considerada como uma β-neurotoxina (Fraenkel-Conrad, 1982; Bon, *et al.*, 1988). E a crotoxina em altas doses tem um efeito pós-sináptico (Vital-Brazil, 1966; 1972a; 1972b e Bon, *et al.*, 1979; 1989) levando a uma estabilização do receptor da acetilcolina a um estado conformacional inativo.

Em nossos estudos de caracterização neurotóxica a partir do veneno total e crotoxina like de Cdcoll, podemos correlacionar com os citados pela bibliografia em relação a Cdt, à evidenciar o efeito neurotóxico na preparação nervo frênico-diafragma isolado de camundongo, modelo proposto por Bülbring (1946) ao evidenciar um bloqueio na transmissão neuromuscular caracterizada pelo bloqueio irreversível na resposta contrátil mostrado no registro miográfico tanto pelo veneno total como pela crotoxina like de Cdcoll (Fig.13 e 14), o que estaria reforçando mais ainda que nossas metodologias empregadas foram adequadas e permitiram a manutenção estrutural das proteínas pela integridade de sua atividade biológica.

Embora existam algumas diferenças de resposta biológica tal como a ausência do efeito trifásico encontrado para a crotoxina de Cdt (Lee e Ho, 1982; Chang, 1985; Strong, 1987), a crotoxina like de Cdcoll purificada em nosso trabalho demonstrou ser ativa para bloquear a resposta contrátil na junção neuromuscular no modelo de nervo frênico-diafragma isolado de camundongo que sugere a manutenção de sua integridade estrutural.

Como referência da função biológica, foi testado o efeito neurotóxico do veneno total, da crotoxina de Cdcoll nas doses de 10 e 20 $\mu\text{g/ml}$. (Fig13e), assim como na miografia (Fig.16). O tempo necessário para o bloqueio de 50% foi para o veneno total (10 $\mu\text{g/ml}$.) $73,73 \pm 12,50$ min. e (20 $\mu\text{g/ml}$.) $61,65 \pm 07,24$ min. No caso da crotoxina like foi (10 $\mu\text{g/ml}$.) $82,24 \pm 12,50$ min. e (20 $\mu\text{g/ml}$.) $74,19 \pm 18,89$ min. evidenciando ser dose-dependente.

Os estudos neurotóxicos das frações isoladas do complexo crotoxina de Cdt (crotopotina e fosfolipase A_2) tem demonstrado a ausência do efeito neurotóxico e foram considerados como desprovidos de atividade farmacológica por Slotta Fraenkel-Conrad (1938); Chan e Lee (1977); Haberman e Breithaupt, (1978); Hawgood e Santana de Sá S. (1979); Verheij, *et al.*, (1981) e Gopalakrishnarone, *et al.*, (1984).

Nossos estudos corroboram com os dados da bibliografia, ao testar em forma isolada os componentes do complexo crotoxina de Cdcoll (isoformas de crotopotina F3 e F4) e a fração PLA_2 (CdcollF6), tanto em doses de 10 e 20 $\mu\text{g/ml}$ (Fig.15, 16 e 17) e evidenciar a ausência do efeito neurotóxico.

Nossos estudos revelam que a PLA₂ de Cdcoll (CdcollF6) apresenta sítio(s) específicos denominados como sítio(s) farmacológico(s) distinto do sítio catalítico capaz de desencadear o efeito neurotóxico (Yang, 1994; Gutierrez e Lomonte, 1995 e Kini, 1997) onde a crotapotina estaria levando a PLA₂ a um estado conformacional adequado expondo esses sítio(s) farmacológicos e inativando o sítio catalítico, colocando o complexo crotoxina like de tal forma que possa interagir com os receptores da célula alvo (efeito específico) (Kini, 1997).

Tem sido estudado que o complexo crotoxina de Cdt atua de forma sinérgica onde o componente ácido (crotapotina) estaria potencializando o efeito neurotóxico da crotoxina, como descrito por Rübtsamen, *et al.*, 1971; Horst, *et al.*, 1972; Bon, 1982; Faure e Bon, 1987; e Kini, (1997).

Em nosso trabalho foi evidenciado este efeito sinérgico nos experimentos de recombinação dos componentes da crotoxina de Cdcoll F3 + F6 e F4 +F6, onde foi recombinada cada isoforma de crotapotina (F3 e F4) com a fração PLA₂ (CdcollF6) nas doses de 10 e 20 µg/ml utilizando uma razão molar 1:1 mostrando o efeito neurotóxico no bloqueio da transmissão neuromuscular, evidenciado pelo bloqueio da resposta contrátil como no registro miográfico, na preparação nervo frênico-diafragma isolado de camundongo (Fig. 18, 19 e 20).

Esses resultados confirmam a integridade da crotoxina like de Cdcoll, em seu rearranjo molecular para desencadear o efeito neurotóxico demonstrando assim a otimização de nossas metodologias de purificação que leva à conservação da função biológica das proteínas isoladas.

A recombinação F3+F6 na dose de 10 µg/ml o tempo necessário foi de 49,76±6,16 minutos (Fig.18) e para a dose 20 µg/m foi 40,29±1,28 minuto (Fig.18) e para a combinação de F4 + F6 na doses de 10 µg/m o tempo necessário foi de 82,1±10,78 minutos (Fig.18) e para a dose de 20 µg/m foi de 44+8,08 minutos (Fig.18). Os resultados obtidos poderiam sugerir o alto grau de pureza das frações isoladas como a razão molar utilizada 1:1 o que sugeriria que a combinação do complexo crotoxina like se deve fundamentalmente ao equilíbrio de cargas entre a crotapotina e a PLA₂ para reproduzir o efeito neurotóxico melhor desejado.

O mais importante é observar que a crotoxina recombinada foi capaz de desencadear o efeito neurotóxico desejado o que nos permite destacar a otimização de nossas metodologias de purificação como as mais ótimas.

Poderia acontecer que tanto o veneno total como a crotoxina, proveniente da purificação, não pudessem guardar estritamente a razão molar 1:1, o que faria com que os tempos de bloqueio 50% se mostrassem diferentes, entre o veneno total, crotoxina com as reassociações de F3+F6 tanto nas doses de 10 e 20 $\mu\text{g/mL}$.

Experimentos realizados por Faure e Bon, (1987) mostraram a presença de até 16 isoformas de crotoxina em Cdt como o resultado da expressão de isogenes responsáveis pela alteração de 2 aminoácidos até o reporte de várias posições na seqüência da PLA₂. Faure, *et al.* (1994) mostra que a multiplicidade das isoformas de crotoxina de Cdt é o resultado da modificação pós-traducional modificada a partir de um precursor. Estes resultados da literatura corroboram com nosso estudo ao evidenciar o efeito neurotóxico nas recombinações, sugerindo como o resultado das isoformas expressadas.

O efeito irreversível da resposta contrátil ao efeito neurotóxico da crotoxina de Cdcoll em nervo frênico-diafragma isolado de camundongo, pós-lavagem, foi evidenciado em todos os registros miográficos onde aconteceu tal efeito (Fig. 13b, c; 14a,b e c 19a, b e c; e 20a, e b;) fato que foi também registrado para a crotoxina de Cdt descrito por Hawgood e Smith (1977).

Os diferentes perfis cromatográficos da re-purificação da crotoxina de Cdcoll sugerem uma divergência nas diferentes atividades farmacológicas referidas ao tempo de bloqueio 50%, entre os venenos e crotoxina de Cdcoll e Cdt que ainda necessitam ser melhores explorados (Tabela 1).

Tem sido estudado que neurotoxinas presentes nos venenos de serpentes que desencadeiam paralisia neuromuscular agem pré-juncionalmente causando interferência na liberação de acetilcolina (Ach) ou pós-juncionalmente bloqueando os receptores para a acetilcolina. Estes diferentes mecanismos de ação não podem ser facilmente diferenciados usando-se as preparações nervo frênico-diafragma isolado de camundongo, mas podem ser diferencialmente demonstrados usando-se a preparação biventer cervicis de pintainho (Harvey, *et al.*, 1994). Uma neurotoxina pura pré-sináptica ativa poderia abolir a resposta

contrátil evocada sem afetar as respostas aos agonistas colinérgicos ou as respostas à estimulação direta pelo KCl. Neurotoxinas ativas pós-sinápticamente bloqueariam respostas aos agonistas dos colinoceptores tanto quanto a estimulação indireta, mas não afetariam as respostas a elevadas concentrações de potássio ou a estimulação direta.

O efeito neurotóxico, dose-dependente da crotoxina like de Cdcoll pode ser observado melhor em nossos estudos neurotóxicos realizados em músculo *biventer cervicis* de pintainho (Fig.21 e 22), nas doses utilizadas de 1, 5 10 e 20 µg/ml, além de evidenciar tratar-se de uma neurotoxina pré-sináptica, ao não mostrar um bloqueio de 50% a resposta contraturante a ACh e KCl (Tab.2 e 3), confirmando o indicado por Hawgood e Santana de Sá S. (1979) e Bon, *et al.*, (1979) o que pode sugerir que a toxina pode-se ligar ao sítio pré-sináptico específico, seguida por uma facilitação da liberação de ACh e progressiva depressão, até o bloqueio irreversível da transmissão.

O efeito pós-sináptico observado ao ver o ligeiro bloqueio a resposta contracturante nas diferentes doses da acetilcolina (Tab. 4), pode ser devido ao bloqueio da resposta da acetilcolina através da estabilização do receptor de acetilcolina para a forma de um estado conformacional inativo, tal como fosse indicado para a crotoxina de Cdt. (Bon, *et al.*, 1979). Pode também bloquear o efluxo de Na⁺ da microvesícula excitável tendo por tanto, ação pós-sináptica, originalmente observada por Vital e Fontana (1996).

Os resultados obtidos no presente trabalho são estimulantes e somados ao grau de pureza, observado nas purificações e caracterizações bioquímicas, justificam um estudo mais detalhado quando à atividade biológica, não só no registro miográfico como também na electrofisiologia.

A importância das neurotoxinas nas investigações dos canais iônicos, na transmissão do impulso nervoso; contribuirão muito para o desenvolvimento de metodologias para o isolamento, caracterização bioquímica, biológica e na determinação de um modelo da estrutura molecular dos canais de sódio (Smithies, 1979, Vassilev, *et al.*, 1988).

A crotoxina é de longe o componente protéico e neurotóxico mais importante de todo o veneno de serpentes crotálicas. O isolamento e a caracterização da crotoxina e de seus componentes permitirão uma investigação futura sobre o polimorfismo molecular

desta família de proteínas, que poderão ajudar a entender a ação principalmente desta neurotoxina.

VI - CONCLUSÃO

As novas metodologias de purificação em HPLC de exclusão molecular e de fase reversa, permitiram purificar quatro isoformas de crotapotina, e uma de fosfolipase A₂ com atividade catalítica denominada CdcollF6, usando dois passos cromatográficos, e sem perder a atividade biológica, tal como foi mostrado nos processos de reassociação foi obtido um melhor tempo de bloqueio 50% ficando-se os passos de purificação e otimizando custo/benefício.

Definitivamente existem diferenças entre a crotoxina de Cdt e a crotoxina de Cdcoll que não podem ser diferenciadas apenas por seu efeito biológico, mesmo que possam existir diferenças no tempo de bloqueio 50% do efeito farmacológico observado.

Essas diferenças poderiam estar relacionadas ao número de componentes do complexo crotoxina (crotapotinas e fosfolipases A₂) de Cdcoll e a crotoxina de Cdt, além de sugerir que possam existir diferenças de caráter estrutural devido ao tempo de retenção na eluição das frações (hidrofobicidade) dos componentes do complexo crotoxínico na purificação feita em HPLC de fase reversa.

Entre outras diferenças encontram-se aquelas referentes à atividade PLA₂ presente no veneno total, crotoxinas e PLA₂ a crotoxina de Cdcoll quando comparada com as PLA₂ de Cdt (F15, F16 e F17), Cdcasca (F6) observam-se diferenças em termos de velocidade, assim como as características próprias de cinética enzimática da PLA₂ de Cdcoll (CdcollF6).

As diferenças de caracterização bioquímica da crotoxina são extrapoladas, quando comparadas com o efeito farmacológico, vemos uma diferença na potência neurotóxica diferenciados entre a crotoxina de Cdt e a crotoxina de Cdcoll a respeito do tempo para alcançar o 50% de bloqueio, assim como as doses utilizadas. Essas diferenças biológicas poderiam correlacionar-se com a possível diferença molecular descoberta na purificação através do HPLC de fase reversa.

Contudo, acredita-se que estudos sobre, dicroísmo circular, sequenciamento dos componentes da crotoxina de Cdcoll, assim como estudos de eletrofisiologia devem ser necessários para compreender melhor as diferenças entre as duas toxinas.

VII - BIBLIOGRAFIA

- Alexander, A., Grothusen, J., Zepeda, H. And Schwartzman, R.J. (1988) Gyroxin a toxin from the venom of *Crotalus durissus terrificus*, is a trombin-like enzyme. *Toxicon* 26(6):953-960.
- Arita, H.; Hanasaki, K., Nakano, T.; Oka, S.; Teraoka, H. and Matsumoto, K. (1991) *J.Biol. Chem.* 266: 19139 - 19141.
- Assakura, M.T.; Reichl, A.P.; Asperti, M.C.A. and Mandelbourn, F.R. (1985) Isolation of the proteolytic enzyme from the venom of snake *Bothrops moojeni* (Caissaca) *Toxicon* 23(4): 691 - 965.
- Barrabin, A. Gruthusen, J. Zepeda, H. And Schwartzman, R.J. (1978) Gyroxin, a Toxin from the Venom of *Crotalus Durissus Terrificus*, Is A Trombin-Like Enzyme. *Toxicon* 26, 953-960.
- Barrio, A., (1961) Gyroxin, A New Neurotoxin of *Crotalus durissus terrificus* Venom. *Acta Physiol. Latino Americana* 11, 224.
- Beghini, D.G., Toyama, M.H., Hyslop, S., Sodek, L.C., Novello, J.C., and Marangoni, S. Enzymatic characterization of a novel phospholipase A₂ from *Crotalus durissus cascavella* rattlesnake (maracamba) venom. *J. Protein Chem.* (2000). 19(8):679-84.
- Bercovici, D.; Chudziniski, A.M.;Dias, W.O.; Esteves, M.I.; Hiraichi, E.; Oishi, N.Y.; Picarelli, Z.P.; Rocha, M.C.; Ueda, C.M.P.M.; Yamanouye, N.; Raw, I. (1987) A systematic fractionation of *Crotalus durissus terrificus* venom. *Mem.Inst.Butantan* 49:69-78
- Bon, C. (1982) Synergism of the subunits of crotoxin. *Toxicon* vol 20 Nro.1 pp.105-109.
- Bon, C., Bouchier, C., Choumet, V., Faure, G., Jiang, M.S., Lambezat, M.P., Radvanyi, F., Saliou, B. (1989) Crotoxin, half-century of investigations of a PLA₂ neurotoxin. *Acta Physiol.Pharmacol.Latinoamer.* 39:439-448.
- Bon, C.; Changeux, J. P.; Jeng, T. W. And Fraenkel-Conrat, H. (1979). Postsynaptic Effects of Crotoxin and of its isolated subunits. *Eur. J. Biochem.*, 99: 471-481.
- Bon, C. (1997) Multicomponent Neurotoxic Phospholipases A₂. In:Venom Phospholipase A₂ Enzymes, Structure,Function and Metabolism, Kini, M.R. (edt)., cap11, pp 269 - 285. John Wiley & Sons - Chichester, New York, Weinheim, Brisbane,Singapore, Toronto.
- Bon, C., Choumet, V., Faure, G., Jiang, M.S., Lembezal, M.P., Radvanyi, F., and Saliou, B. (1988) Biochemical analysis of the mechanism of action of crotoxin, a phospholipase A₂ neurotoxin from snake venom. In: Neurotins in Neurochemistry, p.p. 52-63, Dolly, O.J. ed., Ellis Horwood, Chichester, U.K.
- Bouchier., C.; Boulain, J.C.; Bon, C. and Menez, A. (1991) Analysis of cDNAs encoding the two subunits of crotoxin, a phospholipase A₂ neurotoxin from rattlesnake venom: the acidic non enzymatic subunit derives from a phospholipase A₂-like precursor. *Biochim. Biophys. Acta.* 1088(3):401-408
- Bülbring, E. (1946) Observation on the isolated phrenic nerve diaphragm preparation of the rat. *Br. J. Pharmacol.* 1: 38 -61
- Breithaupt H (1976) Enzymatic characteristics of crotalus phospholipase A₂ and the crotoxin complex. *Toxicon* 14(3):221-233
- Breithaupt, H.; Omori-Sato, T. and Lang, J. (1975) Isolation and characterization of three phospholipases A₂ from the crotoxin complex. *Biochim. Biophys. Acta.* 403(2):355-369

- Carvalho, D.D., Marangoni, S., Oliveira, B., Novello, J.C. (1998). Isolation and Characterization of a new lectin from the venom of the snake *Bothrops jararacussu*. *Biochem Molecular Biology International*, 44: 933-938
- Catterall, W.A. (1984) The molecular basis of neuronal excitability. *Science* 223: 653 - 661.
- Chang, C.C. (1985) Neurotoxins with phospholipase A₂ activity in snake venoms. *Proc.Natn.sci.Council, R.O.C.* B9:126-142.
- Chang, C.C.; Chen, T.F.; Lee, C.Y. (1973) Studies of the presynaptic effect of α -bungarotoxin on neuromuscular transmission. *J Pharmacol Exp Ther* 184(2):339-345
- Chang, C.C. And Lee, J.D. (1977a) Crotoxin, The Neurotoxin of South American Rattlesnake Venom, is a Presynaptic Toxin Acting Like β -Bungarotoxin. *Naunyn-Schmiedeberg. Arch.Pharmacol.* 296, 159-168.
- Chang, C. C. And Dong Lee, J. (1977b) The presynaptic neuromuscular blocking action of taipoxin: A comparison with B-bungarotoxin and crotoxin, *Toxicon*, 15: 571.
- Chang C.C. And Su, M. J. (1982). Presynaptic Toxicity of the Histidine-Modified, Phospholipase A₂-inactive, Beta-Bungarotoxin, Crotoxin and Notexin. *Toxicon*, 20 (5): 895-905.
- Cho, W. and Kezdy, F.J. (1991) Chromogenic substrates and assay of phospholipases A₂. *Methods Enzymol.* 197:75-79.
- Deems, R. A. and Dennis, E. A. (1975a) Characterization and physical properties of the major form of phospholipase A₂ from cobra venom (*Naja naja naja*) that has a molecular weight of 11,000. *J. Biol. Chem.* 250, 9008-9012.
- Deems, R. A. and Dennis, E. A. (1975b) Kinetic Analysis of Phospholipase A₂ Activity toward Mixed Micelles and Its Implications for the Study of Lipolytic Enzymes. *J. Biol. Chem.* 250, 9013-9020.
- De Haas, G.H.; Postema, N.M.; Nieuwenhuizen, W. and Van Deenen, L.L. (1986) Purification and Properties of Phospholipase A from Porcine Pancreas. *Biochem. Biophys. Acta.* 159: 103 - 108.
- Delot, E. And Boon (1993). Model for the Interaction of Crotoxin, a Phospholipase A₂ Neurotoxin, with Presynaptic Membranes. *Biochemistry*, 32 (40): 10708-10713.
- Dennis E.A. (1994) Diversity Of Group Types, Regulation and function of Phospholipase A₂. *J. Biol. Chem.* 269 (18): 13057-13060.
- Dennis, E.A. (1983) Phospholipases. In *The Enzymes* vol XVI, Academic Press. Inc, New York, Inc.
- Dos Santos, M.C., Ferreira L.C., Da Silva, W.D., and Furtado, M.F. (1993) Characterization of the biological activities of the 'yellow' and 'white' venoms from *Crotalus durissus ruruima* compared with the *Crotalus durissus terrificus* venom. Neutralizing activity of *Crotalus durissus ruruima* antivenins. *Toxicon* 1993 Nov;31(11):1459-69.
- Faure, G., and Bon, C. (1987). 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 (2): 730-738.
- Faure, G. Choumet, V.; Bouchier, C.; Camoin, L.; Guillaume, J.L.; Monegier, B.; Vuilhorgne, M. And Boon, C. (1994). The origin of the diversity crotoxin isoforms In The venom of *Crotalus durissus terrificus*. *Eur.J.Biochem.*, 223: 161-164.

- Faure, G.; Guillaume, J.L.; Camoin, L.; Saliou, B. and Bon, C. (1991) Multiplicity of acidic subunit isoforms of crotoxin, the phospholipase A₂ neurotoxin from *Crotalus durissus terrificus* venom, results from posttranslational modifications. *Biochemistry* 30(32):8074-8083
- Ferreira, M.L.; Henriques, O.B.; Lebrum, I.; Batista, M.B.C.; Prezuto, B.C.; Andreoni, A.S.S.; Zelnik, R. and Habermehl, B. (1992) A new bradykinin potentiating (Peptide P). Isolated from the venom of *Bothrops jararacussu* (Jararacuçu Tapete, Urutu Dourado). *Toxicon* 30 (1): 33 - 40.
- Fraenkel-Conrad, H. (1982) Snake venom neurotoxins related to phospholipase A₂ *J. Toxicol.Rev.* 1: 205-221.
- Fry, M.R.; Ghosh, S.S.; East, J.M. and Franson, R.C. (1992) Role of human sperm phospholipase A₂ in fertilization: effects of a novel inhibitor of phospholipase A₂ activity on membrane perturbations and oocyte penetration. *Biol Reprod.* 47(5):751-9.
- Gopalakrishnakone, P., Dempster, D. W. Hawgood, B.J., Elder, H.Y. (1984) Cellular and mitochondrial changes induced in the structure of murine skeletal muscle by crotoxin, a neurotoxic phospholipase A₂ complex. *Toxicon* 22:85-98
- Ginsborg, B.L. and Warriner, J. (1960) Spontaneous activity in muscle fibres of the chick. *Brit. J. Physiol* (150) 707-717
- Gutiérrez, J.M. and Lomonte, B. (1995) Phospholipase A₂ myotoxin from *Bothrops* snake venoms. *Toxicon* 33(11): 1405 - 1424.
- Gonçalves, J.M. (1956) Purification and properties of crotoamine. In *Venoms*. Buckley, E.E. and Porjes, N., Ed. Washington. 261
- Gonçalves, J.M. and Vieira, L.G. (1950) Estudos sobre venenos de serpentes brasileiras I. Análise eletroforética. *Ana.Acad.Brás.Cien.* 22: 141, 1950.
- Habermann, E. and Brethaupt, H. (1978) Mini-Review, The crotoxin complex-an example of biochemical and pharmacological protein complementation. *Toxicon* 16: 19-30.
- Hanley, M.R. (1978) Crotoxin effects on torpedo California cholinergic excitable vesicles and the role of its phospholipase A₂ activity. *Biochem. Biophysic. Commun.* 82 (1): 392-401.
- Harris, J.B. (1991) Phospholipases in snake venoms and their effect on the nerve and muscle, In: *Snake Toxins*, Harvey, A.L. (ed), pp 91 - 129, Pergamon Press, Inc. New York.
- Harvey, A.L.; Barfaraz, A.; Thompson, E.; Faiz, A.; Preston, S. & Harris, J.B. (1994) Screening of snake venoms for neurotoxic and myotoxic effects using simple in vitro preparations from rodents and chicks. *Toxicon* 32: 257-265.
- Harvey, A.L.; Bradley, K.N.; Cochran, S.A.; Rowan, E.G.; Pratt, J.A.; Quillfeldt, J.A.; Jerusalinsky, D.A. (1998) What can toxins tell us for drug discovery? *Toxicon* 36(11):1635-1640
- Harwig, S.S.L., Tan, L., Qu, X., Cho, Y. Eisenhauer, P.B. and Lehrer, R.I. (1995) Bactericidal properties of murine Intestinal Pla₂, *J. Clin. Invest.* 95: 603-610
- Hawgood, B. J. and Santana de Sá, S. (1979) Changes spontaneous and evoked release of transmitters induced by Crotoxin and its Complex component Phospholipase A₂ at the frog neuromuscular junction. *Neuroscience* (Oxford) 4, 293-303.
- Hawgood, B. J. and Smith, J. W. (1977) The mode of action at the mouse neuromuscular junction of the phospholipase A crotoxin complex isolated from venom of the South American Rattlesnake. *Br. J. Pharmac.* 61. 597-606.

- Hendon, R.A, and Fraenkel-Conrat, H. (1971). Biological Role of the two components of Crotoxin. *Pnas*, 68 (7): 1560-1563.
- Hodkin, A.L. & Huxley, A.F. (1952) Quantitative description of membrane currents and its application to conduction and excitation in nerve. *J. Physiol.* 117: 500.
- Holzer, M. and Mackessy, S.P. (1996). An aqueous endpoint assay of snake venom phospholipase A₂. *Toxicon* 34 (10) 1149-1155
- Homis-Brandeburgo, M. I.; Queiroz, L. S.; Santo-Neto, H.; Rodrigues-Simioni, L. and Giglio, J. R. (1988) Fractionation of *Bothrops jararacussu* snake venom: Partial chemical characterization and biological activity of Botropstoxin. *Toxicon*, 26 (7) 615-627.
- Horst, J., Hendon, R.A. and Fraenkel-Conrad, H. (1972) The active components of crotoxin. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 46: 1042-1047.
- Iwanaga, S. Ohshima, G. and Suzek, I. (1976). Proteinase from the venom of. Agkistrodon Halys Blomhoffi. In: Lorand, L. (Ed). *Methods In Enzimology* Vol. XlVb. Academic press.
- Iwanaga, S. and Suzuki, T. (1979) Enzymes in Snake Venom. In: Snake Venoms. Handbook of Experimental Pharmacology. Lee, C.Y. vol. 52, cap. 4, pp 105. Springer-Verlag Berlin-Heidelberg-New York.
- Janzen Daniel H. (1991) Historia Natural Costa Rica. P. 331-332.
- Jia, L.G.; Shimokawa, K.I.; Bjamson, J.B. and Fox, J.W. (1996) Snake venom metalloproteinases: Structure, function and relationship to the ADAMs family of proteins. *Toxicon* 34 (11-12): 1269 - 1276.
- Kamiguti, A.S.; Zuze, M.; Theakston, R.G.D. (1998) South Venom Metalloproteinases and Desintegrins: Interctions with cells. *Braz. J. Med. Res*, 31: 853-862.
- Karlsson, E. (1979) Chemistry of protein toxic in snake venom. In Lee, C.Y. (Ed): *Handbook of Experimental Pharmacology*, pp 159-212. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Kini, R. M. and Evans, H. J. (1989). A Model to Explain the pharmacological effects of snake venom phopholipases A₂. *Toxicon*, 27 (6): 613-635.
- Kini, R. M. (1997). Venom Phopholipase A₂ Enzymes: Structure, Function and Mechanism. P. 269-282.
- Kornalik, F. (1990) Toxins affecting blood coagulation and fibrinolysis. In: *Handbook of Toxinology*, pp 683 (Shier, W.T. and Mebs, D., Eds) New York: Marcel Dekker.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins among the assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-685.
- Landucci, E. C. T.; Antunes, E.; Donato, J. L.; Faro, R.; Hyslop, S.; Marangoni, S.; Oliveira B.; Cirino, G. and Nucci De G. (1995). Inhibition of Carregeenin-Induced rat paw o edema by crotapotin, a polypeptide complexed with phopolipase A₂. *Brithish J. Pharmacol.* , 114: 578-583.
- Landucci, E. C.; Toyama, M.H.; Marangoni, S.; Oliveira, B.; Cirino, G.; Antunes, E.; de Nucci, G. (2000) Effects of crotapotin and heparin on the rat paw oedema induced by different secretory phospholipase A₂. *Toxicon* 38: 199-208.
- Laskowsky, M. (1971). Venoms exonuclease. in boyer, P.D. (Ed) *Enzimes*, Vol 4 New York-London: Academic Press.
- Laure, C.J. (1990) *Crotalus durissus terrificus* Venom: Crotoxin and Inter-Cro *Mem.Inst.Butantan* Vol.52 (Supl.) p.17-19

- Lee, C.Y. and Ho, C.L. (1982) The pharmacology of phospholipase A₂ isolated from snake venoms with particular reference to their effects on neuromuscular transmission. In: (Yoshida, H., Hagihara, Y., Ebashi, S., eds.) *Avances in pharmacology and therapeutics*. Vol.4. Oxford, Pergamon Press. p.37-52.
- Lennon, B.W. and Kaiser, I.I. (1990) Isolation of a crotoxin-like protein from the venom of a South American Rattlesnake (*Crotalus durissus collilineatus*) *Comp. Biochem Physiol* 97 (4):695-9.
- Li, Z.Y.; Yu, T.F. and Lian, E.C.Y. (1994) Purification and characterization of L-amino acid oxidase from king cobra (*Ophiophagus hannah*) venom and its effects on human platelet aggregation. *Toxicon* 32(11): 1349 - 1358.
- Macin, A.C.; Soares, A.M.; Giglio, C.M.; Adrião-Escarso, S.H.; Vieira, C.A. and Giglio, J.R. (1997) The histamine releasers crotoxin, protamine and compound 48/80 activate specific proteases and phospholipases A₂. *Biochem. Mol. Biol. Int.* 42 (6): 1171-1177.
- Mandelbaum, F.R.; Reichel, A.P. and Assakura, M.T. (1976) Some physical and biochemical characteristics of HF2, one of the hemorrhagic factors in the venom of *Bothrops jararaca*. In: *Animal, plant and microbial toxins*, vol. 1, pp3. (Ohsaka, A.; Hayashi, K. and Sawai, Y. eds), London, Plenum Press.
- Mayer, F.; Kiffman, P. and Linker, A. (1960). Hialuronidase. in: Bouer, P.D.; Lardy, H.; Myrback, K. (Ed); *The Enzymes*. Vol.4 Academic Press.
- McLean, R.L.; Massaro, E.J. and Elliot, W.B. Olivera BM (1971) A comparative study of the homology of certain enzymes in elapid venoms. *Comp. Biochem. Physiol.* 39B: 1023 - 1037.
- McIntosh, J.M.; Ghomashchi, F.; Gelb, M.H.; Dooley, D.J.; Stoehr, S.J.; Giordani, A.B.; Naisbitt, S.R. (1995) Conodipine-M, a novel phospholipase A₂ isolated from the venom of the marine snail *Conus magus*. *J. Biol. Chem.* 270: 3518 - 3526.
- Mebs, D. (1970) A Comparative study of enzyme activities in snake venoms, *Int. J. Biochem.* 1:335-342.
- Meister, A., (1965). *Biochemistry of amino acid*. New York-London: Academic Press.
- Mori, N.; Nikai, T.; Sugihara, H. and Tu, A.T. (1987). Biochemical characterization of hemorrhagic toxins with fibrinogenase activity from *Crotalus ruber ruber* venom. *Arch. Biochem. Biophys.* 253: 108 - 115.
- Musial, J.; Niewiarowski, S.; Rucinski, B.; Stewart, G.J.; Cook, J.J.; Williams, J.A. and Edmunds, L.H. (1990). Inhibition of platelet adhesion to surfaces of extracorporeal circuits by disintegrins: RGD-containing peptides from viper venoms. *Circulation* 82: 261 - 273.
- Nakajima, M., Kanasaki, K., Veda, M. and Arita, H. (1992) Effects of pancreatic type phospholipase A₂ on isolated porcine cerebral arteries via its specific binding sites, *FEBS Lett.* 309: 261-264.
- Narahashi, T.; Hass, H.G. and Therrien, E.F. (1967) Saxitoxin and tetrodotoxin: comparison of nerve blocking mechanism. *Science*, 22; 157 (795); 1441-2.
- Prado-Franceschi, J. and Vital, B. O (1981) Convulxin, a new toxin from the venom of the South American Rattlesnake *Crotalus durissus terrificus*, *Toxicon*, Vol. 19, Nº4,; 658-665.

- Rangel-Santos, A. C. and Mota I. (2000) Effect of heating on the toxic, immunogenic and immunosuppressive activities of *Crotalus durissus terrificus* venom, *Toxicon*, ;38 (10):1451-7.
- Rochat, H.; Rochat, C.; Miranda, F.; Lissitzky, S. and Edman, P. (1970) The amino acid sequence of neurotoxin I of *Androctonus australis* Hector. *Eur. J. Biochem.* 17: 262.
- Rodrigues-Simioni, L.; Prado-Franceschi, J.; Cintra, A.C.; Giglio, J.R.; Jiang, M.S., and Fletcher, J.E. (1995) No role for enzymatic activity or dantrolene-sensitive Ca²⁺ stores in the muscular effects of bothropstoxin, a Lys49 phospholipase A₂ myotoxin. *Toxicon* 33(11):1479-89
- Ryden, L., Gabel, D. and Eaker, D. (1973) A model of tree-dimensional structure of snake venom neurotoxins based on chemical evidence. *int. J. Peptide Protein Res.* 5, 261.
- Rübsamen, K., Breithaupt, H., and Habermann, E. (1971) Biochemistry and Pharmacology of the crotoxin complex. I. Subfractionation and recombination of the crotoxin complex. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 270: 274-288.
- Sanches, E.F.; Magalhães, A.; Diniz, C.R. (1987). Purification of a hemorrhagic factor (LHF-1) from the venom of the bush master snake, *Lachesis muta muta*. *Toxicon* 25: 611 - 618.
- Santoro, M. L., Sousa E Silva, M. C., Gonçalves, L. R., Almeida-Santos, S. M., Cardoso, D. F., Laporta-Ferreira, I. L., Saiki, M., Peres, C. A., Sano-Martins, I. S. (1999) Comparison of the biological activities in venoms from three subspecies of the South American Rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*, *Crotalus durissus cascavella* and *Crotalus durissus collilineatus*). *Comp. Biochem. Physiol. C. Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.* 122(1), 61-73
- Seegers, W.H. and Ouyang, C (1979). Snake venoms and blood coagulation. In: *Handbook of Experimental Pharmacology* (Lee, C.Y., ed.) vol. 52, cap 18, pp 684, Springer - Verlag, Berlin.
- Schagger, H. A.; Von Jagow, G. (1987). Comassie blue-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for direct visualization of polypeptides during electrophoresis. *Anal. Biochem.* 166, 368-379.
- Simpson, L.L.; Lautenslager, G. T.; Kaiser, I.I. and Middlebrook, J. L. (1993). Identification of the site at which phospholipase A₂ neurotoxin localize to produce their neuromuscular blocking effects. *Toxicon*, 31 (1): 13-26
- Slotta, K.H. and Fraenkel-Conrat, H. (1938) Schlangengifte, Iii Reinigung Und Krystallisation Des Klapperschlangen-Giftes. *Ber. Deut. Chem. Ges.*, 71:1076-1081.
- Smithies, J. R. (1979). *Advance in cytopharmacology*. Vol. 3, 317-324, Edited by B. Ceccarelli and F. Clementi.
- Strichartz, G.R. and Wang, G.K. (1986) Rapid voltage-dependent dissociation of scorpion α -toxin coupled to Na channel inactivation in myelinated nerve. *J. Gen. Physiol* 88: 413 - 435.
- Strong, P.N. (1987) Presynaptic phospholipase A₂ neurotoxins: relation hip between biochemical and electrophysiological approaches to the mechanism of toxin action. In: (Dowdall, M.J., and Hawthorne, J.N., eds.) *The cellular and molecular basis of cholinergic function*. Chichester, Ellis Horwood, 1987. p.534-549.
- Suhr, S.M. and Kin, D.S. (1996) Identification of the snake venom substance that induces apoptosis. *Bioch. Biophys. Res. Com.* 224(1): 134 - 139.

- Toyama, M. H.; Carneiro, E. M.; Marangoni, S.; Barbosa, R. L.; Corso, G. and Bochero, ^a C. (2000) Biochemical characterization of two crotoamine isoforms isolated by a single step RP-HPLC from *Crotalus durissus terrificus* (South American Rattlesnake) venom and their action on insulin secretion by pancreatic islets, *Bioch. Biophys. Acta.* 1474: 56-60.
- Tu, A.T. (1970) Isolation and Characterization of phospholipase A from sea snake *Laticauda semifasciata* Venom. *Arch. Biochem. Biophys.* 140: 96-106.
- Tu, A. T. (1977a) Venoms of crotalidae (Crotalids, pit vipers) in venoms: *Chemistry And Molecular Biology*, Jhon Wiley & Sons Ed., New York, P 211.
- Tu, A. T. (1977b). Venoms. Chemistry and Molecular Biology, New York-London-Sydney-Toronto. *John Wiley*, P. 560.
- Tu, A. T. (1982). Chemistry of rattlesnake venoms. in rattlesnake venoms, their actions and treatment. New York, Marcel Dekker.
- Tu, A. T. (1991) Reptile Venoms and Toxins: Handbook of Natural Toxins. Vol. 5. New York. *Macel Dekker. Inc.*
- Tu, A.T. and Chua, A. (1966) Acid and Alkaline phosphomonoesterases activity in snake venoms. *Comp. Biochem. Physiol.* 17: 297 - 307.
- Vadas, P. and Pruzanski, W. (1986) Role of secretory phospholipases A₂ in the pathobiology of disease. *Lab. Invest.* 55: 391 - 404.
- Vadas, P.; Browning, J.; Edelson, J. and Pruzanski, W. (1993) Extracellular phospholipase A₂ expression and inflammation: the relationship with associated disease states. *J. Lipid, Mediators* 8: 1 - 30.
- Valente, R.H.; Novello, J.C.; Marangoni, S.; Oliveira, B.; Pereira-Da Silva, L. and Macedo, D.V. (1998) Mitochondrial swelling and oxygen consumption during respiratory state 4 induced by phospholipase A₂ isoforms isolated from the South American Rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*) venom. *Toxicon*. Vol. 36. (1). 901-913.
- Van Der Bosch, H. (1980) Intracellular phospholipases *Biochem. Biophys. Acta*, 604: 191-246.
- Vassilev, P. M.; Scheuer, T. (1988). and Caterall, W. A. (1988). Identification of a intracellular peptide segment involved in sodium channel inactivation. *Science*, 241 (1) 1658-1661.
- Verheij, H.M.; Slotboom, A.J. and Haas De, G.H. (1981) Structure and function of Phospholipases A₂. *Ver. Physiol. Biochem. Pharmacol.*, 91: 91-203.
- Verheij, H.M.; Volwerk, J.J.; Jansen, E.H.J.M.; Puyk, W.C.; Dijkstra, B.W.; Drenth, J. and Haas De, G.H. (1980). Methylation of histidine-48 in pancreatic phospholipase A₂ Role of Histidine and Calcium Ion in the Catalytic Mechanism. *Biochemistry*, 19, 743-750.
- Vital, B. (1966) Pharmacology of crystalline crotoxin. II. Neuromuscular blocking action. *Mem.Inst.Butantan.* 33:981-992.
- Vital, B. (1972a) Venoms: their inhibitory action on neuromuscular transmission. *Int. Encycl. Pharmacol. Ther.* 14: 145-167
- Vital, B. (1972b) Neurotoxins from the South-American Rattlesnake venom. *J. Formosan Med. Assoc.* 71: 394-400.
- Vital, B., Fontana, M.D. (1996) Nature of the postsynaptic action of crotoxin at the guinea-pig end-plate. *Toxicon* Vol.Nro.(34)3:315.
- Vital, B., Franceschi, J. P. and Waisbich, E. (1966) Pharmacology of crystalline crotoxin. I. Toxicity, *Mem. Inst. Butantan*, 40/41: 221.

-
- Vital, B., Prado-Franceschi, J. and Waisbich, E. (1967) Factor neurotóxico na peçonha da *Crotalus durissus terrificus* diferente da crotoxina e da crotamina. *Ciência e Cultura*. Vol. 19, N°4,: 658-665.
- Weinrauch, Y., Elsbach, P., Madsen, L.M., Foreman, A. E Weiss, J. (1996) The potent ant. *Staphylococcus aureus*. activity of a rabbit inflammatory fluid is due to a 14 Kda Phospholipase A₂ *J. Clin. Invest.* 1997. 250-257
- Willians, E.J., Sung,S.C. and Laskowski, M. (1961) Action of venom phosphodiesterase on desoxyribonucleic acid. *J. Biol. Chem.* 236: 1130 - 1134.
- Wittcoff, H. (1951) The phosphatides. Ed. Reinhold Publising Corporation (New York), pp.99 - 115.
- Yang. C.C. (1974) Chemistry and evolution of toxins in snake venoms. *Toxicon* 12, 1.
- Yang, C.C. (1994). Structure-function relationship of phospholipase A₂ from snake venoms. *J.Toxicol.*, 13 (2): 125-177.
- Zlotkin, E.; Fraenkel, F.; Miranda, F. and Lissitzky, S. (1971) The effect of scorpion venom on blowfly larvae - a new method for the evaluation of scorpion venoms potency. *Toxicon* 9: 1 - 8.

VIII. CONGRESSOS E PUBLICAÇÕES

8.1 Congressos

VI Simpósio da Sociedade Brasileira de Toxinologia. “Contribuições da Toxinologia para o desenvolvimento das Ciências Biomédicas”. São Pedro – SP, 15 –18 de Março do 2000.

- Isolation on crotoxin like isoforms from the whole venom of *Crotalus durissus collilineatus* by analytical and preparative HPLC method: biological and biochemical characterization. Toyama, M.H.; Ponce-Soto, L.A; Silva, S-H.O; Rodrigues-Simione, L.; Camilo, J.C.; and Marangoni, S.

XV Reunião Anual da FESBE (Federação de Sociedades de Biologia Experimental). Caxambu – MG.; 23 – 26 de Agosto 2000.

- Isolamento e purificação de uma neurotoxina crotoxina “like” do veneno de *crotalus durissus collilineatus*. Caracterização preliminar. Ponce-Soto, L.A; Toyama, M.H.; Novello, J.C.; Mrangoni, S.
- Preliminary enzymatic characterization of phospholipase a2 (pla2) enzyme from *crotalus durissus collilineatus* characterization preliminar. Ponce-Soto, L.A; Toyama, M.H.; Hislop, S.; Novello, J.C.; Marangoni, S.

XVI Latinoamerican Congress of Pharmacology, XXXII Brazilian Congress of Pharmacology and Experimental Therapeutics. II Iberoamerican Congress of Pharmacology. VII Interamerican Congress of Clinical Pharmacology and Therapeutics. Aguas de Lindoia, SP – Brazil., 13 – 17 de September 2000.

- Purificación y caracterización bioquímica y biológica de una neurotoxina crotoxina like de veneno de *Crotalus durissus collilineatus*. Ponce-Soto, L.A; Toyama, M.H.; Novello, J.C.; Mrangoni, S.; Rodrigues-Simioni, L.
- Neurotoxic effect of crotoxin and PLA2 isoforms isolated from *Crotalus durissus terrificus* crotoxin on the neuromuscular junction. Saraguaci-Hernandez, O.S.; Leite, G.B.; Toyama, M.H.; Ponce-Soto, L.A. Marangoni, S.; Rodrigues-Simioni, L.
- **100 Anos. Reunião Científica Anual do INSTITUTO BUTANTAN** São Paulo – Brazil, 04 a 08 de dezembro de 2000. Preliminary enzymatic characterization of phospholipase A₂ (PLA₂) enzyme from *Crotalus durissus collilineatus*. Ponce-Soto, L.A; Hislop, S.; Novello, J.C.; Marangoni, S.; Toyama, M.H.
- **XXX Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular – SBBq** Caxambu – MG - Brazil, 19-22 de maio de 2001. The comparative study with serine proteases of snake venom from *Bothrops alternatus* and *Bothrops atrox* (of Peruvian). Ribeiro, D.A.; Ponce-Soto, L.A.; Silva, J. A.; Toyama, M. H.; Marangoni, S. and Novello, J. C.

8.2 Publicações

Trabalhos aceito/submetido relacionado com a tese

- Isolation and preliminary enzymatic characterization of a novel PLA₂ from *Crotalus durissus collilineatus* venom. Ponce-Soto, L.A., Toyama, M. H., Hyslop, S. And Marangoni, S. *Aceito ao Journal of Protein Chemistry*.
- Neurotoxic studies of crotoxina from the *Crotalus durissus collilineatus* on the neuromuscular junction of mouse and chick biventer cervicis. Ponce-Soto, L.A., Toyama, M. H., Silva, S.H.O., Rodrigues-Simioni, L. and Marangoni, S. *Submetido*.

Trabalhos submetidos não relacionados com a tese

- Isolation and characterization of serine protease from the peruvian *Bothrops atrox* venom Ponce-Soto, L.A., Toyama, M.H., Novello, J.C., Yarlequé, A., Baldasso, P.A. and Marangoni, S. *Submetido ao Journal of Protein Chemistry*.
- Isolation of A Thrombin-like Serine Protease from the venom of *Bothrops alternatus*. Ribeiro, D.A., Toyama, M.H., Ponce-Soto, L.A., Marangoni, S., and Novello, J.C. *Submetido ao Journal of Protein Chemistry*.